

Université de Montréal

**Les actions proinflammatoires de l'angiotensine II sont
dépendantes de la phosphorylation de p65 par le
complexe IkappaB kinase**

Par

Annie Douillette

Département de Pharmacie

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
En sciences pharmaceutiques
Option pharmacologie

Décembre, 2006

© Annie Douillette, 2006



QV
705
US8
2007
V.007

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Les actions proinflammatoires de l'angiotensine II sont dépendantes de la phosphorylation
de p65 par le complexe IkappaB kinase

Présentée par :
Annie Douillette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Marc Servant, directeur de recherche
Pierre Moreau, co-directeur
Daniel Lévesque, président rapporteur
Stéphane Laporte, examinateur externe

Résumé

Les actions proinflammatoires de l'angiotensine II, impliquant l'activation du facteur de transcription NF- κ B, pourraient être impliquées dans le développement de certaines maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose. Cependant, les voies de signalisation menant à l'activation de NF- κ B par l'angiotensine II ne sont que peu caractérisées à ce jour. Ce mémoire décrit un nouveau modèle d'activation de NF- κ B dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) traitées à l'angiotensine II. Contrairement aux CMLV traitées au TNF- α , un traitement à l'angiotensine II ne cause ni phosphorylation ni dégradation protéasome-dépendante de l'inhibiteur I κ B α . Néanmoins, l'activité phosphotransférase du complexe I κ B kinase (IKK), la liaison à l'ADN et l'induction de gènes régulés par NF- κ B comme *IL-6* ont tous augmentés dans les CMLV traitées à l'angiotensine II. La caractérisation des voies de signalisation activées par l'angiotensine II et impliquées dans l'activation de NF- κ B a permis d'observer que le traitement à l'angiotensine II amène la phosphorylation de p65 en sérine 536. Cette phosphorylation est indépendante de la voie MEK-ERK-RSK mais implique l'activation de la sous-unité IKK β . Nos résultats semblent démontrer que les actions proinflammatoires de l'angiotensine II pourraient dépendre de l'activation du complexe IKK permettant la phosphorylation IKK β -dépendante de p65 en sérine 536, un processus connu pour augmenter la transactivation de p65 et par le fait même augmenter l'expression de gènes proinflammatoires.

Mots-clés : Pharmacologie moléculaire, athérosclérose, inflammation, angiotensine II, NF- κ B, p65, I κ B kinase

Abstract

Through the activation of NF- κ B transcription factor, the vasoactive hormone Angiotensin II (Ang II) is thought to be involved on the establishment of inflammatory cardiovascular diseases such as atherosclerosis. However, the molecular mechanism involved in the activation of NF- κ B by Ang II needs further investigation. This thesis describes a new model of activation of NF- κ B in vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to Ang II. Indeed, as oppose to TNF- α -treated VSMC, Ang II treatment did not result in phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the NF- κ B inhibitor, I κ B α . However, the phosphotransferase activity of I κ B kinase (IKK) complex, the DNA binding activity and the induction of NF- κ B-regulated genes such as *IL-6* were all increased in Ang II-treated VSMC. The characterization of the molecular signaling pathways activated by Ang II and involved in NF- κ B activation allow the observation that Ang II treatment did not result in tyrosine phosphorylation of I κ B α but, instead, led to phosphorylation of p65 on serine 536. The use of pharmacological inhibitors revealed that phosphorylation of p65 on serine 536 did not require the MEK-ERK-RSK signaling pathway but involved the subunit IKK β . Taken together, our data seems to demonstrate that the proinflammatory activity of Ang II should depend on the activation of IKK β signaling cascade leading to phosphorylation of p65 on Ser536, a process known to increase the transactivating activity of p65 in order to activate proinflammatory genes.

Keywords: Molecular pharmacology, atherosclerosis, inflammation, angiotensin II, NF-kappaB, p65, IkappaB kinase

Table des matières

Page titre.....	i
Page d'identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abbréviations.....	xi
Dédicace.....	xiv
1 CHAPÎTRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1.1 Incidence de l'athérosclérose	1
1.2 La composition de la paroi artérielle.....	1
1.2.1 La composition macroscopique.....	1
1.2.2 La composition cellulaire	2
1.2.2.1 Les cellules endothéliales.....	2
1.2.2.2 Les cellules musculaires lisses vasculaires	3
1.2.2.3 La matrice extracellulaire.....	3
1.3 La pathogenèse de l'athérosclérose.....	4
1.3.1 Dysfonction endothéliale	5
1.3.2 Entrée et modification des lipides.....	6
1.3.2.1 Rôles physiologique et mode de production des lipoprotéines.....	6
1.3.2.2 Implication des lipides dans l'athérosclérose.....	9
1.3.3 Recrutement des leucocytes et strie lipidique	9
1.3.4 Recrutement des cellules musculaires lisses vasculaires et plaques fibreuses	10
1.3.5 Complication et rupture de la plaque	11
1.3.6 Facteurs de risque.....	13
1.3.7 Le traitement de l'athérosclérose	15

1.4	Le système rénine-angiotensine	17
1.4.1	Le système circulant.....	18
1.4.2	Le système tissulaire	18
1.5	Pharmacologie des récepteurs de l'angiotensine II.....	19
1.5.1	Le récepteur AT ₁	19
1.5.1.1	La structure du récepteur AT ₁	20
1.5.1.2	Le récepteur AT _{1A} et AT _{1B} chez le rat	20
1.5.1.3	Le récepteur AT ₁ humain.....	21
1.5.1.4	Les souris AT ₁ R knock-out.....	21
1.5.1.5	La signalisation du récepteur AT ₁	22
1.5.1.6	La désensibilisation et internalisation du récepteur AT ₁	25
1.5.2	Le récepteur AT ₂	26
1.6	Rôles pro-inflammatoires de l'angiotensine II dans le développement de l'athérosclérose	28
1.7	Le facteur de transcription NF-kappaB.....	33
1.7.1	Description	33
1.7.2	Fonction.....	35
1.7.3	Activation.....	36
1.7.3.1	Activation classique	36
1.7.3.2	Voie d'activation alternative.....	37
1.7.3.3	Spécificité.....	39
1.7.3.4	Deuxième phase d'activation	39
1.8	Hypothèse et objectifs.....	41
2	CHAPÎTRE II. ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	44
3	CHAPÎTRE III. DISCUSSION.....	87
3.1	Maladies cardiovasculaires et inflammation chronique.....	87
3.2	Implication de cette nouvelle voie dans les rôles physiologiques de l'Ang II.....	88
3.3	Explication du modèle.....	89
3.4	Perspectives.....	93

3.4.1	Aspects moléculaires.....	93
3.4.2	Aspects cliniques.....	94
4	Conclusion.....	96
	Bibliographie.....	95

Liste des tableaux

Table I : Lignes directrices pour la sélection d'un traitement de l'hypertension (World Health Organization, 1999).....	16
Table II : Définition et classification des valeurs de pression artérielle en mmHg (World Health Organization, 1999).....	17

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1 : Composition macroscopique de l'artère.....	2
Figure 2 : Développement de l'athérosclérose.....	5
Figure 3 : Signalisation du récepteur AT1 dans les CMLV.....	24
Figure 4 : Illustration des membres de la famille Rel et I κ B chez le mammifère (Chen and Greene, 2004).....	34
Figure 5 : Activation classique et alternative du facteur de transcription NF- κ B. Figure modifiée de (Chen and Greene, 2004).....	38

ARTICLE

Figure 1: A NF- κ B superrepressor antagonizes Ang II-induced <i>IL-6</i> transcription in VSMC.....	77
Figure 2: Activation of the canonical IKK complex in Ang II-treated VMSC.....	78
Figure 3: Ang II does not lead to N-terminal phosphorylation of I κ B α nor degradation in VSMC.....	79
Figure 4: Ang II-induced rapid phosphorylation of p65 in VSMC.....	80
Figure 5: Ang II-induced Ser-536 phosphorylation of p65 is dependent of IKK β	81
Figure 6: Activation of the IKK complex by Ang II is independent of EGFR transactivation and the PI3-kinase pathway.....	82
Figure 7: Proposed model for the activation of NF- κ B by Ang II in VSMC.....	83

Figure supplémentaire 1: Increase DNA binding activity in VSMC exposed to Ang II.....	84
Figure supplémentaire 2A: Ang II does not lead to phosphorylation of I κ B α on tyrosine residues.....	85
Figure supplémentaire 2B: No processing of p105 is observed in Ang II-treated VSMC...	85
Figure supplémentaire 3: In vitro phosphorylation of the TAD of p65 by the IKK complex.....	86
Figure supplémentaire 4: Ang II treatment leads to nuclear accumulation of phosphorylated p65 in the presence of MG-132.....	86

Liste des abréviations

ACE^{-/-} : souris nulle pour le gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

ADN : acide desoxyribonucléique

Agt^{-/-} : souris nulle pour le gène de l'angiotensinogène

Ang : angiotensine

AP-2 : protéine adaptatrice 2

Apo : apolipoprotéine

ApoE^{-/-} : souris nulle pour le gène de l'apolipoprotéine E

ARA : antagoniste du récepteur de l'angiotensine

ARNm : acide ribonucléique messenger

AT^{*}R : récepteur de l'angiotensine de type *

AT_{1A}R^{-/-} : souris nulle pour le gène du récepteur de l'angiotensine IA

AT₂R^{-/-} : souris nulle pour le gène du récepteur de l'angiotensine II

BAX : Bcl-2-associated X protein

Ca²⁺ : calcium ionique

CAM : calmoduline kinase

CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire

COX-2 : cyclooxygénase-2

CREB: cAMP response element-binding

CRP: protéine C-réactive

DG: diacylglycérol

DHR: domaine d'homologie Rel

EGF: epidermal growth factor

EGFR: récepteur de l'EGF

ERK 1/2: extracellular signal regulated kinase 1 and 2

FGF: fibroblaste growth factor

G_i ou G_q: protéine Gi ou Gq

GKR: kinase des récepteurs couples aux protéines G

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GPCR: récepteur couple aux protéines G ou récepteur à sept passages transmembranaires
HAT : histone acetyl transférase
HB-EGF: heparin-binding epidermal-factor-like
HDAC1: histone désacétylase 1
HDL : lipoprotéine de haute densité
ICAM-1 : molécule d'adhésion intracellulaire
IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire
iECA: inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II
IGF-1 : insulin-like growth factor
I κ B : inhibiteur de NF- κ B
IKK : complexe de kinase I κ B
IL : interleukine
IP3 : inositol trisphosphate
JAK: Janus kinase
JNK1/JNK2: c-Jun NH₂-terminal kinase 1 and 2
LDL : lipoprotéine de basse densité
LDL-ox : lipoprotéine de basse densité oxydée
LOX1 : récepteur de lipoprotéine de basse densité
LPL : lipoprotéine lipase
LPS : lipopolysaccharide
LYS : lysine
MAP kinase : mitogen-activated protein kinase
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1
MCV : maladie cardiovasculaire
MEC : matrice extracellulaire
MMP: métalloprotéinases de matrice
MSK-1: mitogen-and-stress-activated protein kinase1
NAD(P)H : Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
NF- κ B : facteur nucléaire kappa B

N : nucléotide
NES : signal d'export nucléaire
NIK : NF- κ B inducing kinase
NLS : signal de localisation nucléaire
No: oxyde nitrique
P65: sous-unité p65
PAI-1: activateur du plasminogène 1
PDGF: platelet-derived growth factor
PDK-1: phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3-kinase: phosphoinositide 3-kinases
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLC- β ou γ : phospholipide C beta ou gamma
PMA : phorbol 12-myristate acetate
PPAR : peroxisome proliferator activated-receptor
PPTases : protéines phosphotyrosines phosphatases
PYK : kinase riche en proline
R: purine
RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
ROS: espèce réactive de l'oxygène
RSK: ribosomal S6 kinase
SCF: Skp, Cullin, F-box containing complex
Ser536: sérine 536
siRNA: Small interfering RNA
SRA: système rénine-angiotensine
SR-A : récepteur polyvalent de type A
SR-B : récepteur polyvalent de type B
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription protein
TAD: domaine de transactivation

TBK-1: TRAF family member-associated binbing protein

TBP: TATA-binding protein

TF : facteur tissulaire

TFIIB : facteur de transcription IIB

TGF- β : transforming growth factor beta

TNF: tumor necrosis factor

TRAF: facteur associé au récepteur du TNF

VCAM-I : molecule d'adhésion de cellules vasculaires-I

VEGF: vascular endothelial growth factor

VLDL : lipoprotéine de très basse densité

Y : pyrimidine

À mon père

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Marc Servant pour toute la passion qu'il a su me transmettre et son support constant qui m'a permis de développer mes qualités en recherche.

Je veux également remercier mon co-directeur Pierre Moreau qui a amené une autre dimension à mon expertise grâce à sa grande connaissance en pharmacologie.

Un merci spécial à mes collègues de travail : Annie Bibeau-Poirier, Simon-Pierre Gravel, Jean-François Clément et Valérie Chénard, qui ont assuré le succès de ce projet grâce à leurs idées et à leur travail acharné.

Merci également à ma famille, à mon copain et à mes amis pour avoir cru en moi et pour m'avoir sans cesse encouragé à me dépasser.

Finalement, je tiens à remercier l'institut de recherche en santé de Canada pour avoir subventionné le projet, la faculté de pharmacie et le fond de recherche en santé du Québec pour les bourses qui m'ont été octroyées.

1 CHAPÎTRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Incidence de l'athérosclérose

L'athérosclérose et les complications qui y sont associées sont les causes les plus fréquentes des maladies coronariennes (Falk, 2006). Cette situation est inquiétante puisque encore aujourd'hui les maladies cardiovasculaires (MCV) sont responsables de la majorité des décès non seulement au Canada, mais également dans tous les pays industrialisés. En effet, selon la dernière étude effectuée par Statistiques Canada et parue en 2002, les MCV ont causé 32% des décès chez les canadiens et 34% des décès chez les canadiennes pour un total de 74 626 décès (statistiques canada, 2002). Fait encore plus inquiétant, 80% des canadiens présentent au moins un facteur de risque pour les MCV et 11% présentent trois facteurs de risques ou plus (Heart and Stroke Fondation Fact Sheet, 2003). Même si le nombre de décès a diminué au début des années 1990, il est demeuré plutôt stable depuis le milieu de cette décennie. Par le fait même, les MCV demeurent les principales causes d'hospitalisation, ce qui engendre des coûts économiques et sociaux astronomiques qui ont atteint 18.5 milliards en 1998. Il est donc primordial de mieux comprendre les facteurs qui contribuent au développement de ces maladies.

1.2 La composition de la paroi artérielle

1.2.1 La composition macroscopique

La paroi artérielle se compose de trois couches superposées (figure1, page2): l'intima qui est la partie qui entre en contact avec la lumière du vaisseau, la média qui se retrouve au centre de la paroi et finalement l'adventice qui est la couche externe. L'intima est composée d'une couche unique de cellules endothéliales métaboliquement actives dont la principale fonction physique est de créer une barrière entre les composantes du sang et la paroi du vaisseau sanguin. La média assure la rigidité du vaisseau grâce à ces deux parties riches en élastine appelées lamina interne et externe qui séparent respectivement la média de intima et de l'adventice. La media contient des cellules musculaires lisses vasculaires

(CMLV) et une matrice extracellulaire (MEC) riche qui assurent les fonctions contractiles et élastiques du vaisseau. L'adventice tant qu'à elle contient les vaisseaux sanguins nommés vaso vasorum, les nerfs et les vaisseaux lymphatiques qui nourrissent et innervent le vaisseau (Lilly, 2003).

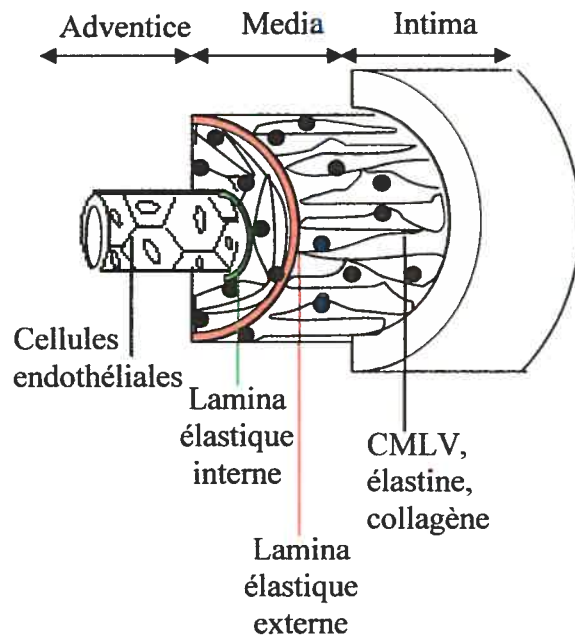


Figure 1 : Composition macroscopique de l'artère

1.2.2 La composition cellulaire

Bien qu'il y ait plusieurs types cellulaires dans la paroi des vaisseaux, nous pouvons en cerner trois qui sont particulièrement impliqués dans le développement de l'athérosclérose.

1.2.2.1 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales ont plusieurs fonctions. Tout d'abord leur arrangement serré permet de créer une barrière empêchant ainsi le passage de grosses molécules du lumen vers l'espace sous-endothéliale. L'endothélium va également produire des molécules antithrombotiques comme le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline pour

prévenir la formation de caillots via leurs actions sur l'héparine sulfate, la thrombomoduline, l'activateur du plasminogène (PA) et la sécrétion de l'inhibiteur de plaquette. De plus, le NO et la prostacycline vont participer à la régulation de la pression artérielle en agissant comme vasodilatateurs. Les fonctions de vasoconstriction quant à elles seront principalement assurées par l'endothéline. Ces cellules vont également agir sur les CMLV pour prévenir leur migration et leur prolifération en augmentant la sécrétion de NO et d'héparine sulfate. Finalement, l'endothélium a une fonction immunitaire très importante. En réponse à une injure ou à une infection, il permet la sécrétion de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion qui permettront le recrutement des leucocytes vers le site désiré (Lilly, 2003).

1.2.2.2 Les cellules musculaires lisses vasculaires

La principale fonction des CMLV consiste à se contracter pour assurer la régulation de la pression artérielle. Puisqu'elles sont dans un stade final de différenciation, elles ne se divisent plus. Cependant, elles acquièrent la capacité de répondre à plusieurs agents. Il y a d'abord les agonistes comme l'angiotensine II (AngII), les substances produites par les terminaisons nerveuses comme l'acétylcholine et la noradrénaline et celles produites par l'endothélium comme le NO. Ces substances permettront soit la contraction ou la relaxation des CMLV assurant ainsi le maintien de la pression artérielle. En plus de son rôle contractile, les CMLV vont également avoir un rôle de synthèse. Elles participent à la formation de la MEC en produisant le collagène, l'élastine et les protéoglycanes qui entrent dans la composition de la MEC. Elles vont également synthétiser des substances vasoactives comme l'AngII et des médiateurs inflammatoires comme des chimiokines. Les fonctions de synthèse des CMLV vont devenir plus importantes dans certaines pathologies comme l'athérosclérose (Lilly, 2003).

1.2.2.3 La matrice extracellulaire

Le rôle de la MEC est d'assurer l'intégrité du vaisseau. Dans une artère saine, les composantes majeures de la MEC sont le collagène et l'élastine. Les fibrilles de collagènes

donnent la résistance au vaisseau alors que l'élastine lui donne sa flexibilité. Certaines évidences semblent également démontrer que la MEC pourrait être impliquée dans la régulation de la croissance des cellules présentes dans la paroi du vaisseau. En effet, des études *in vitro* ont démontrées que des fibrilles naissantes de collagènes pouvaient inhiber la croissance des CMLV. Certaines composantes de la MEC vont également influencer la façon dont les cellules répondent aux stimuli. Par exemple, les cellules attachées à la MEC répondent différemment aux facteurs de croissance et sont plus résistantes à l'apoptose (Lilly, 2003).

1.3 La pathogenèse de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie complexe qui fait intervenir une succession d'évènements au cours de son développement (Figure2, page 5). La plupart des recherches s'entendent sur son origine proinflammatoire et les principales phases de son développement (Falk, 2006; Hansson and Libby, 2006; Lilly, 2003). Il y a d'abord une dysfonction endothéliale qui permettrait l'accumulation de lipide et de macrophages dans l'espace sous-endothéliale. Les lipides y sont modifiés, ce qui causerait le recrutement de leucocytes et la production de chimiokines. On assiste alors à la formation de la strie lipidique. La lésion évoluera ensuite vers la forme de plaque fibreuse avec la migration et la prolifération des CMLV de la media vers l'intima. Une protubérance recouverte d'un cap fibreux se forme et se projette dans la lumière du vaisseau. Cette protubérance demeure relativement stable jusqu'à ce qu'elle devienne vulnérable au point de pouvoir se rompre. Le centre thrombogénique de la plaque est alors exposé ce qui peut causer la formation d'un caillot et donc mener à l'accident cardiovasculaire. Les différentes étapes seront expliquées en détail dans les lignes qui suivent.

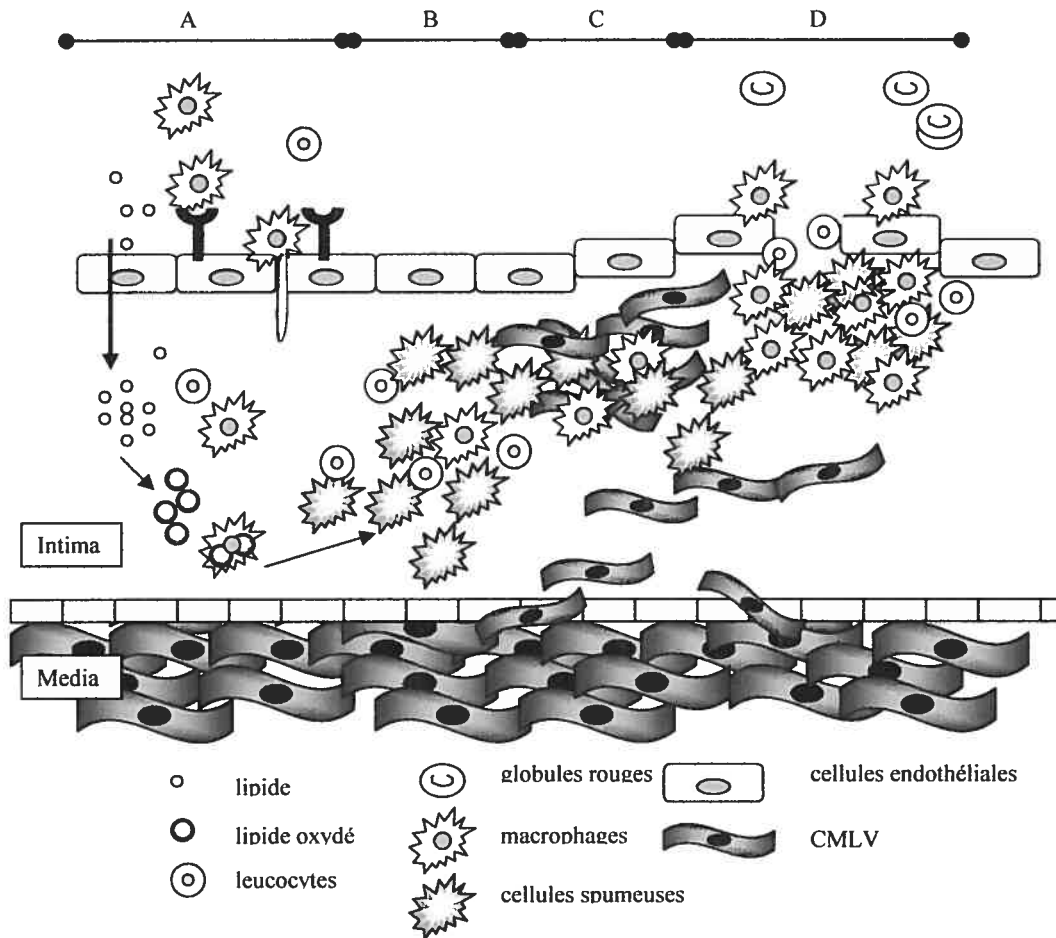


Figure 2 : Développement de l'athérosclérose. A) Dysfonction endothéliale, entrée et modification des lipides. B) Recrutement des leucocytes et strie lipidique. C) Recrutement des CMLV et plaque fibreuse. D) Complication et rupture de la plaque

1.3.1 Dysfonction endothéliale

Un des premiers événements que l'on observe dans le développement de l'athérosclérose est l'activation de l'endothélium (figure 2A, page 5). Cette activation peut être provoquée par des forces physiques ou chimiques qui seront discutées dans la section traitant des facteurs de risque (Lilly, 2003). L'endothélium activé réagit différemment ce qui modifie les fonctions qu'il peut accomplir. Premièrement, le rôle de barrière est altéré, ce qui augmente la perméabilité du vaisseau aux grosses molécules. De plus, il y a

diminution de la sécrétion de prostacycline et de NO causant une diminution des effets antithrombotiques des cellules endothéliales ainsi qu'une augmentation de la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires. Cette augmentation de la contraction cause une augmentation de la rigidité des artères (Lilly, 2003). La diminution du NO associée à une sécrétion plus intense du platelet-derived growth factor (PDGF) par les cellules endothéliales cause une migration et une prolifération des CMLV. Il y a également un changement au niveau des fonctions immunitaires. À cause de ces changements de fonction, la dysfonction endothéliale va permettre, si la concentration sanguine est assez élevée, le passage des lipides de la lumière du vaisseau vers l'espace sous-endothéliale. Il y a alors création d'un milieu proangiogénique et proinflammatoire. Ce milieu va amener des changements précoces au niveau de l'endothélium se caractérisant par la production de cytokines et l'expression de molécules d'adhésion à la surface cellulaire. On y retrouve d'abord les molécules d'adhésion de cellules vasculaires-1 (VCAM-1) qui permettent le recrutement des monocytes et des cellules T. On retrouve également d'autres molécules d'adhésion comme les molécules d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1), la E-sélectine ainsi que la P-sélectine qui pourraient participer au processus inflammatoire. Les endroits de l'artère où l'on retrouve l'activation de l'endothélium et l'expression de VCAM-1 seront ceux où l'on retrouvera les stries lipidiques au cours du développement de la pathologie (Falk, 2006).

1.3.2 Entrée et modification des lipides

1.3.2.1 Rôles physiologique et mode de production des lipoprotéines

Les lipides et leur circulation dans l'organisme assurent des fonctions essentielles. Tout d'abord, les triglycérides qui sont transportés des intestins et du foie vers les muscles ou le tissu adipeux peuvent être emmagasinés ou utilisés comme source d'énergie. Le cholestérol tant qu'à lui se dirige vers les tissu périphérique pour s'intégrer à la composition des membranes cellulaires ou servir à la production des hormones stéroïdes. Dans le foie, le cholestérol permettra la synthèse de l'acide biliaire (Lilly, 2003).

Les lipoprotéines sont des macromolécules sphériques de tailles et compositions variables. Leur structure générale est identique. Elles sont formées d'un corps lipidique hydrophobe contenant essentiellement des triglycérides et des esters de cholestérol, enrobés d'une monocouche de lipides polaires constituée de phospholipides et de cholestérol libre. Des protéines spécifiques, nommées apolipoprotéines (apo), sont retrouvées à la surface des lipoprotéines. Les apo ont premièrement une fonction de structure, puisqu'elles assurent la cohésion du complexe lipidique et sa solubilisation. Deuxièmement, elles servent de régulation métabolique. En effet, elles agissent comme cofacteur et/ou activateur de nombreuses enzymes plasmatiques et elles servent de ligands pour les interactions avec les protéoglycans endothéliaux et des récepteurs cellulaires des lipoprotéines (Choy et al., 2004).

On retrouve dans la circulation cinq grandes classes de lipoprotéines qui se distinguent selon leur densité, leur constitution en lipides et leur association aux apo. Il y a les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines à densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines à basse densité (LDL) et les lipoprotéines à haute densité (HDL). Il existe deux voies principales de formation des lipoprotéines nommées voie exogène et voie endogène (Lilly, 2003).

Dans la voie exogène, la source de lipide provient de l'alimentation. Après avoir passé la barrière intestinale, le gras alimentaire se retrouve sous forme de chylomicrons associés à apo B-48 et entre dans la circulation par le système lymphatique. Les chylomicrons interagissent alors avec le HDL provenant du tractus gastrointestinal ou du foie. Au même moment, les apo C et E s'associent au nouveau complexe, ce qui augmente leur interaction avec la lipoprotéine lipase (LPL) et les récepteurs hépatiques. La LPL se retrouve dans les cellules endothéliales des capillaires au niveau des tissus adipeux et des muscles et permet l'hydrolyse des triglycérides contenus dans les chylomicrons pour former des acides gras libres. Les acides gras seront emmagasinés par les tissus adipeux ou utilisés par les muscles comme source d'énergie. L'insuline sera nécessaire pour que les acides gras soient utilisés par les muscles. Les surplus d'acides gras restent dans la

circulation puis retourne vers le foie pour être stockés sous forme de triglycérides. Les surplus de chylomicrons sont également dirigés vers le foie pour être enlevés de la circulation. La voie exogène sera complétée par la formation des acides biliaires à partir du cholestérol qui retourne alors dans l'intestin (Lilly, 2003).

Le point de départ de la voie endogène est le cholestérol et les triglycérides contenus dans le foie. Ils s'associent avec des apo (principalement apo B-100) et des phospholipides pour former les VLDL qui sont relâchés dans la circulation sanguine et deviennent la principale source de cholestérol. Les VLDL interagissent avec les HDL grâce à une enzyme nommée la *cholesteryl ester transfer protein*. Lors de cette interaction, le VLDL échange une partie de ces triglycérides contre des ester de cholestérol et des apo C et E provenant du HDL. Le VLDL peut alors être transformé en acides gras par la LPL au niveau des tissus adipeux et des muscles. Les VLDL non-utilisés, appelés IDL, sont soit dirigés vers le foie via les récepteurs hépatiques pour être éliminés ou transformés par la LPL et la lipase hépatique. Au cours de ce processus les IDL perdent un triglycéride, apoC et apoE pour devenir les LDL. L'élimination des LDL se fera via l'endocytose par les récepteurs aux LDL dans le foie ou les cellules périphériques qui reconnaissent le apo B-100 (Choy et al., 2004).

Lorsqu'il y a peu de cholestérol dans la circulation, les cellules périphériques vont augmenter l'expression des récepteurs aux LDL. Lorsqu'il y a un excès de cholestérol, les cellules augmentent plutôt l'expression de la *cholesterol efflux regulatory protein*, ce qui facilite l'élimination du cholestérol qui sera transporté sous forme de HDL vers le foie. Lorsque le cholestérol est capté par les HDL immatures, il est estérifié par la lecithin cholesterol acyltransferase, une enzyme dépendante de apo A contenue dans le HDL. Les esters de cholestérol pourront être échangés dans la circulation aux lipoprotéines contenant l'apo B, c'est-à-dire les VLDL, IDL et LDL), qui retourneront le cholestérol vers le foie (Choy et al., 2004).

1.3.2.2 Implication des lipides dans l'athérosclérose

Les lipoprotéines les plus susceptibles à créer un environnement propice au développement de l'athérosclérose sont les LDL. Lorsqu'il y a une dysfonction au niveau de l'endothélium, sa capacité à servir de barrière étanche est altérée (Lilly, 2003). Une concentration élevée de lipides dans le sang associé à une dysfonction endothéliale favorise donc le passage des lipides, plus particulièrement des LDL et du cholestérol, de la circulation vers la paroi des vaisseaux (Figure 2A, page 5). Les LDL peuvent alors se lier à des protéoglycanes que l'on retrouve dans la MEC et rester trappés dans l'espace sous-endothéliale. L'hypertension artérielle favorise la rétention des lipides en augmentant l'expression des protéoglycanes par les CMLV. L'augmentation du temps de résidence des lipoprotéines, augmente leur susceptibilités aux modifications (Skalen et al., 2002). La modification la plus fréquente est l'oxydation. Contrairement au sang qui a des propriétés antioxydantes, l'espace sous-endothélial peut avoir des caractéristiques d'avantage pro-oxydantes. Certains facteurs de risque augmentent les espèces réactives de l'oxygène et les enzymes pro-oxydantes qui peuvent alors transformer le LDL en LDL oxydé (LDLox). La peroxydation des LDL est la modification qui transforme le plus souvent le LDL en LDLox. Ces modifications du LDL engendrent plusieurs conséquences. D'abord, le LDLox a des effets chimioattractants directes pour les monocytes circulants puisqu'il est reconnu comme du non-soi. De plus, ils agissent de façon indirecte en favorisant l'expression de molécules inflammatoires par l'endothélium. Encore une fois, ceci permet le recrutement des monocytes dans l'espace sous-endothélial. En reconnaissant les LDLox comme du non-soi, les monocytes devenus macrophages, ingèrent les lipides modifiés contrairement à ceux non modifiés (Matsuura et al., 2006).

1.3.3 Recrutement des leucocytes et strie lipidique

L'étape qui suit l'entrée et la modification du LDL est le recrutement des leucocytes (Figure 2B, page5). Plusieurs facteurs vont contribuer à cette étape dont les effets chimioattractants des LDLox et l'expression de cytokines et de molécules d'adhésion par

les cellules de l'endothélium vasculaire. Après avoir adhéré à la surface des cellules endothéliales, les monocytes passent dans l'intima des vaisseaux par extravasation. Les monocytes se différencient alors en macrophages et commencent à phagocyter le LDLox via les récepteurs polyvalents. Dans cette famille de récepteurs, on retrouve le CD36, le CD68, le CXCL16, le lectin-type oxidized low density lipoprotein receptor (LOX1) ainsi que les récepteurs scavengers SR-A et SR-B1. Contrairement au récepteur du LDL qui est régulé négativement, les récepteurs scavengers ne le sont pas. Les macrophages continuent donc à accumuler des LDLox et se transforment alors en cellules spumeuses (Nicholson and Hajjar, 2004). Les cellules spumeuses sont décrites comme des macrophages ou des CMLV ayant un cytoplasme clair rempli de lipides majoritairement sous forme d'esters de cholestérol (Falk, 2006).

La concentration de cellules spumeuses dans l'intima va conduire au stade de développement de l'athérosclérose que l'on nomme la strie lipidique. La strie lipidique est l'un des premiers signes du développement de l'athérosclérose. Elle prend l'apparence de petites zones jaunâtres sur la surface interne du vaisseau. On n'observe aucune protubérance et il n'y a donc pas de perturbation au niveau du flot sanguin. À ce stade, la lésion est possiblement réversible selon sa localisation. En plus des macrophages, la strie lipidique va également contenir des lymphocytes T quoiqu'en plus faible quantité. Ils ont la possibilité de reconnaître le CMH de classe II exprimé par les macrophages présents dans la lésion. Ils vont s'activer et produire des cytokines ce qui va contribuer au développement de la plaque (Hansson and Libby, 2006; Lilly, 2003).

1.3.4 Recrutement des cellules musculaires lisses vasculaires et plaques fibreuses

Dans les phases plus avancées de la pathologie, les stries lipidiques vont céder la place aux plaques fibreuses (Figure 2C, page 5). Ces plaques se présentent comme des lésions fermes, surélevées, de couleur grise pâle qui se projettent dans la lumière des vaisseaux. Elles se composent d'un corps lipidique nécrotique hautement thrombogénique.

En effet, se corps contient en plus des cellules spumeuses dégénérées et de débris cellulaires, des cellules spumeuses saines qui sécrètent beaucoup de facteurs thrombogéniques. Cependant, la formation du cap fibreux autour du corps nécrotiques prévient la formation de thrombus. Ce cap fibreux est riche en MEC et en CMLV (Lilly, 2003). Les CMLV présentes dans le cap fibreux proviennent de la media. La migration, la prolifération et l'entrée des CMLV dans une phase davantage synthétique que proliférative caractérisent d'ailleurs le début des phases plus avancées de l'athérosclérose. Les CMLV subissent donc une dédifférentiation, perdant leur propriété contractile au profit de propriétés synthétiques, et plusieurs facteurs vont contribuer à ce changement. Tout d'abord, les cellules spumeuses, les cellules endothéliales et les plaquettes activées vont sécréter plusieurs cytokines et facteurs de croissance qui vont favoriser la migration et la prolifération des CMLV. Parmi ces facteurs, on retrouve le PDGF, l'héparin-binding epidermal-factor-like growth factor (HB-EGF), l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1), le fibroblast growth factor (FGF), le transforming growth factor beta (TGF- β) et l'angiotensine II (Ang II). Il y aura également dégradation de certains éléments de la MEC, comme l'héparine sulfate, pouvant inhiber la croissance de CMLV. Les CMLV migrent alors de la media vers l'intima et amorcent leur stade synthétique principalement sous l'influence du PDGF et du TGF- β (Newby and Zaltsman, 1999).

1.3.5 Complication et rupture de la plaque

Les complications associées à l'athérosclérose peuvent amener des conséquences graves comme la morbidité ou la mortalité. Les principales conséquences de l'athérosclérose sont la sténose, la formation d'un thrombus occlusif, l'embolie et l'affaiblissement de la paroi des vaisseaux (Figure 2D, page 5). La sténose est principalement due à la projection de la plaque fibreuse dans la lumière du vaisseau. Lorsque le flot sanguin devient trop perturbé, il peut y avoir formation de microthrombies. De plus, la formation de légères lésions dans l'épithélium du cap fibreux va contribuer au développement et à l'agglomération de ces microthrombies. Cependant, il a été démontré que le niveau d'obstruction n'offre qu'une faible corrélation avec le risque d'accidents

cardiovasculaires (Schroeder and Falk, 1995). Ces données appuient l'hypothèse selon laquelle, les complications sont plutôt causées par la vulnérabilité et la rupture de la plaque. La configuration de la plaque va influencer son niveau de vulnérabilité. Une plaque athéromateuse solide, riche en MEC et en collagène et contenant relativement peu de lipide sera plus stable et ce même si elle est plus étendue. Cependant, si les quantités de lipides extracellulaires et de macrophages sont importantes et que le cap fibreux est mince, la plaque sera plus vulnérable aux stress (Falk, 1992). Les macrophages activés et les cellules spumeuses, retrouvées en grande quantité dans les plaques instables, produisent des substances cytotoxiques et des métalloprotéinases de matrice (MMP) qui vont détruire les CMLV produisant le collagène ainsi que que la MEC, ce qui amincit le cap fibreux. Les CMLV produisent également des MMP et participent à la vulnérabilité de la plaque (Schroeder and Falk, 1995). Des facteurs extrinsèques à la plaque comme le stress mécanique et hémodynamique a également un impact sur l'instabilité de la plaque. L'étirement et la flexion répétitive des artères coronaires lors de la contraction cardiaque, la flexion subséquente des extrémités de la plaque lors de l'onde de pouls ou d'un changement dans le tonus vasculaire ainsi que les forces de cisaillements sont tous des exemples de stress mécaniques ou hémodynamiques (Gertz and Roberts, 1990). L'influence de l'activité sympathique sur ces phénomènes, peut expliquer en partie, la relation qui existe entre les variations circadiennes (éveil, effort physique, stress émotionnel et froid) et les accidents coronariens soudains (Dickson and Gotlieb, 2003).

Les conséquences qui suivent la rupture de la plaque dépendent ensuite de trois facteurs principaux. D'abord, la gravité dépend de la composition et de l'étendue des substrats thrombogéniques. Le facteur tissulaire est considéré comme l'un des plus important composant prothrombogénique du corps nécrotique. Il est produit par les cellules spumeuses et se retrouve également dans le milieu extracellulaire possiblement suite à la mort des macrophages et le relâchement de leur contenu (Schroeder and Falk, 1995). De plus, l'endothélium adjacent à la plaque rompue peut promouvoir la coagulation et diminuer l'activité antiplaquettaire et la fibrinolyse (Dickson and Gotlieb, 2003). Le thrombus est riche en plaquettes qui sont activés directement par l'exposition des

composantes de la plaque comme le collagène ou par les forces de cisaillement. Elles peuvent également être activées indirectement par la formation de thrombine de façon intrinsèque via l'activation de contact ou de façon extrinsèque via le facteur tissulaire (Schroeder and Falk, 1995). Deuxièmement, la gravité de la rupture de la plaque sera influencée par le degré et l'irrégularité de la sténose. En effet, plus la sténose est importante, plus la formation d'un caillot risque de causer un blocage complet de l'artère et ainsi causer une ischémie complète plutôt que partielle. De plus, les plaquettes risquent davantage de s'activer et de s'attacher à une surface plus grande et plus irrégulière, ce qui augmente encore une fois la grosseur du thrombus qui se forme après la rupture de la plaque. La grosseur du thrombus augmente également davantage dans les vaisseaux où le flot sanguin et les forces de cisaillement sont importants, probablement à cause de l'activation plaquettaire qui y a également augmentée (Dickson and Gotlieb, 2003). Troisièmement, la gravité dépendra de l'équilibre entre les composantes thrombotiques et thrombolytiques. Ainsi, les patients souffrant d'hyperaggrégation plaquettaire, d'hypercoagulation et d'une fibrinolyse déficiente sont plus susceptibles d'avoir des symptômes. L'hypercoagulation peut être causée par la présence de monocytes activés dans le sang périphérique (Schroeder and Falk, 1995). L'importance de l'équilibre entre les composantes thrombotiques et thrombolytiques est démontrée par les bienfaits apportés par les anti-coagulants et les anti-plaquettaires pour contrer les infarctus du myocarde (Merlini et al., 1994). Selon les caractéristiques de la plaque, du milieu et de l'état du patient la rupture de la plaque athéromateuse sera asymptomatique ou causera de l'angine stable, de l'angine instable ou des symptômes coronariens aigus (Falk, 1992; Schroeder and Falk, 1995).

1.3.6 Facteurs de risque

L'éthiologie de l'athérosclérose est très complexe. En effet, plusieurs facteurs de risque vont influencer le développement et la gravité de la pathologie. On retrouve tout d'abord les facteurs de risque classique. Parmi les plus importants, on retrouve l'hypercholestérolémie accompagnée d'un rapport LDL/HDL élevé. Comme, il a été

mentionné précédemment, un des premiers évènements dans le développement de l'athérosclérose est l'entrée et la modification du LDL dans la paroi vasculaire. Un taux élevé de LDL sanguin favorisera donc l'accumulation de lipides dans la paroi des vaisseaux. Le HDL de son côté peut reprendre le cholestérol de la paroi et le ramener dans la circulation. On croit également qu'il peut se lier au récepteur scavenger SR-B1 et favoriser la production de NO par les cellules endothéliales. C'est pour ces raisons qu'un faible taux de HDL augmente les risques de développer l'athérosclérose.

Le tabagisme est un autre facteur de risque important puisqu'il augmente le stress oxydatif impliqué dans l'oxydation des LDL en plus de produire des substances proathérogéniques. Ce facteur de risque peut être modifié assez facilement, ce qui n'est pas le cas pour d'autres facteurs de risque dit non modifiables. Parmi ces facteurs, on retrouve l'âge, le genre masculin et les prédispositions familiales (Lowe, 2003; Maas and Boger, 2003). L'inflammation est également un facteur important puisqu'elle est impliquée dans toutes les étapes du développement. On croit également que certains pathogènes comme le Cytomegalovirus Humain ou Chlamydia Pneumonia pourraient accélérer la pathogénèse (Streblow et al., 2001).

Un autre facteur de risque important est l'obésité, caractérisée par un tour de taille et un indice de masse corporelle élevé, car il amène des conditions favorisant l'athérosclérose. Ce facteur est particulièrement inquiétant puisqu'il est sans cesse en progression dans les sociétés industrialisées. Les problèmes liés à l'obésité comme la tolérance au glucose, le diabète de type II, une augmentation du rapport LDL/HDL et l'hypertension artérielle sont tous des conditions favorisant le développement de la pathologie (Lowe, 2003; Maas and Boger, 2003). L'hypertension artérielle est impliquée à plusieurs niveaux comme dans l'activation de l'endothélium dans les phases précoces ainsi que la vulnérabilité de la plaque dans les phases plus tardives. Il a d'ailleurs été démontré que des thérapies antihypertensives à l'aide d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA), ou d'antagonistes du récepteur AT1 (ARA) pouvaient diminuer le développement de l'athérosclérose même chez les patients normotendus. Cette observation

nous a amené à nous intéresser au système rénine-angiotensine (SRA) et à son implication dans le développement de l'athérosclérose.

1.3.7 Le traitement de l'athérosclérose

Le traitement de l'athérose doit comprendre à la fois un aspect pharmacologique et un aspect comportemental. C'est-à-dire qu'un changement vers des habitudes de vie plus saines peut grandement aider à prévenir l'athérosclérose ou à diminuer les risques d'accidents cardiovasculaires. Présentement, les thérapies utilisées visent plus particulièrement les différents facteurs de risque plutôt que le développement de la plaque en elle-même. Tout d'abord, il est important de diminuer l'indice de masse corporelle et l'obésité puisque cette condition est impliquée dans le développement de la majorité des autres facteurs de risques. Une alimentation saine accompagnée d'exercices réguliers seront de mise pour perdre les kilos en trop (Hafidh et al., 2005).

Il est également important de contrôler la résistance à l'insuline, le diabète et l'hyperglycémie chez les patients qui en sont atteint (Lonn and Grewal, 2006). Encore une fois, une diète et la pratique d'exercices permettent de diminuer les risques d'accidents cardiovasculaires. Certains médicaments comme la metformin (un hypoglycémiant oral), le thiazolidinedione et des agonistes du peroxisome proliferator activated-receptor gamma (PPAR- γ), nommé troglitazone, sont également donnés au patient pour contrôler le taux de glucose dans le sang et donc de diminuer les risques associés au diabète (Hafidh et al., 2005). Ce dernier médicament n'est cependant plus disponible commercialement.

Comme il a été mentionné précédemment, un taux de lipide élevé est un facteur de risque très important dans le développement de l'athérosclérose. Il est donc particulièrement important de contrôler l'hypercholestérolimie. Dans ce cas, l'utilisation de statines, des inhibiteurs de la HMG Co-A réductase, est maintenant le premier médicament administré aux patients présentant un niveau de LDL élevé (Lonn and Grewal, 2006). L'utilisation de fibrates, des agoniste du PPAR- γ , peut également permettre

de diminuer le taux de triglycérides tout en augmentant les niveaux de HDL dans le sang. La niacine ou vitamine B3 permet également de diminuer le taux de cholestérol total, le taux de LDL et de triglycérides ainsi que de d'augmenter le taux de HDL. On accompagne souvent la niacine à un traitement aux statines ou aux fibrates. L'huile de poisson riche en acides gras polyinsaturés omega-3 permet de diminuer le taux de triglycérides en stimulant le récepteur du PPAR- α . Dans la majorité des cas, une diète pauvre en cholestérol et en gras saturés sera également prescrite (Hafidh et al., 2005).

L'hypertension est un autre facteur de risque qui doit être traité. Une légère haute pression peut souvent être compensée par un changement des habitudes de vie comprenant une perte de poids, de l'exercice et une diète. Cependant, dans la plupart des cas une aide thérapeutique est nécessaire. Dans le traitement de l'hypertension, l'utilisation de ARA ou de iECA semble préférable aux β -bloqueur puisque les bénéfices sur le développement de l'athérosclérose semblent dépasser ceux s'appliquant à la réhabilitation de la pression artérielle (Candido et al., 2004; Hafidh et al., 2005). Le choix du traitement doit cependant tenir compte de plusieurs facteurs dont les facteurs sociaux économiques et le profil de risques cardiovasculaires du patient (Table I, page 16). De plus, il est important de se rappeler que le traitement anti-hypertensif doit d'abord permettre de retrouver une pression idéale ou normale (Table II, page 17).

Table I : Lignes directrices pour la sélection d'un traitement de l'hypertension (World Health Organization, 1999)

Class of drug	Compelling indications	Possible indications	Compelling contraindications	Possible contraindications
Diuretics	Heart failure Elderly patients Systolic hypertension	Diabetes	Gout	Dyslipidaemia Sexually active males
β -Blockers	Angina After myocardial infarct Tachyarrhythmias	Heart failure Pregnancy Diabetes	Asthma and COPD Heart block ^a	Dyslipidaemia Athletes and physically active patients Peripheral vascular disease
ACE inhibitors	Heart failure Left ventricular dysfunction After myocardial infarct Diabetic nephropathy		Pregnancy Hyperkalaemia Bilateral renal artery stenosis	
Calcium antagonists	Angina Elderly patients Systolic hypertension	Peripheral vascular disease	Heart block ^b	Congestive heart failure ^c
α -Blockers	Prostatic hypertrophy	Glucose intolerance Dyslipidaemia		Orthostatic hypotension
Angiotensin II antagonists	ACE inhibitor cough	Heart failure	Pregnancy Bilateral renal artery stenosis Hyperkalaemia	

^aGrade 2 or 3 atrioventricular block. ^bGrade 2 or 3 atrioventricular block with verapamil or diltiazem. ^cverapamil or diltiazem. ACE, angiotensin converting enzyme.

**Table II : Définition et classification des valeurs de pression artérielle en mmHg
(World Health Organization, 1999)**

Category	Systolic	Diastolic
Optimal	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
High-normal	130–139	85–89
Grade 1 hypertension (mild)	140–159	90–99
Subgroup: borderline	140–149	90–94
Grade 2 hypertension (moderate)	160–179	100–109
Grade 3 hypertension (severe)	≥ 180	≥ 110
Isolated systolic hypertension	≥ 140	< 90
Subgroup: borderline	140–149	< 90

When a patient's systolic and diastolic blood pressures fall into different categories, the higher category should apply.

L'aspirine ou d'autres agents anti-plaquettaires plus puissants sont également fréquemment utilisée pour diminuer les risques de formation de caillots chez les patients ayant déjà eu un accident cardiovasculaire ou chez ceux présentant plusieurs facteurs de risque (Lonn and Grewal, 2006). L'arrêt du tabagisme est fortement souhaitable et une aide thérapeutique peut être indiquée chez certains fumeurs. Il a également été démontré qu'une diète de type méditerranéenne riche en antioxydants et en omega-3 permet de diminuer le développement de l'athérosclérose et les risques d'accidents cardiovasculaires même chez les patients présentant plusieurs facteurs de risques (De Caterina et al., 2006).

1.4 Le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine (SRA) contrôle l'équilibre hydro-électrolytique ainsi que la pression artérielle. Il a été intensivement étudié depuis la découverte de la rénine par Tigerstedt and Bergmann in 1898. Vers les années 1950, on a découvert que l'angiotensine II (Ang II) était produite par ce système. Cependant, les chercheurs se sont rendus compte rapidement que certains effets de l'Ang II ne pouvaient être expliqués par le SRA conventionnel. On a alors découvert qu'il existait également une production tissulaire ou local d'Ang II en plus du système circulant connu. Les lignes qui suivent expliqueront la différence entre les deux systèmes et leurs effets.

1.4.1 Le système circulant

Le système circulant a été le premier à être découvert et c'est à lui qu'on associe les effets physiologiques de l'AngII sur l'équilibre hydro-électrolytique ainsi que sur la pression artérielle. Lorsque l'osmolarité plasmatique ou la pression artérielle diminue, les cellules juxta-glomérulaire de l'artériole glomérulaire afférente libèrent de la rénine dans la circulation sanguine. La rénine peut alors cliver l'angiotensinogène, une globuline plasmatique produite par le foie, en angiotensine I. Celle-ci sera alors clivée en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) au niveau de l'épithélium capillaire de plusieurs tissus, mais particulièrement au niveau des poumons. L'Ang II provoque alors la vasoconstriction des vaisseaux en permettant la contraction des CMLV. De plus, elle amène la production d'aldostérone par le cortex surrénal. L'aldostérone permet de son côté la réabsorption des ions sodium dans les tubules rénaux. La réabsorption d'ions sodium permet ensuite la réabsorption de l'eau ce qui augmente le volume sanguin. Le résultat net de la vasoconstriction et de l'augmentation du volume sanguin sera donc une élévation de la pression artérielle. Une fois l'homéostasie rétablie, la production de rénine est normalisée pour éviter la création d'une hypertension (Marieb, 1999).

1.4.2 Le système tissulaire

Contrairement au SRA circulant, le SRA tissulaire est davantage associés à la physiopathologie. En effet, il y a rarement un dérèglement du système circulant. L'hypertension essentielle, caractérisée par un niveau de rénine élevé, peut aussi être causé par une augmentation de l'activité du SRA tissulaire tout comme l'athérosclérose et le diabète (Lilly, 2003). On le retrouve dans plusieurs tissus comme le cœur, le système nerveux, la peau, les organes digestifs, sensoriels, adipeux et reproductifs et de façon plus importante dans les vaisseaux sanguins. Ce système n'est pas parfaitement compris encore aujourd'hui. Par exemple, la présence de rénine dans le système tissulaire a encore besoin d'être éclairci. Cependant on retrouve, l'ECA et la chymase pouvant cliver l'angiotensine I en Ang II. (Miyazaki and Takai, 2006; Paul et al., 2006)

1.5 Pharmacologie des récepteurs de l'angiotensine II

Les nombreuses recherches portant sur l'Ang et ses récepteurs ont permis d'identifier trois métabolites actifs de l'Ang II nommés Ang 1-7, Ang 2-8 ou Ang III et Ang 3-8 ou Ang IV ainsi que quatre récepteurs pouvant potentiellement lier l'Ang ou ces métabolites. Les deux récepteurs principaux de l'Ang II sont les récepteurs AT₁ et AT₂ (AT₁R et AT₂R). Bien que les principaux effets connus de l'Ang II soient associés à AT₁R, on découvre de plus en plus d'activités semblant découler de l'activation de AT₂R par l'Ang II. La régulation, l'activation et les fonctions des AT₁R et AT₂R seront discutées plus largement dans les paragraphes suivants. Deux autres récepteurs potentiels, nommés récepteurs AT₃ et AT₄ (AT₃R et AT₄R), partagent les caractéristiques opérationnelles des AT₁R et AT₂R quant à leur affinité et sélectivité pour les agonistes et antagonistes. AT₃R est un site de liaison qui a d'abord été découvert dans les cellules de neuroblastomes de souris neuro-2a. Il a une faible affinité pour l'Ang III et n'est bloqué ni par les antagonistes de AT₁R et AT₂R, ni par les analogues du GTP. Des informations supplémentaires seront nécessaires pour définir s'il s'agit vraiment d'un nouveau récepteur de l'Ang. AT₄R quant à lui, lie l'Ang IV. Ces propriétés et caractéristiques physiologiques sont suffisantes pour le nommer récepteur de l'angiotensine mais il existe bien peu d'informations sur son rôle et son mode d'activation. Tout ce que je mentionnerai ici, c'est qu'on le retrouve principalement dans les régions du cerveau associées aux fonctions cognitives, motrices et sensorielles. Ces fonctions seraient reliées à l'acquisition de la mémoire, la régulation de la pression artérielle, l'inhibition de la réabsorption sodique rénale et à l'hypertrophie cardiaque (de Gasparo et al., 2000).

1.5.1 Le récepteur AT₁

Le AT₁R est un récepteur à sept passages transmembranaires aussi nommé récepteur couplé aux protéines G (GPCR). On reconnaît à AT₁R tous les effets connus de l'Ang II au niveau cardiovasculaire, rénal, neuronal, endocrine et hépatique.

1.5.1.1 La structure du récepteur AT₁

Le AT₁R contient 359 acides aminés. La région extracellulaire, composée de la partie N-terminal ainsi que trois boucles extracellulaires, contient 3 sites de N-glycosylation et 4 résidus cystéines. Les cystéines de la première boucle et de la deuxième boucle forment un premier pont disulfides. Le deuxième pont disulfides se situe entre le N-terminal et la troisième boucle extracellulaire. Ils maintiennent la conformation du récepteur en plus de le rendre susceptible à l'inactivation par certains agents réducteurs. Ce deuxième pont n'est pas présent sur le récepteur AT₂R. La région cytoplasmique, quant à elle, est composée de trois boucles intracellulaires et de la partie C-terminal. Elle contient des sites consensus pour la phosphorylation par des kinases sérine/thréonine comme la protéine kinase C (PKC) et les kinases GPCR (GRK). Chez le rat et la souris, on retrouve deux sous-types de ce récepteur nommés AT_{1A} et AT_{1B} (AT_{1A}R et AT_{1B}R) provenant de deux gènes ayant une homologie de séquence de 95%. Leurs propriétés de liaison et fonctionnelles sont très similaires. Les différences se situent au niveau de leur distribution tissulaire, de leur localisation chromosomique, de leur structure génomique et de leur régulation transcriptionnelle (de Gasparo et al., 2000).

1.5.1.2 Le récepteur AT_{1A} et AT_{1B} chez le rat

Les AT₁R chez le rat sont exprimés dans les glandes surrénaliennes, les reins, le foie, le cœur, l'aorte, les poumons, les testicules, la glande pituitaire et le cerveau. La forme AT_{1A}R est principalement exprimée dans tous les tissus sauf les glandes surrénales et dans l'hypophyse. L'expression du AT_{1A}R est hautement stimulée par les glucocorticoïdes grâce aux trois éléments de réponses aux glucocorticoïdes situés dans la région promotrice du gène. L'estrogène régule aussi l'expression des sous-types du AT₁R. Dans l'hypophyse, l'estrogène augmente l'expression de AT_{1B}R mais pas de AT_{1A}R alors que dans les CMLV, une privation d'estrogène augmente l'expression de AT_{1A}R. D'autres hormones contrôlent l'expression des AT₁R. L'insuline augmente l'expression des AT₁R grâce à une augmentation de la stabilité de l'ARNm. Les hormones de croissances, autre que IGF-1, augmentent spécifiquement AT_{1A}R sans avoir d'effet sur la régulation AT_{1B}R.

Finalement, Le NO réduit l'expression de $AT_{1A}R$ dans les CMLV indépendamment des changements au niveau du GMP cyclique (de Gasparo et al., 2000).

1.5.1.3 Le récepteur AT_1 humain

La séquence du AT_1R chez l'homme a 95% d'homologie avec celle du rat. Il y a deux isoformes de ce gène chez l'homme dues à une différence dans l'épissage alternatif du gène. La forme un peu plus longue se retrouve faiblement exprimée dans les tissus. Elle semble cependant mieux s'exprimer à la membrane plasmique dans les modèles de transfection. Néanmoins, aucune évidence n'existe sur une différence physiologique possible entre les deux formes du gène. Peu de choses sont connues jusqu'à maintenant sur la régulation de l'expression du AT_1R chez l'Homme (de Gasparo et al., 2000).

1.5.1.4 Les souris AT_1R knock-out

L'utilisation de souris knock-out a aidé à définir le rôle physiologique du SRA au niveau de la régulation cardiovasculaire, de la balance hydro-électrolytique et du développement. Les souris ayant subies une délétion pour les gènes de l'angiotensinogène ($Agt^{-/-}$) et de ACE ($ACE^{-/-}$) souffre d'hypotension, d'anormalité du développement rénale et ont une espérance de vie réduite. De plus, les souris mâle $ACE^{-/-}$ présentent une perte de fertilité.

Les souris ayant le gène $AT_{1A}R$ délétées ($AT_{1A}R^{-/-}$) présentent également un défaut dans la régulation la pression artérielle et dans la réponse hyper/hypotension induite par l'injection d'Ang II. Elles présentent également une faible diminution de la survie et des problèmes de développement rénal. Une étude utilisant les souris $AT_{1A}R^{-/-}$ traitées à l'Énalapril présentaient une hausse de pression dose dépendante lors de l'injection d'Ang II. L'élévation de pression était tout de même plus faible qu'avec des souris de type sauvage et était prévenue par l'utilisation d'un ARA. Cette expérience mettait en évidence

l'importance du AT_{1B}R dans la régulation de la pression artérielle et son effet compensatoire en cas de défaut du gène du AT_{1A}R. Les souris doubles knock out présentaient d'ailleurs une hypotension beaucoup plus importante ainsi que des problèmes de croissance et des anomalies structurales et fonctionnelles des reins sévères.

L'étude sur le rôle du AT₁R dans l'homéostasie sodique a été effectuée à partir de souris AT_{1A}R^{-/-}. Ces souris démontraient des baisses de pression lors du régime pauvre en sel et une balance sodique négative. Ceci était dû à un défaut dans la concentration sodique urinaire et une hypotonie dépendante de l'incapacité du rein à garder un gradient sodique maximal lors de la privation de sel. Le niveau d'aldostérone augmentait normalement sûrement à cause de la présence du AT_{1B}R. L'hypotension observée chez les souris AT_{1A}R^{-/-} est donc due à une déficience sodique et une baisse du volume sanguin (de Gasparo et al., 2000).

1.5.1.5 La signalisation du récepteur AT₁

L'activation du récepteur AT₁ amène une panoplie de réponses séparées dans le temps que l'on dit immédiates, précoces ou à long terme. La première étape consiste à un changement conformationnel qui permet à AT₁R d'interagir avec une protéine G hétérotrimérique composée de trois sous-unités nommées α , β et γ . Il existe plusieurs sous-unités α mais celle qui s'associe le plus souvent à AT₁R et qui est responsable de la majorité des effets physiologiques est α_q .

Les événements immédiats (Figure 3, page 23) sont principalement impliqués dans la contraction musculaire. On retrouve dans cette catégorie d'événements, la stimulation de la phospholipase C (PLC). La PLC- β est activée par la protéine G_q alors que la PLC- γ est activée suite à une phosphorylation par les protéines kinases (Kaschira and Unger, 2003; Touyz and Schiffrin, 2000). L'activation de la PKC amène l'hydrolyse de la phosphatidylinositol pour permettre la production de deux seconds messagers le diacylglycérol (DG) et l'inositol 1, 4, 5-tris-phosphate (IP₃). Le DG active les isoformes

α , β_1 , β_{11} , γ de la protéine kinase C, alors que l'IP3 permet la relâche de Ca^{2+} en se liant au récepteur à l'IP3 sur le réticulum endoplasmique (Griendling et al., 1997). Le DG peut aussi être formé suite à l'activation de la phospholipase D (PLD) qui permet l'hydrolyse de la phosphatidylcholine en acide phosphatidique et en choline (Kaschina and Unger, 2003; Touyz and Schiffrin, 2000). Un autre évènement immédiat qui est observé suite à l'activation de AT1R est la phosphorylation et l'activation de la kinase Src. L'activation de Src est impliquée dans la phosphorylation de la PLC- γ et la formation de DG (Kaschina and Unger, 2003; Touyz and Schiffrin, 2000). Dans plusieurs tissus, l'Ang II peut aussi permettre la liaison d'une protéine G_i au AT₁R ce qui inhibe la formation adénylate cyclase.

Les évènements précoces (Figure 3, page 23) sont quant à eux associés à la contraction musculaire ainsi qu'à plusieurs voies de signalisation impliquées dans la croissance et la migration cellulaire, la déposition de MEC et la production de facteur de croissance. Parmi ces évènements, on retrouve la phosphorylation et l'activation de tyrosines kinases. Comme mentionné précédemment, il y a l'activation de la PLC- γ et de Src qui sont des évènements immédiats, mais on retrouve également l'activation des janus kinases (JAK), de la tyrosine kinase riche en proline (PYK) et de la PI3 kinase quelques minutes après la stimulation de AT₁R (Hunyady and Catt, 2006; Kaschina and Unger, 2003). La phosphorylation de JAK permet l'activation de la voie JAK/STATet ainsi la transcription de gènes précoces impliqués dans dans la croissance et le remodelage cardiaque et vasculaire. L'activation de PYK est dépendante de l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et permettra par la suite l'activation de c-Src.

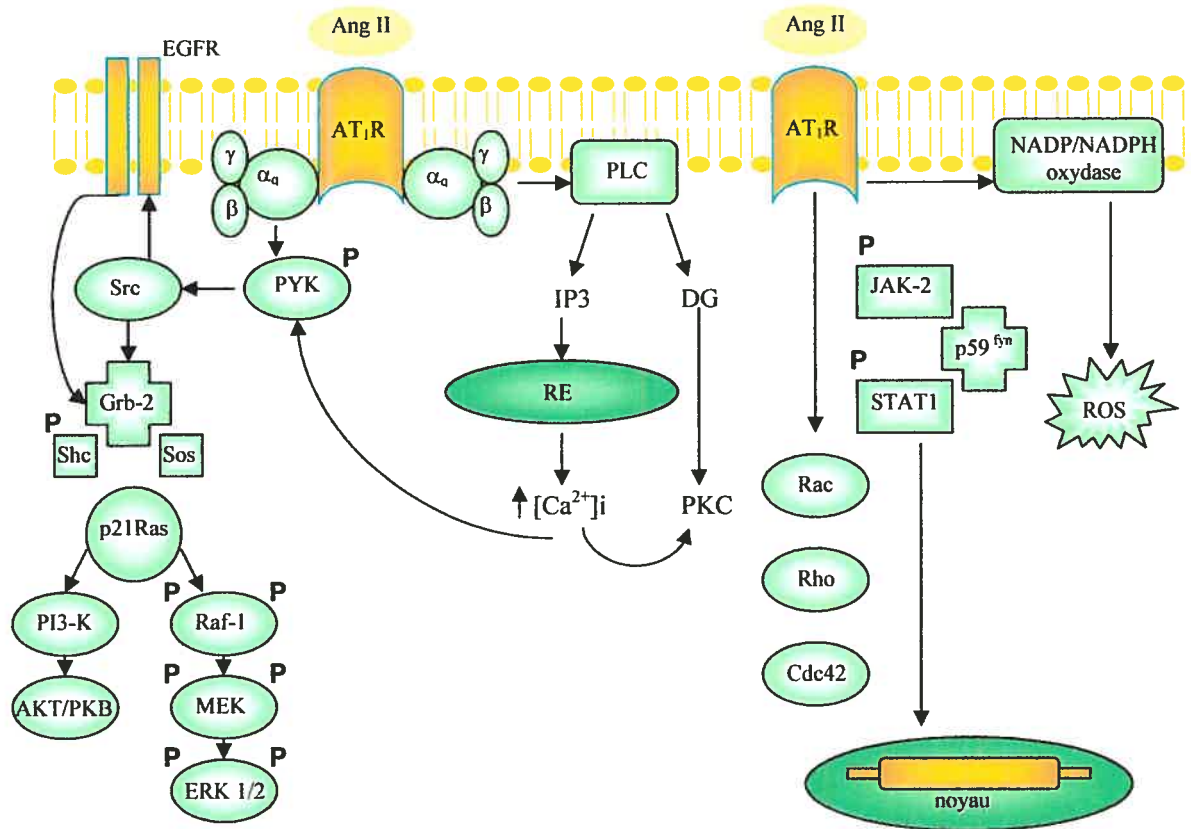


Figure 3 : Signalisation du récepteur AT1 dans les CMLV

Par la suite, c-Src phosphoryle Shc et permet la formation du complexe Shc/Grb2/Sos. Grb2 est associé à Sos, un facteur d'échange de nucléotide guanylique, ce qui active la petite protéine G p21Ras suite à l'échange d'un GDP pour un GTP. Le p21RAS-GTP active deux kinases. Dans un premier temps, elle active la PI3-K impliquée dans la voie PI3-K/AKT. Dans un deuxième temps, elle active une mitogen/activated protein kinase, kinase, kinase (MAPKKK) nommé RAF-1 permettant l'activation de la voie MEK/ERK 1/2 (Hunyady and Catt, 2006). L'activation de cette voie est associée à la croissance, l'apoptose ainsi que la différenciation et la transformation.

Parmi les autres évènements précoces, on retrouve l'activation de la PLA₂ la formation d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires (Touyz and Berry, 2002). Selon le type de sous-unité α qui s'associe au AT1R, il y aura également soit

augmentation des niveaux d'AMPc, s'il s'agit d'une sous-unité α_q via l'activation d'une adénylate cyclase Ca^{2+} -sensible ou de la calcineurine, ou une diminution des niveaux AMPc, s'il s'agit d'une α_i via la diminution adénylate cyclase (Hunyady and Catt, 2006; Kaschina and Unger, 2003).

Les évènements à long terme (Figure 3, page23) reliés à l'activation du récepteur AT1 sont responsables du contrôle à long terme de la croissance, de l'adhésion et de la migration cellulaire, du dépôt de la MEC dans les vaisseaux et le cœur. Ces effets seraient donc impliqués dans les changements chroniques observés lors du remodelage vasculaire, de l'hypertrophie cardiaque et de l'athérosclérose. L'augmentation de la production d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) suite à l'activation Ang II-dépendante de la NADH / NADPH oxydase est l'un des évènements soutenus observés (Hunyady and Catt, 2006).

De plus, l'Ang II peut également permettre une transactivation du récepteur à l'EGF (Figure 3, page 23). Cette transactivation nécessite la phosphorylation Ca^{2+} -dépendante du récepteur à l'EGF. L'activation subséquente de Ras permet ensuite l'activation des voies PI3-kinase/AKT et Raf-1/MEK/ERK1/2 (Eguchi et al., 1998). Le récepteurs à l'IGF-1 est également transactivé par l'Ang II permettant l'activation de la voie PI3-kinase/AKT mais pas celle des MAPK (Zahradka et al., 2004).

1.5.1.6 La désensibilisation et internalisation du récepteur AT₁

Suite à son activation, le AT₁R subit une désensibilisation et une internalisation rapide. En fait, dans la majorité des lignées cellulaires, 50% des récepteurs sont internalisés 10 minutes après la stimulation à l'Ang II (Hein et al., 1997). Le rôle et le mode d'internalisation du AT₁R ne sont pas bien connus pour le moment. On sait cependant, que la liaison de l'Ang II cause un changement conformationnel du AT₁R, ce qui permet le recrutement des protéines G. La liaison des protéines G mène à l'activation de plusieurs effecteurs et voies de signalisation. Cependant, pour éviter une réponse démesurée, AT₁R, comme les autres GPCR, va subir une désensibilisation. Tout d'abord, il

y aura découplage des protéines du récepteur. Cet évènement très rapide dépend de la phosphorylation du récepteur par la PKA et la PKC ou par la kinase des récepteurs couplés aux protéines G (GRK). La phosphorylation par la GRK permet de créer un site de haute affinité pour le recrutement de la β -arrestine, qui prévient le recouplage des protéines G au récepteur. Ensuite, la β -arrestine interagit avec la protéine adaptatrice 2 (AP-2) et des protéines de clathrine pour former des vésicules de clathrine. C'est via l'association aux vésicules de clathrine que AT₁R sera internalisé (Claing et al., 2002). Une fois internalisé, il semble que le récepteur continue à induire une signalisation intracellulaire. Dans ce cas, la β -arrestine pourrait jouer un rôle de protéine adaptatrice pour recruter certains complexes protéiques impliqués dans différentes voies de signalisation comme celle des MAP kinases (Hunyady et al., 2000). Une fois internalisé, le récepteur associé à son ligand se retrouve dans les endosomes. L'acidité de l'endosome favorise un autre changement conformationnel au cours duquel le récepteur est déphosphorylé par des phosphatases et recyclé vers la membrane plasmique. De son côté, l'Ang II va plutôt se retrouver dans les lysosomes pour être dégradée. L'internalisation a donc dans un premier temps, un rôle de contrôle de l'expression du récepteur en régulant la désensibilisation et le recyclage du AT₁R. Dans un deuxième temps, l'internalisation peut également permettre l'activation de voies de signalisation comme celle des MAPK en recrutant ERK 1/2 (Hunyady et al., 2000).

1.5.2 Le récepteur AT₂

Contrairement au AT₁R, le AT₂R est connu mais peu caractérisé. Pour le moment, on lui attribue principalement des effets contraires au AT₁R bien que plusieurs nouvelles fonctions lui sont découvertes. Le AT₂R est très différent du AT₁R tant au niveau de l'expression et de la signalisation que de la diversité des formes retrouvées. En effet, bien que le AT₂R fait partie de la famille des GPCR tout comme le AT₁R, il n'a que 32% d'homologie avec ce récepteur (de Gasparo et al., 2000).

On le retrouve dans une grande variété de tissu. Au niveau de la surrénale et du cœur, son expression demeure stable après la naissance. Cependant, dans la majorité des

tissus, son expression tend à diminuer après la naissance alors que lors d'une lésion, son expression est régulée à la hausse. Cette observation a permis de lui découvrir un rôle antiprolifératif dans plusieurs tissus ainsi qu'un rôle dans la différenciation cellulaire, la régénération des nerfs et l'apoptose (de Gasparo et al., 2000). Pour le moment, les fonctions qui lui sont attribuées sont principalement de contrecarrer les effets du AT₁R et ainsi assurer une protection contre l'hypertension artérielle. Les effets de la disruption du gène AT₂R sont cependant contreversés. En effet, selon Ichiki et al., les souris nulles pour le gène AT₂R présentent une élévation de la pression artérielle ainsi qu'une sensibilité accrue aux effets tenseurs de l'Ang II, alors que, selon Hein et al., la pression basale des souris nulles pour le gène AT₁R est normale mais leur réponse aux effets presseurs de l'AngII se retrouve augmentée (Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995). L'effet protecteur du AT₂R pourrait alors impliquer le blocage des effets du AT₁R soit en diminuant son expression ou en stimulant la production de bradykinine rénale ou de GMPc. On a également découvert que les souris AT₂R -/- présentaient des changements comportementaux, des anomalies congénitales du tractus urinaire et des problèmes rénaux fréquents. De plus, l'étude de ces souris a démontrées un rôle au niveau de la différenciation des CMLV et de la neovascularisation (Carey, 2005).

Plusieurs voies de signalisation sont induites suite à l'activation du AT₂R mais peu d'entre elles sont caractérisées. Parfois, le récepteur va se coupler à une protéine G_i. Dans les neurones, elle pourra ensuite activer des protéines sérine/thréonine phosphatase PP2A permettant l'ouverture d'un canal potassique et une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Le AT₂R permet également l'activation de protéines phosphotyrosines phosphatases (PPTases) impliquées dans la prévention et l'arrêt rapide d'une croissance cellulaire incontrôlée ou non désirée. De plus, contrairement au AT₁R, l'activation du AT₂R ne mène pas à une désensibilisation et une internalisation. Le mécanisme impliqué n'est cependant pas connu (de Gasparo et al., 2000). Au niveau des vaisseaux sanguins, le AT₂R ne représente que 10% de tous les récepteurs à l'Ang II. Il se situe principalement à la surface des cellules endothéliales et des CMLV. Il ne semble pas régulé à la hausse dans le cas de pathologies comme l'athérosclérose (Schmidt-Ott et al., 2000).

1.6 Rôles pro-inflammatoires de l'angiotensine II dans le développement de l'athérosclérose

L'Ang II est bien connu pour son action sur la pression artérielle, la balance électrolytique, la sécrétion d'aldostérone, la réabsorption sodique rénale, la sensation de soif, l'activité sympathique et la relâche de vasopressine. Cependant, la production d'Ang II via le SRA local est responsable de plusieurs effets pouvant causer l'athérosclérose. Elle va influencer plusieurs facteurs de risques en plus d'avoir des actions directes sur le développement de la pathologie. Tout d'abord, l'Ang II peut provoquer une hypertension artérielle, un facteur de risque très important. Cependant, les effets vont bien au-delà de l'hypertension. En effet, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontrées qu'il y avait un lien entre l'Ang II et l'athérosclérose indépendamment de son action sur la pression. En fait, l'octapeptide serait impliqué dans toutes les phases du développement de la pathologie allant de l'initiation à la rupture de la plaque.

C'est l'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) et des antagonistes du récepteur de l'angiotensine (ARA) qui a d'abord permis de faire le rapprochement entre le SRA et l'athérosclérose. En effet, on a remarqué que l'utilisation de ces médicaments permettait de prévenir et retarder le développement de l'athérosclérose indépendamment de leur effet sur la pression artérielle (Candido et al., 2004; Ferrario et al., 2004). Des études, portant sur le développement de l'athérosclérose induit par le diabète chez des souris nulles pour les gènes de l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}), ont démontrées que l'utilisation d'un ARA, l'Irbesartan, supprimait le développement de l'athérosclérose. Plusieurs paramètres étaient touchés dont : la taille et la sévérité des plaques, le contenu en collagène, l'expression du récepteur AT₁, l'infiltration de monocytes/macrophages, la prolifération des CMLV ainsi que l'expression des molécules d'adhésion, chimiokines et facteurs de croissance (Candido et al., 2004). D'autres études sur des souris ApoE^{-/-} et AT₁^{-/-} ont permis de démontrer que l'activation du récepteur AT₁ augmentait la pression artérielle, la formation de plaques athéromateuses, la dysfonction endothéliale ainsi que le stress oxydatif vasculaire (Wassmann et al., 2004). Ces exemples

illustrent bien l'implication de l'Ang II dans toutes les étapes du développement de la pathologie.

Tout d'abord, l'Ang II participe à la dysfonction endothéliale qui est l'un des premiers événements de la pathologie. En effet, elle permet d'augmenter le stress physique par son effet sur la pression artérielle, ce qui va activer l'endothélium. L'Ang II augmente la contraction entre autre en augmentant la production d'endothéline par les cellules endothéliales empêchant ainsi la vasodilatation. De plus, elle induit un stress oxydatif caractérisé par l'activation de la NADP/NADPH oxydase et une augmentation de la production de radicaux superoxydes (O_2^-). Les ions O_2^- vont réagir avec le NO, et donc vont l'inactiver, pour former du peroxynitrite. Cela aura comme conséquences encore une fois de diminuer la capacité de relaxation du vaisseau (Hunyady et al., 2000). Elle va également induire l'expression de molécules adhésion par les cellules endothéliales comme le VCAM-1 et ICAM-1 ainsi que la production de chimiokines comme MCP-1 par les CMLV et les cellules endothéliales, ce qui favorise l'infiltration de monocytes/macrophages (Ferrario et al., 2004).

Bien que l'Ang II n'influence pas le niveau de lipides circulants, on retrouve une forte synergie entre les lipides et l'Ang II dans la paroi vasculaire. En effet, on a observé que l'Ang II favorise la rétention, l'oxydation et la phagocytose des lipides et que les lipides oxydés favorisaient l'expression du récepteur AT_1 dans les CMLV et les macrophages créant ainsi une boucle d'activation (Kon and Jabs, 2004). Le peptide va influencer à plusieurs niveaux l'accumulation, l'oxydation et la formation de cellules spumeuses. D'abord, l'Ang II, en participant à la dysfonction endothéliale et à la production de chimiokines et de molécules d'adhésion, va favoriser l'accumulation de macrophages dans la paroi du vaisseau (Schmidt-Ott et al., 2000). De plus, elle augmente le stress oxydatif ainsi que l'expression des récepteurs LOX-1 à la surface des macrophages, des CMLV et des cellules endothéliales. Ceci favorise l'oxydation des lipides et l'incorporation des ox-LDL par les macrophages et les CMLV ainsi que l'apoptose ou la croissance des CMLV et des cellules endothéliales (Ferrario et al., 2004;

Schmidt-Ott et al., 2000). L'expression du récepteur CD-36 est également régulée à la hausse chez les macrophages ce qui encore une fois favorise l'incorporation de ox-LDL et la formation de cellules spumeuses (Nicholson and Hajjar, 2004). L'Ang II est aussi associée à une diminution de l'efflux de cholestérol par les macrophages mais le mécanisme n'est pas connu pour le moment (Schmidt-Ott et al., 2000). Finalement, l'Ang II favorise la rétention des LDL dans la paroi vasculaire en augmentant la synthèse de protéoglycanes par les CMLV.

L'augmentation du stress oxydatif a plusieurs conséquences sur le développement de l'athérosclérose. Comme mentionné auparavant, il augmente la dysfonction endothéliale et l'oxydation des lipides. L'Ang II contribue à l'augmentation du stress oxydatif principalement en stimulant l'activité de la NADP(H)-oxydase dans les membranes des CMLV et des cellules endothéliales. Dans les macrophages, elle stimule à la fois l'activité de la NADP(H)-oxydase et de la lipoxigénase. Les ROS vont influencer plusieurs voies de signalisations. Par exemple, l'Ang II peut activer JNK, p38 MAP kinase, ERK1/2, ERK-5, les métalloprotéinases de matrice (MMP), NF- κ B et AP-1 de façon ROS-dépendante (Hunyady and Catt, 2006). Ces voies vont ensuite participer au développement de la maladie en agissant principalement sur les CMLV, la production de facteur de croissance, la MEC et l'apoptose.

Dans le développement de l'athérosclérose, les phases plus avancées sont caractérisées par l'hypertrophie, la migration et la prolifération des CMLV. L'Ang II est connue pour agir comme facteur de croissance sur ces cellules en stimulant la synthèse protéique et l'hypertrophie. Comme je l'ai mentionné, les ROS vont avoir un rôle direct à jouer en activant certaines voies de signalisation comme MAPK p38 et ERK 1/2. D'autre part, la production de facteurs de croissance comme le TGF- β , le PDGF, l'IGF-1, le bFGF et le HB-EGF dans la paroi vasculaire par l'Ang II accélère également la migration et la prolifération des CMLV. Les changements au niveau de la composition de la MEC sont également impliqués dans la migration des CMLV. En conditions normales, la laminine contenue dans la membrane basale du vaisseau favorise le stade contractile des CMLV au

lieu du stade synthétique. Cependant, en conditions athérosclérotiques, la synthèse des composantes de la membrane basale est inhibée alors que la synthèse de fibronectine, de collagène et d'élastine est stimulée. L'Ang II participe à ces changements en induisant la production de fibronectine et de tenascine, une protéine qui inhibe l'attachement des CMLV à la fibronectine, par les CMLV. Les recherches démontrent que ces changements permettent la prolifération, la migration et la synthèse de facteur de croissance par les CMLV de façon Ang II-dépendante (Schmidt-Ott et al., 2000).

L'Ang II agit également dans les phases tardives de la pathologie en stimulant l'apoptose des cellules endothéliales et la coagulation. Dans un premier temps, l'induction de l'apoptose par l'Ang II est médiée par les ROS qui augmentent le rapport Bax/Bcl-2 (Schmidt-Ott et al., 2000). De plus, dans les cellules endothéliales, l'Ang II agit directement sur l'augmentation de la déphosphorylation et donc la dégradation de Bcl-2 ainsi que sur l'activation des caspases. Indirectement, l'augmentation Ang II-dépendante de la synthèse des oxLDL et de l'expression du récepteur LOX favorise l'apoptose des cellules épithéliales. Ceci aura pour conséquence de déstabiliser l'endothélium et de favoriser la vulnérabilité de la plaque athéromateuse (Schmidt-Ott et al., 2000). Pour ce qui est de la coagulation, l'Ang II agit sur deux voies principalement. Tout d'abord, le peptide induit la synthèse du facteur tissulaire (TF) par les cellules endothéliales, les macrophages et les CMLV. Le TF est une glycoprotéine transmembranaire qui lie le facteur VII activé, ce qui initie la coagulation. De plus, l'Ang II diminue l'activité fibrinolytique dans la plaque athéromateuse en augmentant l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) non seulement au niveau de l'endothélium mais également dans la néointima. Le déséquilibre entre la coagulation et la fibrinolyse serait impliquée dans les manifestations cliniques de l'athérosclérose (Kon and Jabs, 2004).

Il est connu que l'inflammation est un facteur important dans l'initiation et le développement de l'athérosclérose. Hors, l'Ang II est maintenant reconnu comme un peptide pouvant avoir des effets pro-inflammatoires. Dans le cadre du développement de la pathologie, l'Ang II agit à plusieurs niveaux. Tout d'abord, l'Ang II via le SRA local de la

moelle osseuse augmente la production de leucocytes circulants ayant un phénotype proathérogénique (Ferrario and Strawn, 2006). De plus, elle agit sur la perméabilité vasculaire en induisant la synthèse de prostaglandines et de VEGF par les CMLV. Elle permet également la phosphorylation en tyrosine de molécules du cytosquelette comme la paxilline. La phosphorylation cause un réaménagement du cytosquelette et des jonctions cellules-cellules et par le fait même augmente la perméabilité vasculaire (Suzuki et al., 2003).

L'Ang II peut aussi agir directement sur les cellules du système immunitaire en agissant comme facteur chimioattractant, en augmentant la phagocytose des macrophages et en induisant la prolifération des cellules immunitaires dans la paroi vasculaire. Le peptide va également agir de façon indirecte en induisant l'expression de molécules d'adhésion, de chimiokines et de cytokines comme expliqué précédemment. Il y aura formation d'une boucle d'amplification puisque l'Ang II favorise la transformation de monocytes en macrophages qui se mettent alors à exprimer davantage de récepteur AT₁ et AT₂ ainsi qu'un SRA actif (Ruiz-Ortega et al., 2001).

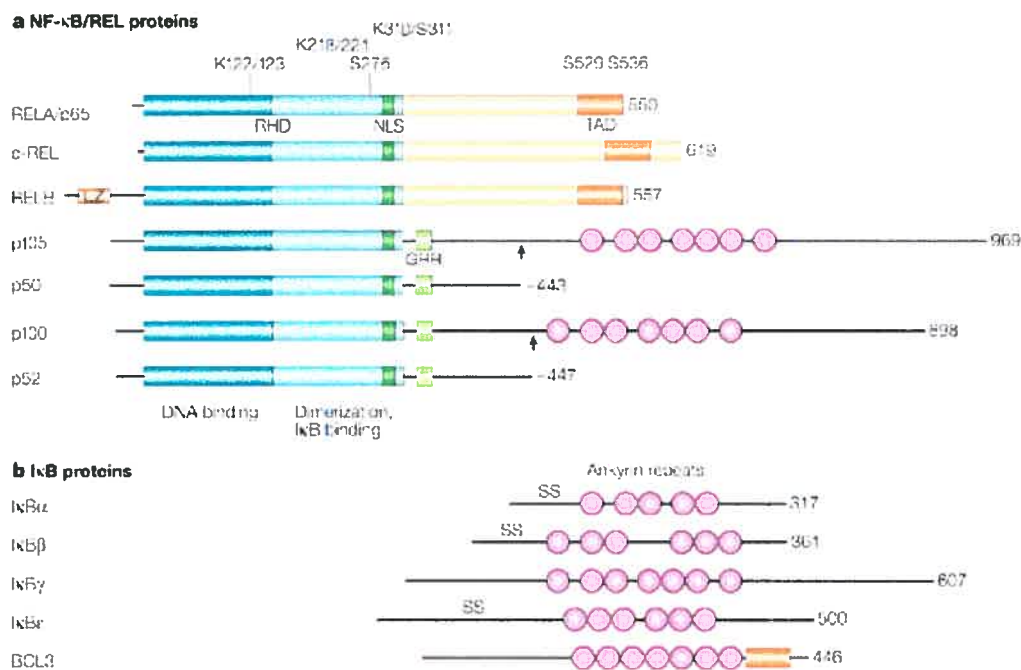
Finalement, que ce soit par une augmentation de l'expression des molécules d'adhésions, des chimiokines ou des facteurs de croissances, l'explication moléculaire des effets proinflammatoires de l'Ang II se retrouve au niveau de l'activation des facteurs de transcription. En effet, l'Ang II active plusieurs facteurs de transcription comme l'AP-1, la famille des facteurs de transcription STAT et le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B). Le facteur de transcription NF- κ B est particulièrement important puisqu'il contrôle plusieurs gènes proinflammatoires comme des cytokines, des chimiokines, des molécules d'adhésion, la NO synthase, la cyclooxygénase-2 (COX-2) et l'angiotensinogène. Les effets dépendent surtout de la voie AT₁/NF- κ B mais la voie AT₂/NF- κ B peut également être impliquée entre autre dans la production du regulated upon activation : T-cell expressed / secreted (RANTES), de NO et de COX-2. (Suzuki et al., 2003).

1.7 Le facteur de transcription NF-kappaB

Comme mentionné plus tôt, NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans le développement de l'athérosclérose. Les sections qui suivent serviront à décrire NF- κ B, ces fonctions ainsi que ces différents modes d'activation.

1.7.1 Description

Le facteur de transcription NF- κ B fait partie de la famille des protéines Rel (Figure 4, page 34). Les cinq membres de cette famille sont nommés : p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) et p52/p100 (NF- κ B2). On le retrouve habituellement sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère. La forme la plus souvent retrouvée est cependant l'hétérodimère formé des sous-unités p65 et p50. Cette famille contient un domaine d'homologie Rel (DHR) dans la région N-terminale de la protéine. Ce domaine, de 300 acides aminés conservés, permet la dimérisation entre les membres de la famille Rel, l'interaction avec l'inhibiteur I κ B et la liaison à l'ADN. P65, RelB et c-Rel contiennent aussi un domaine de transactivation (TAD) du côté C-terminal qui leur permettent d'interagir avec des composantes de l'appareil de transcription basal comme la TATA-binding protein (TBP), le facteur de transcription IIB (TFIIB) et les co-activateurs CBP et p300. De leur côté, p50/p105 et p52/p100 n'ont pas de TAD mais contiennent une région riche en glycines qui est importante pour la maturation post-traductionnelle de p105 et p100 en p50 et p52 respectivement. On retrouve également dans le DHR un signal de localisation nucléaire (NLS) qui lorsqu'il n'est caché pas par un inhibiteur de NF- κ B favorise sa présence dans le noyau (Chen and Greene, 2004; Hayden and Ghosh, 2004).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 4 : Illustration des membres de la famille Rel et I κ B chez le mammifère (Chen and Greene, 2004)

Lorsque la cellule n'est pas stimulée, on retrouve les membres de la famille Rel sous forme d'homodimère et d'hétérodimères liés à un inhibiteur de NF- κ B (I κ B). Il y a sept membres dans cette famille nommés : I κ B α , I κ B β , BCL-3, I κ B γ ainsi que les précurseurs p100 et p105 (Figure 4, page 34). Cette famille est caractérisée par la présence d'une région contenant cinq à sept motifs ankyrins répétés. I κ B se lie ainsi à la région de dimérisation de NF- κ B et camoufle le signal de localisation nucléaire de p65 mais pas de p50. Cependant comme il y a présence d'un signal d'export nucléaire (NES) sur I κ B α , le complexe demeure préférentiellement dans le cytoplasme avant la stimulation (Chen and Greene, 2004; Hayden and Ghosh, 2004).

Généralement, une stimulation cause la phosphorylation puis la dégradation protéasome-dépendante de I κ B. C'est le complexe de kinase I κ B (IKK) qui est reconnu

pour phosphoryler les inhibiteurs. Ce complexe est formé de deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ (NEMO) (Hayden and Ghosh, 2004).

1.7.2 Fonction

NF- κ B est activé par plus de 150 stimuli et active au-delà de 150 gènes. Plusieurs virus et bactéries font partis des stimuli pour l'activation de NF- κ B. De plus, la majorité des gènes induits par NF- κ B sont impliqués dans la défense de l'hôte, ce qui fait de ce facteur de transcription un médiateur central de la réponse immunitaire. Parmi ces gènes, on retrouve des cytokines, des chimiokines, des récepteurs impliqués dans la reconnaissance d'antigènes et des molécules d'adhésion (Pahl, 1999).

De façon plus générale, on pourrait dire que NF- κ B est un régulateur de la réponse aux stress puisqu'il est activé non seulement par des pathogènes, mais également par des facteurs de stress. Tout d'abord, il peut être activé par des stress physiologiques comme l'ischémie/reperfusion, la régénération du foie ou un choc hémorragique. Ensuite, NF- κ B peut être activé par des stress physiques comme les rayons ultraviolets et le stress oxydatif. De plus, les stress environnementaux comme les métaux lourds, la fumée de cigarettes et les polluants induisent une réponse dépendante de l'activation de NF- κ B. Les médicaments et xénobiotiques peuvent aussi induire ce facteur de transcription. Plus récemment, on a découvert que l'accumulation de protéines dans le réticulum endoplasmique pouvait également activer NF- κ B (Pahl, 1999).

La réponse à ces stress peut être variée allant de la mitose à l'apoptose. En fait, NF- κ B peut réguler les activités proapoptotiques ou antiapoptotiques selon le stimuli et le type cellulaire. Il peut également induire une panoplie de gènes proinflammatoire pour répondre aux différents stress cellulaires. De plus, l'activation de NF- κ B peut réguler la structure cellulaire et le micro-environnement encore une fois dans le but de diminuer le stress. En résumé, on pourrait dire que NF- κ B est un médiateur central de la réponse immunitaire, un

régulateur des activités proapoptotiques ou antiapoptotique ainsi qu'un modulateur de l'expression des gènes proinflammatoires (Pahl, 1999).

1.7.3 Activation.

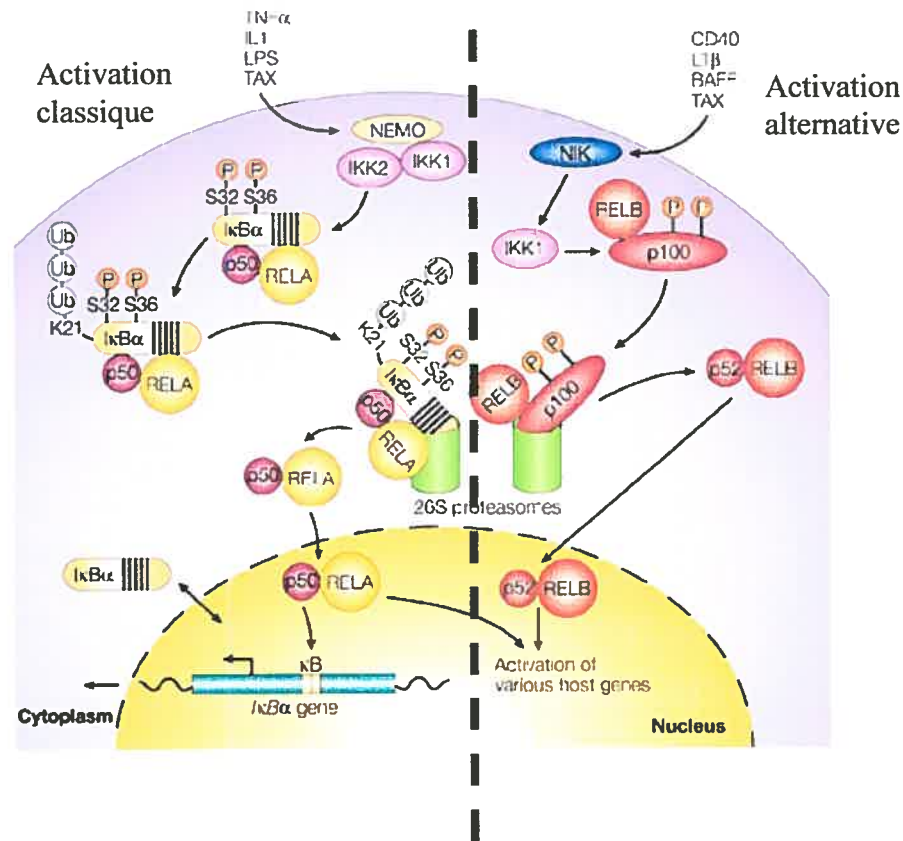
1.7.3.1 Activation classique

Il y a plusieurs façons d'activer le facteur de transcription NF- κ B mais celle que l'on retrouve le plus fréquemment est nommée le mode d'activation classique (Figure 5, page 38). En absence de stimuli pro-inflammatoire, NF- κ B se trouve majoritairement dans le cytoplasme associé à son inhibiteur I κ B. L'hétérodimère le plus souvent retrouvé est p65/p50 et est associé principalement à l'inhibiteur I κ B α . Des stimuli permettent l'activation de cette voie dont le tumor necrosis factor alpha ou beta (TNF- α /TNF- β), le lipopolysaccharide (LPS), l'IL-1 β et le phorbol 12-myriatate-acetate (PMA). Dans ce mode d'activation, la stimulation va mener à l'activation de la sous-unité catalytique β du complexe IKK. IKK β va ensuite phosphoryler I κ B α dans la partie N-terminal sur les résidus sérine 32 et 36. Une fois phosphorylé, I κ B α va être reconnu et ubiquitiné par des membres de la famille d'ubiquitine ligases Skp1-Culin-Roc1/Rbx1/Htr-1-F-box (SCF). L'ubiquitination se fait sur les résidus Lys 20, 21 de I κ B α par la E3 SCF $^{\beta$ -TrCP. Lorsque I κ B α est ubiquitiné, il va lier le complexe 26S du protéasome ce qui va entraîner sa dégradation. NF- κ B est ainsi libéré et peut s'accumuler dans le noyau où il se lie à des séquences consensus (5'-GGGRYYYCC-3', où R est une purine et Y est une pyrimidine) qui se retrouvent dans la région promotrice de plusieurs gènes cibles. Ceci permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base et des coactivateurs p300/CBP qui ont une activité « histone acetyl transférase » (HAT). NF- κ B peut alors transcrire les gènes sous son contrôle, dont I κ B α , qui permettra de faire une boucle de régulation négative du signal (Hayden and Ghosh, 2004). Pour ce qui est de l'Ang II, il y a une certaine controverse à savoir si elle est vraiment capable de mener à la dégradation de I κ B α . Certaines équipes n'en observent aucune alors que d'autres observent une faible

dégradation de l'inhibiteur suite à une stimulation à l'Ang II (Han et al., 1999; Pueyo et al., 2000; Wolf et al., 2002). Ces contradictions laissent supposer qu'une autre voie d'activation pourrait être impliquée.

1.7.3.2 Voie d'activation alternative

Un autre mode d'activation que l'on retrouve est nommé le mode d'activation alternatif (Figure 5, page 38). L'activation de plusieurs récepteurs active cette voie dont ceux de la lymphotoxine β , du B Cell (Lymphocyte) Activating Factor et le CD40. Dans cette voie, un stimuli active la kinase NF- κ B-inducing kinase (NIK) qui à son tour active IKK α . IKK α phosphoryle ensuite p100, ce qui permet la maturation de la protéine en p52 de façon protéasome dépendante. La région riche en glycine limite la dégradation par le protéasome de p100 de façon à générer p52. La présence du death domain dans la partie C-terminale de p100 régule tant qu'à elle la maturation de la protéine et agit ainsi comme un domaine inhibiteur de la maturation. Comme p100 est déjà associé à la sous-unité RelB, la maturation de p100 en p52 permet de libérer un hétérodimère actif qui peut ensuite transloquer au noyau et induire les gènes sous le contrôle de NF- κ B.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 5 : Activation classique et alternative du facteur de transcription NF-κB.
Figure modifiée de (Chen and Greene, 2004)**

Dans le même ordre d'idée, l'inhibiteur p105 peut également subir une maturation dépendante du protéasome. Dans ce cas, la phosphorylation de p105 permet son ubiquitination et sa dégradation protéasome dépendante. L'ubiquitination nécessitera le recrutement du complexe $SCF^{\beta TrCP}$. Encore une fois la dégradation par le protéasome est limitée par la présence d'une région riche en glycine entre les acides aminés 376 et 404 pour permettre la formation de p50 (Hayden and Ghosh, 2004).

1.7.3.3 Spécificité

Comme il a été mentionné précédemment, NF- κ B est activé par plusieurs stimuli et active également une panoplie de gènes. Pour que la réponse à un stimulus soit la plus adéquate possible, l'activation elle doit acquérir une certaine spécificité. Dans un premier temps, la spécificité dépend du type cellulaire sur lequel le stimulus agit. En effet, les cellules n'expriment pas toutes les mêmes molécules et certaines peuvent ne pas contenir celles nécessaires à l'activation d'une voie en particulier ou à la transcription du gène voulu. De plus, les membres de la famille Rel peuvent s'associer de façon variée pour former des homodimères et des hétérodimères qui lieront des séquences consensus différentes sur l'ADN. Les inhibiteurs qu'ils lient sont également différents et ne sont pas dégradés de la même façon ni par les mêmes stimuli (Hayden and Ghosh, 2004; Pahl, 1999).

La région promotrice des gènes diffère également et peut contenir des éléments de réponse à d'autres facteurs de transcription. Ainsi, le recrutement de NF- κ B sur le promoteur peut ne pas être suffisant pour permettre la transcription d'un gène. C'est un autre moyen que possède la cellule pour assurer une réponse spécifique. Finalement, NF- κ B peut subir certaines modifications comme des phosphorylations et des acétylations qui augmentent encore une fois le niveau de spécificité de la réponse (Hayden and Ghosh, 2004; Pahl, 1999).

1.7.3.4 Deuxième phase d'activation

La littérature fait état de plus en plus d'évidences sur la possibilité que NF- κ B pourrait subir une deuxième phase d'activation. Cette deuxième phase est caractérisée par des modifications post-traductionnelles de NF- κ B ou des histones qui entourent les gènes sous le contrôle de NF- κ B. Ces modifications semblent déterminer la durée et l'intensité de la réponse sur la transcription des gènes. Parmi les modifications observées, on retrouve l'acétylation des histones entourant les promoteurs des gènes sous le contrôle de NF- κ B.

Pour assurer la transcription des gènes, il doit souvent y avoir un remodelage de la chromatine. L'acétylation de la queue des histones sur la lysine 14 est une des étapes importantes dans le remodelage. Plusieurs stimuli de NF- κ B, comme le LPS et l'IL- β 1 et les virus provoquent l'acétylation des histones, ce qui permet d'augmenter le recrutement de l'ARN polymérase II et donc d'augmenter la transcription des gènes. Au contraire, la désacétylation des histones est associée à une baisse de réponse de NF- κ B et de transcription des gènes sous son contrôle. La sous-unité p50 a d'ailleurs la capacité d'agir comme une histone désacétylase. De cette façon, l'homodimère p50 agit comme répresseur en augmentant la désacétylation des histones près des régions promotrices (Chen and Greene, 2004). La sous-unité p52 aurait également la capacité de s'associer avec HDAC-1 et ainsi augmenter la désacétylation des histones (Rocha et al., 2003).

En plus de l'acétylation, les histones peuvent également être phosphorylées. Cette modification des histones est associée à la mitose, mais on a récemment remarqué qu'elle était également associée à une hausse de l'activité transcriptionnelle. Plusieurs des stimuli qui activent NF- κ B vont également induire la phosphorylation des histones H3 sur la sérine 10. Les chercheurs ont découvert qu'une des kinases qui pouvaient phosphoryler l'histone H3 en sérine 10 est IKK α (Chen and Greene, 2004).

D'autres types de modifications ciblent plutôt la sous-unité p65 de NF- κ B. En effet, p65 peut être acétylée et phosphorylée ce qui régule grandement l'activité de NF- κ B. Le TNF- α , le phorbol méristate acétate ainsi que d'autres stimuli induisent l'acétylation de p65 sur les résidus lysines 122, 123, 218, 221 et 310 (Chen et al., 2005). Les différentes acétylations modifient l'activité de NF- κ B. Entre autre, l'acétylation de la lysine 221 par p300/CBP augmente l'affinité de p65 pour l'ADN et lorsque que la lysine 218 est également acétylée, la liaison d'une nouvelle molécule de I κ B α est prévenue. Ceci augmente donc la durée d'activation de NF- κ B. L'acétylation de la lysine 310 n'augmente pas la liaison à l'ADN ni le recrutement de I κ B α , mais l'activité transcriptionnelle de NF- κ B s'en retrouve tout de même augmentée (Chen et al., 2005).

En plus d'être acétylée, p65 peut être phosphorylée sur plusieurs résidus ce qui va modifier l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Tout d'abord, p65 peut être phosphorylée sur le résidu sérine 276 par la PKA ou par la mitogen- and stress-activated protein kinase (MSK-1). Cette phosphorylation augmente le recrutement de p300/CBP et ainsi l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. De son côté, la phosphorylation en sérine 311 est assurée par la PKC ζ et permet une transcription efficace des gènes sous le contrôle de NF- κ B. La sérine 468 est aussi phosphorylé. C'est la kinase GSK-3 β qui permet la phosphorylation qui a un rôle à jouer dans l'activité basale de NF- κ B (Buss et al., 2004a; Buss et al., 2004b). La sérine 529 est phosphorylée par la caséine kinase II et le complexe IKK. Elle pourrait augmenter l'activité transcriptionnelle mais d'autres études seront nécessaires pour s'en assurer. Finalement, p65 peut être phosphorylé sur le résidu sérine 536. Plusieurs kinases peuvent phosphoryler p65 sur cette sérine dont IKK- α , IKK- β , IKK- ϵ , RSK et le TRAF Family Member-associated binding protein (TBK-1). La phosphorylation en p65 diminue l'affinité de p65 pour l'inhibiteur I κ B α et augmente le recrutement de plusieurs coactivateurs comme p300/CBP et TAFII31 (Buss et al., 2004b). Plusieurs stimuli sont connus pour induire cette phosphorylation dont le TNF- α .

1.8 Hypothèse et objectifs

Les travaux du laboratoire sont axés sur les voies de signalisation permettant l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la réponse inflammatoire et l'immunité innée comme NF- κ B et IRF-3. Plus précisément, ce projet consistait à mieux comprendre l'implication de l'Ang II dans l'activation de NF- κ B dans les CMLV. La littérature existante sur le sujet fait état d'un lien entre l'activation du AT₁R et du développement de l'athérosclérose. On sait également que la plupart des effets pro-inflammatoires et pro-athérogéniques de l'Ang II dépendent de l'activation de NF- κ B. Cependant, les voies moléculaires permettant de relier l'activation d'un GPCR à la transcription des gènes sous le contrôle de NF- κ B ne sont pas encore connues.

Selon les différents travaux effectués sur le sujet, la voie classique d'activation de NF- κ B ne semble pas impliquée dans l'activation de NF- κ B par l'Ang II. En effet, bien qu'il existe une controverse sur ce point, l'activation de AT₁R ne semble pas mener ni à la phosphorylation ni à la dégradation de l'inhibiteur I κ B α . Dans le même ordre d'idée, les voies alternatives impliquant la dégradation de p100 en p52 ou de p105 en p50, ne semble pas impliquées non plus. Cependant, une découverte récente stipulant que certaines kinases comme le complexe IKK ou RSK pouvait phosphoryler p65 sur la Ser 536 a permis d'explorer une nouvelle voie d'activation. Comme mentionné plus tôt, il est maintenant connu que les modifications post-traductionnelle comme la phosphorylation en Ser536 peut permettre le recrutement de coactivateurs comme p300/CBP et induire la transcription de gène sous le contrôle de NF- κ B. Cette nouvelle voie atypique pourrait donc être impliquée dans les effets pro-athérogéniques de l'Ang II.

L'objectif de cette étude consiste donc à caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels l'Ang II active le facteur de transcription NF- κ B dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Plus précisément, nous voulons déterminer le rôle du complexe IKK dans la phosphorylation directe de p65 suite à une stimulation à l'Ang II. Cette étude permettra d'approfondir notre compréhension sur l'implication de l'Ang II dans l'activation de NF- κ B et dans les processus inflammatoires menant à plusieurs pathologies dont l'athérosclérose.

Dans le but d'évaluer le rôle des voies classiques ou alternatives dans l'activation de NF- κ B par l'Ang, plusieurs essais seront effectués. Tout d'abord, l'activation de NF- κ B par l'Ang II dans notre modèle sera étudiée par RT-PCR sur des CMLV traitées à l'Ang II exprimant ou non un suprarépresseur de I κ B α . Le suprarépresseur I κ B α est délété du domaine PEST en c-terminal et contient la substitution en alanine des deux sérines 32 et 36, les sérine ciblées par par le complexe IKK. Cette version ne peut plus être phosphorylée ou dégradée et agit ainsi comme répresseur de la voie de signalisation NF- κ B. Il est également important de s'assurer que les effets observés passent par l'activation du récepteur AT₁. Pour ce faire, des essais kinase en présence d'un antagoniste de AT₁R

seront effectués. Ensuite, l'implication de la voie classique sera vérifiée par des essais kinases étudiant l'activation de l'activité phosphotransférase du complexe IKK et par des immunobuvardages de type Western évaluants la phosphorylation sur les sérines 32 et 36 ainsi que la dégradation protéasome-dépendante de l'inhibiteur I κ B α . La voie alternative sera étudiée à l'aide d'immunobuvardages de type Western évaluant la phosphorylation en tyrosine de I κ B α ainsi que la maturation de p105 en p50. Il serait également intéressant de vérifier s'il y a augmentation de la liaison à l'ADN par un essai de retard sur gel.

Afin de mieux caractériser les voies impliquées dans l'activation de NF- κ B par l'Ang II et plus précisément dans la phosphorylation de p65 plusieurs essais seront effectués. Tout d'abord, la phosphorylation sur le résidu ser536 sera analysée par immunobuvardages de type Western phosphospécifique. De plus, l'implication de la voie MEK-ERK-RSK sera analysée par immunobuvardages sur des CMLV traitées à l'Ang II en présence d'inhibiteur cette voie de signalisation. Le rôle de la kinase IKK β quant à lui sera évalué grâce à l'utilisation de siRNA contre IKK β dans les CMLV ou à l'aide d'une version négative de cette kinase dans des cellules HEK 293T.

Finalement, la signalisation entre AT₁R et le complexe IKK sera caractérisée. À l'aide d'une approche pharmacologique et de CMLV surexprimant une version dominante négative du récepteur à l'EGF, l'implication de la transactivation du récepteur à l'EGF, suite à une stimulation de AT₁R, dans l'activation du complexe IKK sera étudiée. Puis, une autre approche pharmacologique permettra de déterminer le rôle de la voie PI3-K/AKT dans l'activation du complexe IKK suite à une stimulation à l'Ang II.

2 CHAPÎTRE II. ARTICLE SCIENTIFIQUE

Contribution des coauteurs

Ma participation à cet article a été très importante. Le projet portant sur les voies d'activation de NF- κ B par l'Ang II a été amorcé par Annie Bibeau-Poirier. Elle a produit certains résultats préliminaires et a jeté les premières bases pour l'élaboration de l'hypothèse. Plus spécifiquement, elle a permis de produire les figures 2, 3B, 4A et suppl.2 de l'article. Ayant ensuite décidé de changer de projet, c'est moi qui ai continué et achevé le projet.

Ainsi, j'ai mis au point plusieurs techniques qui ont été utilisées dans le papier comme les expériences de retard sur gel, les immunobuvardages de type Western pour les anticorps phosphospécifiques, les extractions nucléaires et cytoplasmiques, les siRNA contre IKK β et l'utilisation des formes dominantes négatives de IKK β . J'ai également exploré plusieurs avenues qui ont aidé à paver la voie pour l'élaboration de l'hypothèse finale ainsi que l'élaboration du nouveau modèle d'activation de NF- κ B décrit dans l'article. Même si les résultats présentés dans l'article ne sont pas précisément tous ceux que j'ai générés, ce sont pour la majorité des résultats que j'ai produits, reproduits ou aidés à produire. Ainsi, parmi les résultats que j'ai produits ou reproduits, on retrouve les figures 3A, 4B, 5, 6, suppl.1 et suppl.3.

De plus, Simon-Pierre Gravel m'a aidé à mettre la touche finale à ce projet. Il a tenté de mettre au point certaines méthodes qui n'ont cependant pas toutes été utilisées pour l'article. Il a reproduit plusieurs résultats dont ceux des figures 4, 5 et suppl. 4, en plus d'apporter son savoir scientifique pour permettre d'achever le projet le plus rapidement possible.

Finalemment, j'ai participé aux discussions concernant la planification des expériences à effectuer pour le papier et également l'élaboration du plan de l'article. Suite aux critiques reçues, le manuscrit a été révisé par tous les auteurs de cet article, mais de façon plus importante, il a été révisé par Marc Servant, Simon-Pierre Gravel et moi. Simon-Pierre et moi avons effectué les manipulations supplémentaires nécessaires et aidé à répondre aux commentaires pour permettre l'acceptation de l'article dans le *Journal of Biological Chemistry*.

**THE PROINFLAMMATORY ACTIONS OF
ANGIOTENSIN II ARE DEPENDENT ON p65
PHOSPHORYLATION BY THE I κ B KINASE COMPLEX**

(Douillette et al., 2006)

**Annie Douillette*, Annie Bibeau-Poirier*, Simon-Pierre Gravel*, Jean-François
Clément, Valérie Chénard, Pierre Moreau and Marc J. Servant**

From the Faculty of Pharmacy, University of Montreal

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Running title: IKK-dependent phosphorylation of p65 by Ang II

* These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: Marc Servant, Faculty of Pharmacy, University of
Montreal, P.O. Box 6128, Downtown station, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7,
Tel. (514) 343-7966; Fax. (514) 343-7073; E-mail: [REDACTED]

The vasoactive hormone Angiotensin II (Ang II) probably triggers inflammatory cardiovascular diseases by activating transcription factors such as NF- κ B. We describe here a novel mode of NF- κ B activation in cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to Ang II. Ang II treatment resulted in an increase in the phosphotransferase activity of the IKK complex, which was mediated through the AT1 receptor subtype. The typical phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B α were not observed. Rather, Ang II treatment of VSMC led to the phosphorylation of p65 on serine 536, a signal detected in both the cytoplasm and the nuclear compartments. The use of pharmacological inhibitors that inhibit the activation of MEK by Ang II revealed that phosphorylation of p65 on serine 536 did not require the MEK-ERK-RSK signaling pathway. On the other hand, specifically targeting the IKK β subunit of the IKK complex by overexpression of a dominant negative version of IKK β (IKK β K44A) or silencing RNA technology demonstrated that the IKK β subunit of the IKK complex was responsible for the detected phosphoserine 536 signal in Ang II-treated cells. Characterization of the signaling pathway leading to activation of the IKK complex by Ang II revealed that neither epidermal growth factor receptor transactivation nor the phosphatidylinositol-3 kinase-AKT signaling cascade were involved. Collectively, our data demonstrate that the proinflammatory activity of Ang II is independent of the classical pathway leading to I κ B α phosphorylation and degradation but clearly depends on the recruitment of an IKK complex signaling cascade leading to phosphorylation of p65 on serine 536.

INTRODUCTION

Hypertension is a classical risk factor for the development of atherosclerosis (for review see (1)). Epidemiological studies showed that among hypertensive patients, those who have an activated renin-angiotensin (RAS) have a higher incidence of myocardial

infarction than other forms of hypertension (2-6). The octapeptide angiotensin II (Ang II) is the multifunctional effector of the RAS. It binds to two distinct receptor subtypes, designated AT1 and AT2 (7). Most of the known effects of Ang II are relayed through binding of the AT1 subtype and studies in models of vascular injury have demonstrated that blockade of the RAS or gene disruption of the AT1 receptor can prevent the development of atherosclerosis (8-12). In addition to its vasoconstrictive role, Ang II may also act locally as a growth factor. Indeed, it is a hypertrophic factor for vascular smooth muscle cells (VSMC) and cardiac myocytes and has mitogenic effects for different cell type such as cardiac fibroblasts (for review see (13-15)). Interestingly, other studies have demonstrated that Ang II has proinflammatory actions by promoting an increase in the expression level of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and several chemokines such as monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES), interleukin (IL)-8, IL-6 and interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) (for reviews see (16,17)). However, the molecular understanding of the proinflammatory action of Ang II is still unclear.

Activation of the Ang II AT1 receptor (AT1R) in VSMC is functionally link to the recruitment and activation of cytosolic kinases such as the classical Ras/mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK1)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)/ribosomal S6 kinase (RSK), protein kinases C (PKCs), calmodulin (CAM) kinases and Janus kinases (JAKs). These kinases can in turn lead to the activation of transcription factors involved in genes regulation and the growth promoting effect of Ang II (15,18). The transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) is a key regulator of inflammation, immune response, and cellular survival (19) and the proinflammatory actions of Ang II have been attributed to its activation (16,20-26).

The NF- κ B family is represented by five members: p50, p65(RelA), c-Rel, p52, and RelB. In resting cells, they exist as homo- or heterodimers that are sequestered in the cytoplasm

in an inactive form through their association with one of several inhibitory molecules, namely I κ B- α , - β , - ϵ , p105, and p100. These inhibitors mask the nuclear localization sequence (NLS) in the rel homology domain (RHD) of NF- κ B, thereby preventing it from accumulating in the nucleus (for recent reviews see (27,28)). I κ B α is the most characterized member of this family. It is composed of three domains: an N-terminal signal responsive domain, a central ankyrin repeat domain that interacts with NF- κ B and a C-terminal PEST domain which is responsible for the basal turnover of the protein (29). In the classical pathway, the first phase of NF- κ B activation mainly consists of the regulated degradation of I κ B α and is triggered by prototypical activators such as tumor necrosis factor (TNF)- α , lipopolysaccharide (LPS), IL-1 β and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). These stimuli induce the phosphorylation of I κ B α at Ser-32 and Ser-36 in the N-terminal signal responsive domain by the canonical I κ B kinase (IKK) complex, which is composed of two catalytic subunits called IKK α and β and one regulatory subunit IKK γ . Phosphorylated I κ B α is subsequently polyubiquitinated and targeted to the 26S proteasome complex, resulting in the release and nuclear accumulation of NF- κ B, which can now stimulate target gene transcription. Studies report that Ang II can stimulate degradation of I κ B α , but the decrease in its expression level is very small suggesting the existence of other pathways to regulate NF- κ B activity (24,26).

Notably, several lines of evidence suggest the existence of a second phase of NF- κ B activation. Part of this second phase involves phosphorylation of the p65 subunit, which plays a key role in determining both the strength and duration of the NF- κ B-mediated transcriptional response (for recent reviews see (30,31)). The sites of phosphorylation reported to date are Ser-276 and Ser-311 in RHD and three phosphoacceptor sites located in the transactivation domain (TAD), Ser 468, Ser-529 and Ser-536. Several candidate kinases that phosphorylate each serine residue have been identified, such as protein kinase A and mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) for Ser-276 (32,33), PKC ζ for Ser-311, GSK-3 β for Ser-468, casein kinase II (CKII) for Ser-529 (34), and IKK α / β as

well as RSK for Ser-536 (35-37). Importantly, phosphorylation at Ser-536 was recently shown to reduce the ability of p65 to bind I κ B α (36) and to allow the recruitment of TAFII31, a component of the basal transcriptional machinery (37). Phosphorylation at Ser-536 is also responsible for recruitment of coactivators such as p300 (38) and also triggers its rapid turnover in the nucleus (39). All these evidences support the importance of p65 phosphorylation at Ser-536 in the function of NF- κ B. Notably, a recent study proposed that Ang II induces NF- κ B through a RSK-dependent pathway leading to Ser-536 phosphorylation of p65 (40). In the light of these interesting findings, we have set up experiments to identify more precisely the molecular mechanism by which Ang II induces proinflammatory action in VSMC and now describe a series of studies dissecting the novel mechanism by which Ang II activates NF- κ B. We show that following binding to the AT1R, Ang II leads to an increase in the phosphotransferase activity of the IKK complex, which leads to phosphorylation of p65 on Ser-536. Because I κ B α is not degraded in response to Ang II, we propose a model where it is the phosphorylation of p65 on Ser-536 that is likely to be involved in the pro-inflammatory actions of Ang II in VSMC.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagent, antibodies, and plasmids

Angiotensin II (Ang II) was purchased from Hubakel Scientific (St. Laurent, QC). EGF and TNF- α were from BioSource (Camarillo, CA). The tyrphostin AG1478, a selective EGFR kinase inhibitor, the PI3-kinase inhibitor LY294002, the MEK1/2 inhibitors UO126 and PD98059 were all from Biomol (Plymouth Meeting, PA). G418 was from Invitrogen. Commercial antibodies were from the following suppliers: anti-IKK γ (SC-8330), anti-I κ B α (SC-371), anti-p65 (SC-372) and anti-IKK α (SC-7218) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti- β -actin clone AC-74 (A5316) was from Sigma (Saint Louis, MO); anti-IKK β antibody, phospho-I κ B α (Ser32) antibody (#9241), phospho-AKT (Ser473) antibody (#9271), phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) antibody (#9101), phospho-p65 (Ser536) antibody (#3031), and phospho-RSK (Ser380) antibody (#9341) were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); anti-phosphotyrosine, clone

4G10 and anti-Lamin A/C were from Upstate cell signaling solution (Lake Placid, NY). An antibody that recognizes both p105 and p50 was a generous gift of Dr. John Hiscott (McGill University, Montreal, Qc). Glutathione-S-transferase (GST)-I κ B α (1-54) has been described (41). GST-p65 (354-551) was produced by subcloning PCR-amplified fragments in pGEX-KG. The resulting construct were transformed in *Escherichia coli* and following isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction (1 mM for 3 h at 37°C), purified over a glutathione agarose column (Amersham). The expression plasmids pTrack-Flag-IKK β (K44A) and pCDNA3.1-HA-AT1R were provided by Drs. John Hiscott and Stephane Laporte (McGill University, Montreal, Qc) respectively.

Cell types and Transfection

Rat VSMC and VSMC overexpressing a dominant-negative version of EGFR (HERCD533) (42) were obtained from Dr. Sylvain Meloche (University of Montreal, Montreal, Qc) and grown in low glucose DMEM supplemented with 10% calf serum, 2 mM-glutamine, and antibiotics (50 units/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO₂. All experiments were conducted on cells at passage levels 9-14. Quiescent VSMC were obtained by incubation of 95% confluent cell cultures in serum-free DMEM-Ham's F-12 (1:1) supplemented with 15 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% bovine serum albumin, and 5 μ g/ml transferrin for 48 h. For experiments with pharmacological inhibitors, the cells were treated with vehicle alone or with the indicated concentrations of inhibitors for 30 min before addition of Ang II. 293T cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), cultured in minimal essential medium containing 10% fetal bovine serum and transfected using calcium phosphate coprecipitation method. All cells tested negative for mycoplasma contamination.

Small Interfering RNA (siRNA)

Two 21-nucleotide siRNA duplexes with 2-nucleotide (2'-deoxy)-thymidine 3' overhangs were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO) and directed against rat IKK β :

IKK β #1 (nucleotide 1460 to 1478 (AAACCAGCATCCAGATTGA)) and IKK β #2 (nucleotide 2028 to 2046 (GAATGTGTCTCGACTTAGT)). A siCONTROL Non-targeting silencing RNA (siRNA) (#D-001210-01-20) as described previously (41). For transfection, cells were trypsinized and seeded into six-well plates (8.0×10^5 cells/well) without antibiotics. After 24h, cells were transfected with siRNA using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. siRNA were used at a concentration of 120 nM in transfections. Cells were harvested for analysis 72 h after transfection.

Retrovector construction, transduction and generation of rat VSMC overexpressing $I\kappa B\alpha 2N\Delta 4$

The pMSCVneo $I\kappa B\alpha 2N\Delta 4$ retrovector was a kind gift of Dr. John Hiscott (McGill University) and has been described (43). The Phoenix Amphotropic packaging cell line was transiently transfected as described (www.stanford.edu/group/nolan/phxhelper.html) with the plasmids pMSCVneo and pMSCVneo $I\kappa B\alpha 2N\Delta 4$. At 48 h post-transfection, retrovirus-containing medium was harvested and used to infect rat VSMC. VSMC were infected twice at 24 h intervals in the presence of 10 μ g/ml of polybrene (Sigma); selection with 800 μ g/ml of G418 (Invitrogen) was started 5 days later. After 14 days, a population of resistant VSMC was selected. For selection of clones from both rat VSMC (Neo) and rat VSMC ($I\kappa B\alpha 2N\Delta 4$), cloning rings were used and expression of the transgene was verified by immunoblot analysis.

RT-PCR analysis

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). DNase-treated (Ambion, Austin, TX) cellular RNA (1 μ g) was reverse transcribed with AMV reverse transcriptase (Sigma) in a 20 μ l reaction volume according to manufacturer's instructions. PCRs were subsequently performed per the manufacturer's specifications with the following primers: rat IL-6 forward and reverse, 5'-TGTTGTTGACAGCCACTGC-3' and 5'-TTTCAAGATGAGTTGGATGGTC-3' respectively; rat MCP-1 forward and reverse, 5'-

CAGGTCTCTGTCACGCTTCT-3' and 5'-AGTATTCATGGAAGGGAATAG-3' respectively and rat RPL32 forward and reverse, 5'-GTGAAGCCCAAGATCGTC-3' and 5'-GAACACAAAACAGGCACAC -3' respectively. PCR were performed using the following schedule: denaturation, annealing, and primer extension at 94, 56, and 72°C for 1 min, 1 min and 2 min respectively for 30 cycles. PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gels containing ethidium bromide and visualized using a gel documentation device (Typhoon scanner 9410)

Immunoblot analysis

After the different treatment, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and whole cell extracts were prepared using Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10^{-4} M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10^{-6} M leupeptin, 10^{-6} M pepstatin A, 1% Triton X-100) for 30 min at 4°C. Lysates were clarified by centrifugation at 13,000 g for 10 min and equal amounts of lysate proteins (30-75 μ g) were subjected to electrophoresis on 7.5, 10 or 12 % acrylamide gels. Proteins were electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and fixed for 10 min in methanol/acetic acid/glycerol (40:7:3). Immunoblot analysis of I κ B α and β -actin were accomplished as described previously (41). Phospho-I κ B α (Ser32), phospho-AKT (Ser473), phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204), phospho-p65 (Ser536), and phospho-RSK (Ser380) were used following manufacturer's instructions. Both anti-p65 and anti-IKK β were used at 1 μ g/ml. Rabbit anti-p105/p50 and mAb 4G10 were used at 1:1000 and 1:5000 respectively.

In vitro kinase assays

The phosphotransferase activity of the IKK complex was measured as described previously (41). Briefly, 250 to 400 μ g of whole cell extracts were incubated for 4 hours at 4°C with specific antibody to IKK γ (anti-IKK γ (SC-8330)) preabsorbed to protein-A-sepharose beads. The immune complexes were washed three times with lysis buffer and once with

kinase buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 20 mM MgCl₂, and 2 mM dithiothreitol (DTT)). IKK complex activities was assayed by resuspending the beads in 40 µl of kinase buffer containing 1 µg of GST-substrates (GST-IκBα or GST-p65) as indicated, 20 µM ATP, and 20µCi of [γ -³²P]ATP. The reactions were incubated at 30°C for 30 min. and stopped by the addition of 5X Laemmli's sample buffer. The samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis. Following Coomassie staining, the gels were dried and exposed to a Gel Documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham) for imaging and quantification. In some experiments, the upper part of the gel was electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes and immunoprecipitated IKK complex was revealed by immunoblotting.

Phosphorous 32 labeling and Immunoprecipitation

Quiescent VSMC in 100-mm petri dishes were metabolically labeled for 5 h at 37°C in bicarbonate and phosphate-free HEPES-buffered Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.75 mCi/ml [³²P]phosphoric acid. The cells were then stimulated by the addition of 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF-α to the medium for the indicated period of time. Following a quick wash with ice-cold PBS, whole cell extracts were prepared as described above and precleared for 1 h with 10 µl of normal rabbit serum and incubated for 4 h at 4°C with anti-p65 antibody preabsorbed to protein A-Sepharose beads. Immune complex were washed six times with lysis buffer. Protein complexes were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gels. The proteins were then electrophoretically transferred to PVDF membranes (Millipore) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol, and exposed to a gel documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham Biosciences) for imaging and quantification. The membranes were after use in immunoblotting experiments using anti-p65 antibody to verify the immunoprecipitated p65.

Biosynthetic Labeling Experiments

To examine the turnover of I κ B α protein, quiescent VSMC in 100-mm Petri dishes were pulse-labeled for 1 h with 166 μ Ci/ml of [35 S]methionine and [35 S]cysteine and then chased for the indicated times in serum-free medium containing excess methionine and cysteine and either Ang II or TNF- α . The cells were then washed twice with ice-cold PBS and lysed in Triton X-100 lysis buffer. Lysates (500 μ g protein) were precleared for 1 h with 5 μ l of normal rabbit serum and the resulting supernatants were incubated with protein A-Sepharose beads preabsorbed with 2 μ g of anti-I κ B α for 4 h at 4°C. Immune complexes were washed five times with Triton X-100 lysis buffer. Proteins were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gels. The I κ B α protein was detected by fluorography and visualized using a gel documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham Biosciences).

Electromobility shift assays (EMSA)

Preparation of cytosolic and nuclear extracts as well as EMSA was accomplished as described previously (44).

RESULTS

NF- κ B-dependent chemokines gene induction by Ang II in VSMC

Since controversy exist in the literature as to know whether Ang II has the ability to activate NF- κ B transcription factor (45,46), we first verified the state of activation of known NF- κ B-regulated chemokines, namely IL-6 and MCP-1, in VSMC stably overexpressing the superrepressor version of I κ B α , I κ B α 2N Δ 4. This mutant molecule has been shown to abrogate totally NF- κ B induction by different stimuli. It involves mutation of the I κ B serine phosphorylation sites to alanine (Ser32/36Ala) and removal of the C-terminal PEST domain to generate a form of I κ B (I κ B α 2N Δ 4). The basal turnover of this mutated I κ B is diminished but most importantly, I κ B α 2N Δ 4 is no longer responsive to inducer-mediated phosphorylation and degradation, and thus acts as a transdominant repressor of the NF- κ B pathway (by sequestering NF- κ B subunits in the cytoplasm) (43).

Following selection of the stable transfectant, clones were isolated and analyzed for the transgene expression in western blot analysis (see Fig. 1A). Note that when the level of $I\kappa B\alpha 2N\Delta 4$ is high, the expression of endogenous $I\kappa B\alpha$ is diminished due to the fact that the *IκB* gene is itself regulated by NF- κ B transcription factor (Fig. 1A, compare clones $I\kappa B\alpha 2N\Delta 4$ #1 with #4). This illustrates that overexpression of $I\kappa B\alpha 2N\Delta 4$ titrates out any free NF- κ B subunits thus allowing reduction in basal NF- κ B transcription of target genes such as $I\kappa B\alpha$. Following Ang II stimulation, induction of both *MCP-1* and *IL-6* transcripts was observed in the two clones of rat VSMC expressing only the neomycin cassette (clones neo #3 and #6). However, the presence of high level of $I\kappa B\alpha 2N\Delta 4$ in clone #4 strongly abrogated the induction of these transcripts by Ang II (Fig. 1B). The clone expressing moderate level of $I\kappa B\alpha 2N\Delta 4$ (clone#1) had an intermediate effect on the induction of *IL-6* and *MCP-1*. Together, these data clearly demonstrate a role of NF- κ B in Ang II-induced proinflammatory genes in VSMC.

IKK complex activation by Ang II in VSMC

Given the essential role of the IKK in the activation of NF- κ B, we next verified the phosphotransferase activity of this complex when VSMC were exposed to Ang II. Following immunoprecipitation of the scaffolding protein of the IKK complex, $IKK\gamma$, we observed that Ang II treatment of VSMC resulted in a time-dependent (Fig. 2A) and dose-dependent (Fig. 2B) stimulation of the IKK complex as observed by an increase phosphotransferase activity towards the *in vitro* substrate GST- $I\kappa B\alpha$. The maximal increase in the phosphotransferase was observed at 1 μ M Ang II and sustained for at least 60 minutes starting at 1 min. post stimulation (Fig. 2A and 2B). Importantly, the observed IKK complex stimulation was completely abrogated when cells were pre-incubated with the AT1 antagonist Irbezartan demonstrating that the activation of the IKK complex by Ang II is AT1R-dependent (Fig. 2B). The use of the recombinant protein GST- $I\kappa B\alpha 2N$, where Ser-32 and 36 were mutated to alanine, showed no phosphorylation under our

conditions thus confirming the specificity of the immunoprecipitated IKK complex in VSMC (Fig. 2C).

Nonclassical activation of NF- κ B by Ang II in VSMC

Through phosphorylation-dependent degradation of I κ B proteins by the proteasome, activation of the IKK complex is a rate-limiting step in the activation of NF- κ B transcription factor (27,47). Notably, several groups have published data showing that Ang II induces weak or strong degradation of I κ B proteins in VSMC (22,24). However, another recent study reported no degradation of the I κ B α / β NF- κ B inhibitors in the same model exposed to Ang II (40). Given that we observed a significant increase in the phosphotransferase activity of the IKK complex in VSMC stimulated with Ang II (Fig. 2), we wanted to revisit the possibility that the expression level of I κ B proteins might be reduced following Ang II treatment. Western blot analysis clearly demonstrated no degradation of the two NF- κ B inhibitors, I κ B α and I κ B β , nor phosphorylation of I κ B α on Ser 32 when cells were exposed to Ang II (see Fig. 3A, panels *a*, *b* and *c*) as opposed to TNF- α -treated cells where a specific I κ B α phosphoserine 32 signal was observed after 5 min of stimulation (Fig. 3A, panel *b*, lanes 11-12) followed by a net decrease of I κ B α isoform after 10 min (Fig. 3A, panel *a*, lane 12). To confirm this observation, we next determined the rate of I κ B α turnover by pulse-chase experiments on VSMC treated with Ang II and TNF- α . When compared to untreated cells, stimulation of cells with Ang II did not affect the stability of I κ B α , as opposed to stimulation with TNF- α where 90% of NF- κ B inhibitor was degraded after 15 min of treatment (Fig. 3B). Albeit the lack of I κ B α degradation by Ang II, we observed a significant DNA binding activity of p50/p65 heterodimers in VSMC (see Supplemental Data, Fig. 1). Ang II has pleiotropic actions at multiple points in the NF- κ B activation pathway in VSMC. Reports have indeed demonstrated that Ang II could lead to NF- κ B activation through an increased processing of p105 to p50 (24), which is considered to be a constitutive process (27). In addition, Ang II induces tyrosine phosphorylation of I κ B α in fetal VSMC (48), a process thought to

promote its physical dissociation from NF- κ B. However, our own immunoprecipitation studies and Western blot analysis clearly demonstrated no tyrosine phosphorylation of I κ B α when VSMC were exposed to Ang II as opposed to pervanadate treatment (see Supplemental Data, Fig. 2A). No processing of p105 to p50 was also observed over a 16 hours period treatment with Ang II (see Supplemental Data, Fig. 2B). Collectively, these data demonstrate that, albeit a significant activation of the IKK complex by Ang II and the increase in DNA binding activity of p65/p50 complexes, the classical pathway leading to degradation of I κ B proteins and atypical models of activation (tyrosine phosphorylation of I κ B α and p105 processing), are not involved in Ang II-induced activation of NF- κ B transcription factor.

Ang II induces phosphorylation of p65 on Ser-536 in an IKK-dependent manner

In addition to I κ B proteins, it is now well recognized that components of the IKK complex have several other substrates including histone H3, p100 and p65. Whereas p65 is a substrate for IKK α and β (for recent reviews see (30,31)), histone H3 and p100 are phosphorylated only by IKK α (47,49,50). Since we observed a significant activation of the IKK complex by Ang II, we next analyzed the phosphorylation state of p65 after immunoprecipitation from 32 P-labeled VSMC stimulated with Ang II or TNF- α . p65 is expressed as a phosphoprotein in quiescent VSMC (Fig. 4A lane 1) and exposure to Ang II or TNF- α significantly increased its phosphorylation level (Fig. 4A). Using a phosphospecific antibody, we next addressed if p65 phosphorylation was occurring on an IKK phosphorylation site, namely Ser-536. A specific phosphoserine 536 signal was detected when cells were exposed to Ang II (Fig. 4B, panel *a*). Interestingly, a treatment of 15 min with another growth factor for VSMC, epidermal growth factor (EGF), which like Ang II induces the activation of AKT and ERK (see Fig. 4B, panels *c* and *d*, lane 6), failed to induce phosphorylation of p65 on Ser-536 thus demonstrating the specificity of the signaling cascades activated by Ang II and leading to p65 phosphorylation in VSMC. In addition to IKK α and β , RSK1 was recently shown to target Ser-536 of p65 (36). Since Ang II is a strong activator of the MEK-ERK-RSK signaling cascade in VSMC, we first

verified if RSK was recruited by Ang II to induce phosphorylation of p65 on Ser-536. The use of pharmacological inhibitors that target specifically MEK1/2, namely PD98059 and UO126, completely abrogated Ang II-induced RSK1 activation in VSMC without affecting the specific phosphoserine 536 signal (Fig. 5A). Inhibition of the MEK-ERK-RSK signaling cascade for up to 1 h did not prevent the rapid induction neither the sustained phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II (Fig. 5B). In order to verify the possible role of the IKK complex in Ang II-induced p65 phosphorylation on Ser-536, we next verified if the activation of the IKK complex followed a kinetic similar to the phosphoserine 536 signal. A detailed kinetics in VSMC revealed that the activation of the IKK complex by Ang II was rapid and sustained for at least 24 hours (Fig. 5C panel *a*). Interestingly, the activation of the IKK complex followed the same kinetic of phosphorylation of p65 on Ser-536 (Fig. 5C, panel *c*). As predicted, stimulation of the IKK complex by Ang II also resulted in an increase phosphotransferase activity towards the *in vitro* substrate GST-p65 (354-551) (see Supplemental Data, Fig. 3). Since IKK-induced p65 phosphorylation was previously shown to occur in the cytoplasm (51,52), we next addressed in which cellular compartments phosphorylation of p65 occurred in Ang II-treated cells. Figure 5D shows the presence of a strong inducible phosphoserine 536 signal that was predominantly detected in the cytoplasmic compartment. Interestingly, a significant amount was also observed in the nucleus. To further substantiate the hypothesis of a possible involvement of the IKK complex in Ang II-mediated p65 phosphorylation, we took advantage of a point mutant version of IKK β (IKK β K44A), which lacks the ATP binding site and therefore acts in a dominant negative fashion. When co-expressed with the AT1R in 293T cells, it totally prevented the phosphorylation of p65 by Ang II (Fig. 5E). In order to directly ask whether the IKK β subunit of the IKK complex was responsible for the detected p65 phosphoserine 536 signal in Ang II-treated cells, we next used RNA silencing technology. Upon transfection of the indicated siRNA duplexes, the expression levels of IKK β was down regulated by 90% and correlated with a net decrease of the phosphoserine 536 signal in Ang II-treated cells (Fig. 5F). Silencing IKK β in VSMC did not however affect the phosphorylation of the ERK isoforms by Ang II. Altogether, these data demonstrate that

the IKK β subunit of the IKK complex plays an essential role in Ser-536 phosphorylation of p65 by Ang II.

IKK β is a cytoplasmic kinase and the above results suggest that it is the cytoplasmic phosphorylation of p65 that trigger its nuclear accumulation possibly through a process involving loss of affinity for I κ B α without the requirement for its degradation (36). Consequently, to further substantiate the hypothesis of a dispensable role of the I κ B inhibitors in Ang II-induced nuclear accumulation of phosphorylated p65, VSMC were pre-treated with the proteasome inhibitor MG-132 and again a significant amount of phosphorylated p65 was found in the nucleus of Ang II-treated cells (see Supplemental Data Fig. 4).

Molecular characterization of AT1 receptor signaling to the IKK complex

Since we observed an important role of the IKK complex in the proinflammatory actions of Ang II, we next wanted to verify what might be the signaling pathways coupling the AT1R to the IKK complex. Using pharmacological as well as molecular approaches, we address the roles of the EGF receptor and the PI3-kinase-AKT pathway in Ang II-mediated IKK complex activation in VSMC. Figure 6A shows that pretreatment with the tyrosine kinase inhibitor AG1478, a selective EGFR kinase inhibitor that efficiently block the activation of ERK1 by Ang II ((41) and data not shown), did not antagonize the activation of the IKK complex. This observation is in agreement with an activation of the phosphotransferase activity of the IKK complex in rat VSMC overexpressing a dominant-negative version of EGFR (HERCD533) (42) (Fig. 6B). Inhibition of the PI3-kinase pathway by the use the specific inhibitor LY294002 inhibited activation of AKT by Ang II (data not shown) but was also without any consequence on Ang II-induced activation of the IKK complex in VSMC (Fig. 6C). Together, these data show that AT1R-mediated transactivation of the EGFR and the PI3-kinase-AKT pathway are not involved in the induction of the IKK complex by Ang II in VSMC.

DISCUSSION

After primary injury of the vasculature, the inflammation response that follows is characterized by three key events: 1) increment of vascular permeability, 2) infiltration of inflammatory cells and 3) tissue repair and remodeling (for review see (16)). Through the induction of a repertoire of NF- κ B-regulated genes such as, *IL-6*, *MCP-1*, *IL-8*, *RANTES*, *VCAM-1*, and *ICAM-1*, it is now well appreciated that Ang II participates in these key events of the inflammatory response leading to the development of cardiovascular diseases like atherosclerosis (16). Whereas the pathways leading to NF- κ B activation following treatment with prototypical activators such as TNF- α , LPS or IL-1 β is well characterized, the molecular understanding of the signaling pathways that is involved in the coupling of G protein-coupled receptors (GPCR) such as AT1R or AT2R to NF- κ B are still unclear. The results presented in this report show that Ang II activates NF- κ B in cultured VSMC, and that, independently of I κ B α phosphorylation and I κ B α/β degradation (see Fig. 3). These observations strongly suggest that the classical pathway of NF- κ B activation is not triggered by Ang II in VSMC. Moreover, other mechanisms described as being responsible for Ang II-induced NF- κ B activation, namely p105 processing and tyrosine phosphorylation of I κ B α (24,48), are not observed in Ang II-treated VSMC. Instead, we now propose a new model where Ang II treatment leads to an AT1R-dependent activation of the IKK complex. The activated IKK complex then phosphorylates Ser-536 of p65 (see Fig. 7 for the detailed mechanism). The extent to which the present mechanism can account for the known pro-inflammatory action of Ang II in the cardiovascular system is unknown at the moment as other transcription factors are also involved in the pro-inflammatory action of the peptide such as CREB and AP-1 (ATF-2/c-Jun) (53,54). However, p65 phosphorylation on Ser-536 has also been observed in Ang II-treated cultured adipocytes as well as in pressure-dependent activation of NF- κ B in arterial segments (55,56). Thus, a possible molecular link may exist between two known risk

factors for the development of atherosclerosis, namely obesity and hypertension, for the activation of NF- κ B through p65 phosphorylation.

No degradation of I κ B α in Ang II-treated VSMC

Many studies have looked at I κ Bs degradation when VSMC are exposed to Ang II. Intriguingly, no studies have addressed if the canonical IKK complex was activated by Ang II. Using in vitro kinase assays, our report clearly demonstrates a rapid and sustained phosphotransferase activity of the IKK complex, which was mediated by the AT1R and dependent on the concentration of Ang II used (see Figs. 2 and 5C). In response to prototypical activators of NF- κ B, activation of the IKK complex normally leads to phosphorylation and degradation of I κ B α . Why then Ang II does not induce the degradation of I κ B α ? One possible scenario that might account for this observation is the recent observation demonstrating recruitment of β -arrestin proteins to I κ B α when cells are exposed to β 2 adrenergic receptors (57,58). Interestingly, this association between β -arrestin proteins and I κ B α was shown to abrogate TNF- α -induced I κ B α phosphorylation and degradation (57). Thus, experiments are underway to try to verify if the stimulation of VSMC with Ang II promotes the recruitment of β -arrestin proteins to I κ B α , a process that could explain the incapacity of Ang II to induce the degradation of I κ B α .

Phosphorylation of p65 by IKK β

A recent report by Zhang and colleagues demonstrated phosphorylation of p65 on Ser-536 in VSMC exposed to Ang II (40). Using the MEK 1/2 inhibitor U0126 as well as silencing RNA technology, they suggested that this was essentially occurring in a RSK-dependent manner. However, several observations from our study suggest a more important contribution of the IKK complex in this process. First, our study clearly shows that the two MEK 1/2 inhibitors PD98059 and U0126, significantly abrogated the activation of RSK by Ang II without affecting the phosphoserine 536 signal (Fig. 5A and B). Second, the kinetic

of the IKK complex activation follows the same kinetic as p65 Ser-536 phosphorylation (Fig. 5C). Third, it was shown that IKK β -dependent phosphorylation of Ser-536 of p65 occurs in the cytoplasm (51,52), similar to what we observed in Ang II-treated cells (Fig. 5D), whereas RSK-dependent phosphorylation of p65 happens exclusively in the nuclear compartment (36). Fourth, overexpression of a dominant negative version of IKK β completely abrogated Ang II-induced phosphorylation of p65 on Ser-536 in 293T cells expressing the AT1R (Fig. 5E). Fifth, downregulation of IKK β expression by siRNA technology has allowed us to conclude that activation of the IKK complex is responsible for the detected phosphoserine 536 signal observed in Ang II-treated VSMC (Fig. 5F). We do not have an explanation for the difference between the report by Zhang and colleagues (40) and this study. Notably, the two MEK1/2 inhibitors UO126 and PD98059 had no effect on the phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II in VSMC derived from Sprague-Dawley or Wistar-Kyoto rats (data not shown).

Pleitropic roles for the phosphorylation of p65 on Ser-536

Although the exact roles of this covalent modification of p65 are not precisely characterized, it seems to affect several aspects of NF- κ B signaling. Thus, Ser-536 phosphorylation of p65 has been implicated in many nuclear effects cumulating to activation of NF- κ B target genes (37,38). Through an increased association of a phosphomimetic form of p65 with TAFII31 (37), and the role of this phosphoacceptor site in recruiting p300 (38), it has become clear that phosphorylation of p65 may play a major role in NF- κ B-mediated transcriptional response. Ser-536 phosphorylation of p65 could also affect its ability to associate with I κ B α inhibitor. Notably, p53 was recently reported to induce NF- κ B activity without I κ B α degradation (36) and a model has been proposed to explain the enhanced nuclear localization and increased DNA binding of NF- κ B. In this model, p65 phosphorylated at Ser-536 loses its affinity of I κ B α and alters the basal nucleocytoplasmic shuttling properties of the NF- κ B-I κ B α complex favoring nuclear retention. Based on this model, our data suggest that a subpopulation of p65

phosphorylated on Ser-536 lose their affinity for I κ B α and accumulate into the nuclear compartment (see Fig. 5D and Supplemental Data Fig. 4). Finally, phosphorylation of p65 on Ser-536 also triggers its rapid turnover in the nucleus (39). Interestingly, we also noticed a prolonged nuclear signal of p65 phosphorylated on Ser-536 in the presence of MG132 (compare Figs. 5D and Supplemental Data Fig. 4). Thus, it is likely that the induction of phosphorylation of p65 by Ang II regulates the overall NF- κ B response through both positive inputs (increase in nuclear accumulation and p65 transcriptional activity) as well as negative inputs (increase in p65 turnover).

AT1R coupling to the IKK complex

The mechanisms by which GPCR are able to transduce a signal from the cellular environment into the cytoplasm have been studied for decades. Albeit the essential roles of heterotrimeric G proteins in this process, it has now become well appreciated that GPCR uses tyrosine kinase receptors in order to activate multiple signaling pathways, most of which influencing cell growth and surviving. Thus, for AT1R, it has been clearly established that transactivation of the EGFR is essential to activation of the Raf/MEK/ERK as well as PI3-kinase/PDK/AKT modules (42,59,60). In addition to ERKs and AKT, activation of NF- κ B is also linked to cellular growth and surviving, and with the observations that both PDK1 and AKT can act as IKK-activating kinases (61,62), it was therefore important to address if EGFR transactivation and the PI3-kinase/PDK/AKT module were involved in the activation of the IKK complex by Ang II. A pharmacological approach using EGFR kinase and PI3-kinase inhibitors and a molecular approach using VSMC overexpressing a dominant negative version of EGFR have allowed us to conclude that neither EGFR transactivation nor the PI3-kinase pathway were involved in AT1R-mediated activation of the IKK complex.

In conclusion, our data suggest that AT1R is coupled to a nonclassical mode of activation of NF- κ B in VSMC involving an IKK complex/p65 Ser-536 signaling cascades. Understanding the role of inflammation in atherosclerosis might pave the way for the

development of new therapeutics to treat this cardiovascular disease such as IKK β inhibitors (28). While our paper was submitted, a related paper was published (Zhang, L., Cheng, J., Ma, Y., Thomas, W., Zhang, J., and Du, J. 2005. *Circ. Res.* Oct 13 ; Epub ahead of print), indicating a role of IKK β in p65 phosphorylation by Ang II. *Acknowledgments-* We thanks Drs. Sylvain Meloche and John Hiscott for reagents used in this study. We thank also Dr. Guy Servant for helpful discussions.

REFERENCES

1. Maas, R., and Boger, R. H. (2003) *Atheroscler Suppl* **4**(4), 5-17
2. Alderman, M. H., Madhavan, S., Ooi, W. L., Cohen, H., Sealey, J. E., and Laragh, J. H. (1991) *N. Engl. J. Med.* **324**, 1098-1104
3. Cambien, F., Poirier, O., Lecerf, L., Evans, A., Cambou, J. P., Arveiler, D., Luc, G., Bard, J. M., Bara, L., Ricard, S., and et al. (1992) *Nature* **359**(6396), 641-644.
4. Meade, T. W., Cooper, J. A., and Peart, W. S. (1993) *N. Engl. J. Med.* **329**, 616-619
5. Alderman, M. H. (1995) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **4**, 201-203
6. Kon, V., and Jabs, K. (2004) *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**(3), 291-297
7. De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., and Unger, T. H. (2000) *Pharmacol. Rev.* **52**, 415-472
8. Aberg, G., and Ferrer, P. (1990) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **15**, S65-S72
9. Chobanian, A. V., Haudenschild, C. C., Nickerson, C., and Hope, S. (1990) *Hypertension* **12**, 327-331
10. Chobanian, A. V., Haudenschild, C. C., Nickerson, C., and Hope, S. (1992) *Hypertension* **20**, 473-477
11. Furukawa, Y., Matsumori, A., Hirozane, T., and Sasayama, S. (1996) *Circulation* **93**, 333-339
12. Wassmann, S., Czech, T., Van Eickels, M., Fleming, I., Bohm, M., and Nickenig, G. (2004) *Circulation*
13. Schelling, P., Fischer, H., and Ganten, D. (1991) *J. Hypertens.* **9**, 3-15
14. Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1993). In: Raizada, M. K., Phillips, M. I., and Sumners, C. (eds). *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*, CRC Press, Inc, Boca Raton
15. Meloche, S., Pelletier, S., and Servant, M. J. (2000) *Mol Cell Biochem* **212**(1-2), 99-109.
16. Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., and Egido, J. (2003) *Int J Biochem Cell Biol* **35**(6), 881-900

17. Brasier, A. R., Recinos, A., 3rd, and Eledrisi, M. S. (2002) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(8), 1257-1266
18. Griendling, K. K., Ushio-Fukai, M., Lassegue, B., and Alexander, R. W. (1997) *Hypertension* **29**(1 Pt 2), 366-373.
19. Pahl, H. L. (1999) *Oncogene* **18**(49), 6853-6866
20. Kranzhofer, R., Schmidt, J., Pfeiffer, C. A., Hagl, S., Libby, P., and Kubler, W. (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(7), 1623-1629.
21. Ortego, M., Bustos, C., Hernandez-Presa, M. A., Tunon, J., Diaz, C., Hernandez, G., and Egido, J. (1999) *Atherosclerosis* **147**(2), 253-261.
22. Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Konig, S., Wittig, B., and Egido, J. (2000) *Circ Res* **86**(12), 1266-1272.
23. Funakoshi, Y., Ichiki, T., Shimokawa, H., Egashira, K., Takeda, K., Kaibuchi, K., Takeya, M., Yoshimura, T., and Takeshita, A. (2001) *Hypertension* **38**(1), 100-104.
24. Han, Y., Runge, M. S., and Brasier, A. R. (1999) *Circulation Research* **84**, 695-703
25. Pueyo, M. E., Gonzalez, W., Nicoletti, A., Savoie, F., Arnal, J. F., and Michel, J. B. (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(3), 645-651.
26. Wolf, G., Wenzel, U., Burns, K. D., Harris, R. C., Stahl, R. A., and Thaiss, F. (2002) *Kidney Int* **61**(6), 1986-1995
27. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2004) *Genes Dev* **18**(18), 2195-2224
28. Karin, M., Yamamoto, Y., and Wang, Q. M. (2004) *Nat Rev Drug Discov* **3**(1), 17-26
29. Lin, R., Beauparlant, P., Makris, C., Meloche, S., and Hiscott, J. (1996) *Mol.Cell.Biol.* **16**, 1401-1409
30. Chen, L. F., and Greene, W. C. (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5), 392-401
31. Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., and Chariot, A. (2005) *Trends Biochem Sci* **30**(1), 43-52
32. Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998) *Mol Cell* **1**(5), 661-671
33. Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003) *Embo J* **22**(6), 1313-1324

34. Wang, D., Westerheide, S. D., Hanson, J. L., and Baldwin, A. S., Jr. (2000) *J Biol Chem* **275**(42), 32592-32597
35. Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., and Toriumi, W. (1999) *J Biol Chem* **274**(43), 30353-30356
36. Bohuslav, J., Chen, L. F., Kwon, H., Mu, Y., and Greene, W. C. (2004) *J Biol Chem* **279**(25), 26115-26125
37. Buss, H., Dorrie, A., Schmitz, M. L., Hoffmann, E., Resch, K., and Kracht, M. (2004) *J Biol Chem*
38. Chen, L. F., Williams, S. A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J. M., Buckbinder, L., and Greene, W. C. (2005) *Mol Cell Biol* **25**(18), 7966-7975
39. Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G. Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005) *Nature* **434**(7037), 1138-1143
40. Zhang, L., Ma, Y., Zhang, J., Cheng, J., and Du, J. (2005) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(6), 1148-1153
41. Gravel, S. P., and Servant, M. J. (2005) *J Biol Chem* **280**(9), 7477-7486
42. Voisin, L., Foisy, S., Giasson, E., Lambert, C., Moreau, P., and Meloche, S. (2002) *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(2), C446-455
43. Kwon, H., Pelletier, N., DeLuca, C., Genin, P., Cisternas, S., Lin, R., Wainberg, M. A., and Hiscott, J. (1998) *Journal of Biological Chemistry* **273**, 7431-7440
44. Sun, Z., Arendt, C. W., Ellmeier, W., Schaeffer, E. M., Sunshine, M. J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P. L., and Littman, D. R. (2000) *Nature* **404**(6776), 402-407
45. Sano, M., Fukuda, K., Sato, T., Kawaguchi, H., Suematsu, M., Matsuda, S., Koyasu, S., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., Harada, M., Saito, Y., and Ogawa, S. (2001) *Circ Res* **89**(8), 661-669
46. Jiang, B., Xu, S., Hou, X., Pimentel, D. R., and Cohen, R. A. (2004) *J Biol Chem* **279**(19), 20363-20368
47. Bonizzi, G., and Karin, M. (2004) *Trends Immunol* **25**(6), 280-288

48. Wu, L., Iwai, M., Li, Z., Shiuchi, T., Min, L. J., Cui, T. X., Li, J. M., Okumura, M., Nahmias, C., and Horiuchi, M. (2004) *Mol Endocrinol* **18**(3), 666-678
49. Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D., and Baldwin, A. S. (2003) *Nature* **423**(6940), 659-663
50. Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., and Gaynor, R. B. (2003) *Nature* **423**(6940), 655-659
51. Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., Doi, T., and Saiki, I. (2003) *J Biol Chem* **278**(38), 36916-36923
52. Mattioli, I., Sebald, A., Bucher, C., Charles, R. P., Nakano, H., Doi, T., Kracht, M., and Schmitz, M. L. (2004) *J Immunol* **172**(10), 6336-6344
53. Schmidt-Ott, K. M., Kagiya, S., and Phillips, M. I. (2000) *Regul Pept* **93**(1-3), 65-77.
54. Funakoshi, Y., Ichiki, T., Ito, K., and Takeshita, A. (1999) *Hypertension* **34**(1), 118-125.
55. Lemarie, C. A., Esposito, B., Tedgui, A., and Lehoux, S. (2003) *Circ Res* **93**(3), 207-212
56. Skurk, T., van Harmelen, V., and Hauner, H. (2004) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(7), 1199-1203
57. Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B., and Pei, G. (2004) *Mol Cell* **14**(3), 303-317
58. Witherow, D. S., Garrison, T. R., Miller, W. E., and Lefkowitz, R. J. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23), 8603-8607
59. Eguchi, S., and Inagami, T. (2000) *Regul Pept* **91**(1-3), 13-20.
60. Shah, B. H., Neithardt, A., Chu, D. B., Shah, F. B., and Catt, K. J. (2006) *J Cell Physiol* **206**(1), 47-57
61. Romashkova, J. A., and Makarov, S. S. (1999) *Nature* **401**(6748), 86-90.
62. Tanaka, H., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2005) *J Biol Chem*

FOOTNOTES

The abbreviations used are: Ang II, angiotensin II; I κ B kinase, IKK; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; IP-10, interferon-gamma-inducible protein 10; TBK1, Tank-binding kinase 1; GPCR, G protein-coupled receptor; EGFR, epidermal growth factor receptor; VSMC, vascular smooth muscle cells; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; EGF, epidermal growth factor, IL-6, interleukin-6; siRNA, silencing RNA; AT1R, Ang II AT1 receptor.

This work was supported by a research grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.S. M.S. is a recipient from a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Awards in Health Sciences. P.M. is a CIHR scholar. A.D. and S.P.G are recipients of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.F.C. holds a studentship from Rx&D/CIHR.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. A NF- κ B superrepressor antagonizes Ang II-induced *IL-6* transcription in VSMC. **A)** Production of stable cell lines expressing NF- κ B superrepressor. VSMC were infected with a retroviral construct expressing the NF- κ B superrepressor (I κ B α 2N Δ 4) or encoding for the neomycin cassette only (Neo). Following selection of a stable population, clones were isolated and analyzed for the transgene expression by Western blot analysis. **B)** The expression of the NF- κ B superrepressor significantly abrogates Ang II-induced *IL-6* transcription. Quiescent Neo and I κ B α 2N Δ 4 clones were stimulated for different times with 100 nM Ang II. Total RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis with primers directed against rat *IL-6* and *MCP-1* transcripts. Normalization was accomplished using primers against the *RPL32* house keeping gene.

Figure 2. Activation of the canonical IKK complex in Ang II-treated VSMC. **A)** Quiescent VSMC were stimulated with 100 nM Ang II for different times or with 20 ng/ml TNF- α for 10 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-IKK γ antibody. The phosphotransferase activity of the immunoprecipitates was assayed as described in Experimental Procedures using GST-I κ B α as substrate. After the kinase assay, reactions were run on SDS-gels, dried and exposed to the TYPHOON image analyzer for quantification. **B)** The activation of the IKK complex is dose-dependent and mediated by the AT1R. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 1 μ M Irbezartan or 0.01% vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) and then stimulated with the indicated concentrations of Ang II for 5 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to in vitro kinase assay as described in A. **C)** IKK complex in vitro kinase assay is specific for Ser32/36 of I κ B α . Quiescent VSMC were stimulated for the indicated times with 100 nM Ang II. Whole cell extracts were prepared and the immunoprecipitated IKK complex was either incubated in the presence of GST-I κ B α wt or GST-I κ B α 2N in which the two phosphoacceptor sites were mutated to alanine. After the kinase assay, reactions were run on SDS-gels, dried and exposed to the TYPHOON image analyzer for quantification.

Figure 3. Ang II does not lead to N-terminal phosphorylation of I κ B α nor its degradation in VSMC. **A)** Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- α . Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-I κ B α antibody (panel *a*), anti-phospho-I κ B α (Ser32) antibody (panel *b*), and anti-I κ B β antibody (panel *c*). Normalization of the protein samples was conducted using anti- β -actin antibody (panel *d*). **B)** Turnover of I κ B α . Quiescent VSMC were pulse-labeled with [35 S]methionine/[35 S]cysteine for 60 min after which the medium was changed to fresh medium containing an excess of non-radiolabeled methionine/cysteine and 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- α . At different times, cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-I κ B α antibody.

After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 12% acrylamide gels and analyzed by fluorography using a TYPHOON image analyzer.

Figure 4. Ang II-induced rapid phosphorylation of p65 in VSMC. **A)** *in vivo* phosphorylation of p65. Quiescent VSMC were pulse-labeled with [³²P] orthophosphate for 5 hours after which the labeled cells were stimulated with 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- α . At different times, cells extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-p65 antibody. After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels and transferred to a PVDF membrane. The membrane was then exposed to a gel documentation device for imaging and quantification (TY) or revealed by immunoblotting (IB) with an anti-p65 antibody to confirm equal amount of immunoprecipitated proteins. **B)** Ser-536 phosphorylation of p65 by Ang II. Quiescent VSMC were stimulated for the indicated times with 100 nM Ang II, 20 ng/ml TNF- α and 100 ng/ml EGF. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody (*a*), anti-p65 antibody (*b*), anti-phospho-AKT (Ser473) antibody (*c*), and anti-phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) antibody (*d*). Membranes were stripped between each blotting experiment.

Figure 5. Ang II-induced Ser-536 phosphorylation of p65 is dependent of IKK β . **A)** Pharmacological inhibition of MEK blocks RSK activation by Ang II but not phosphorylation of p65 on Ser-536. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 30 μ M PD98049, 10 μ M U0126, or 0.01% DMSO and then stimulated with 100 nM Ang II for 10 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody (*upper panel*), anti-p65 antibody (*middle panel*), and anti-phospho-RSK (Ser380) antibody (*lower panel*). Membranes were stripped between each blotting experiment. **B)** Sustained inhibition of the MEK-ERK signaling cascade does not inhibit phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 10 μ M U0126, or 0.01% DMSO and then stimulated with 100 nM Ang II for

the indicated times. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) (panel *a*), anti-p65 (panel *b*), anti-phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) (panel *c*) or anti-phospho-RSK (panel *d*) antibodies. **C**) The kinetic of Ser-536 phosphorylation of p65 paralleled the activation of the IKK complex. Quiescent VSMC were stimulated for the indicated times with Ang II. Whole cell extracts were prepared and subjected to IKK complex kinase assay (*a*) as described in Fig. 2. For immunoblotting (lower panel), the upper part of the gel was probed with an anti-IKK β antibody to confirm equal amounts of the immunoprecipitated kinase complex (*b*). WCE were also analyzed by immunoblotting using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody (*c*) and anti-p65 antibody (*d*). Membranes were stripped between each blotting experiment. **D**) Ang II treatment leads to phosphorylation of p65 on Ser-536 in the cytoplasm. Quiescent VSMC were stimulated for the indicated periods of time with Ang II. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody and anti-p65. The purity of the nuclear fractions was demonstrated by the virtual exclusion of p105. Using a higher sensitivity setting on the documentation device allowed us to better appreciate the presence of p65 phosphorylated on Ser-536 in the nucleus (lower right panel). **E**) Overexpression of a dominant negative version of IKK β in 293T abrogates the phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II. 293T cells were cotransfected with AT1R in the presence of either pFlag-IKK β (K44A) or the vector alone. 30h posttransfection, cells were incubated in serum free medium for the next 18h before stimulation with Ang II (100 nM) for the indicated periods of time. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody and anti-Flag antibody as indicated. **F**) Reducing the expression level of IKK β inhibits the phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II. VSMC were transfected with a siCONTROL non-targeting silencing RNA (Control) or two different RNA duplexes designed to specifically target IKK β as indicated. 24 h post-transfection, cells were incubated in serum-free medium for 48 h and then stimulated with Ang II for the indicated time. Whole cell extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. Membranes were stripped between each blotting experiment.

Figure 6. Activation of the IKK complex by Ang II is independent of EGFR transactivation and the PI3-kinase pathway. A) Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 250 nM AG1478, or 0.01% DMSO and then stimulated for 10 min with 100 nM Ang II as indicated. In vitro IKK complex kinase assay was measured as described in Fig. 2. B) Quiescent parental (wt) and HERCD533 (mut) cells were stimulated with 100 nM Ang II for the indicated times and the phosphotransferase activity of the IKK complex was assayed as described above. C) Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 30 μ M LY294002, or 0.01% DMSO and then stimulated for 10 min with 100 nM Ang II. An IKK complex kinase assay was conducted as above.

Figure 7. Proposed model for the activation of NF- κ B by Ang II in VSMC. Following binding to AT1R, Ang II induces the transactivation of the EGFR which then transmits downstream signals to two different kinase modules: the Raf/MEK/ERK and the PI3-kinase/PDK/AKT modules (42,59,60). These signaling cascades are not involved in the activation of the canonical IKK complex by Ang II. Activated IKK complex is likely not able to engage I κ B α because of the possible recruitment of β arrestin to the latter (57,58). Instead, the IKK complex induces the phosphorylation of p65 at Ser-536 in a complex formed of I κ B α /p50/p65 in the cytoplasm (52). This complex shuttle in and out from the nucleus. A subpopulation of p65 phosphorylated at Ser-536 losses its affinity for I κ B α (36) thereby allowing a significant nuclear accumulation of p65 and engagement of the latter with coactivators (CBP/p300) (38) to κ B-response element found on NF- κ B-regulated genes. Phosphorylation of p65 on Ser-536 could also be involved in the increase turnover of the protein (39) thus regulating the overall NF- κ B response.

Supplemental Data : Figure 1. Increase DNA binding activity in VSMC exposed to Ang II. Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II. Nuclear extracts were prepared and subjected to EMSA analysis. The use of an anti-p50

antibody supershifted (SS) whereas p65 antibody inhibited the formation of the specific NF- κ B signal possibly by competing with the binding of the I κ B probe to p65.

Supplemental Data: Figure 2. A) Ang II does not lead to phosphorylation of I κ B α on tyrosine residues. Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II or 0.5 mM pervanadate, a tyrosine phosphatase inhibitor. Whole cell extracts (500 μ g) were prepared and subjected to immunoprecipitation with an anti-I κ B α antibody. After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 12% acrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes, which were then probed with an anti-phosphotyrosine antibody (upper panel). The membrane was stripped and reprobed with an anti-I κ B α antibody (lower panel). **B)** No processing of p105 is observed in Ang II-treated VSMC. Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II. Endogenous p105 and p50 proteins were detected in WCE (50 μ g) by immunoblotting using anti-p105/p50 antibody. The membrane was stripped and reprobed with an anti-I κ B α antibody (lower panel).

Supplemental Data: Figure 3. In vitro phosphorylation of the TAD domain of p65 by the IKK complex. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 1 μ M Irbezartan (lane 5) or 0.01% vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) (lanes 1 to 4) and then stimulated with 100 nM Ang II for the indicated periods of time (lanes 1 to 5) or with 20 ng/ml TNF- α for 10 min (lane 7). Whole cell extracts were prepared and the immunoprecipitated IKK complex was incubated in the presence of GST-p65 (354-551). After the kinase assay, reactions were run on SDS-gels, dried and exposed to the TYPHOON image analyzer.

Supplemental Data: Figure 4. Ang II treatment leads to nuclear accumulation of phosphorylated p65 in the presence of MG-132. Quiescent VSMC were pre-treated with 25 μ M MG-132 for 30 min and then stimulated for the indicated periods of time with Ang II. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody and anti-p65. The purity of the different fractions was

verified by the presence of Lamin A/C and p105 in the nuclear and cytoplasmic fractions respectively.

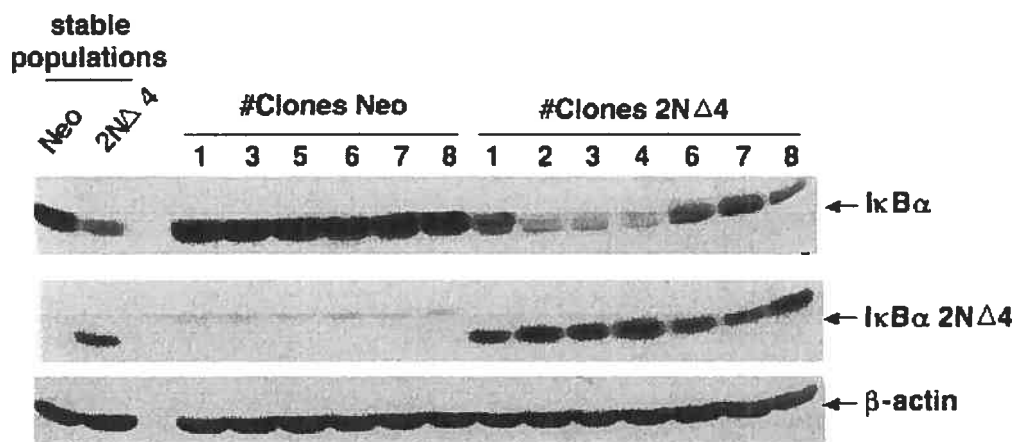
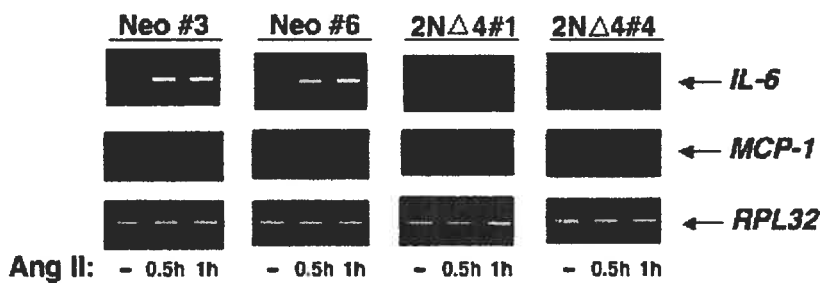
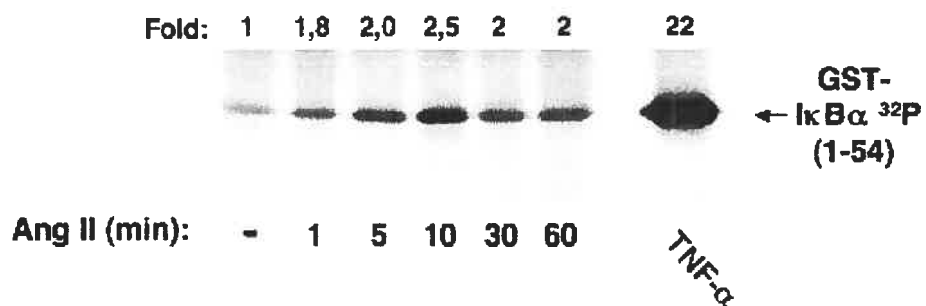
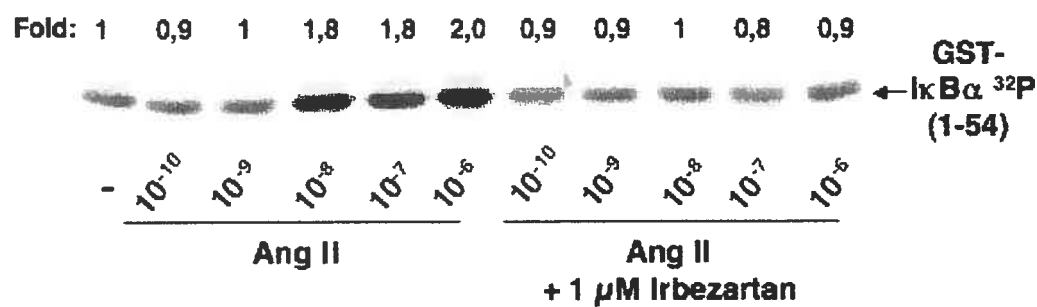
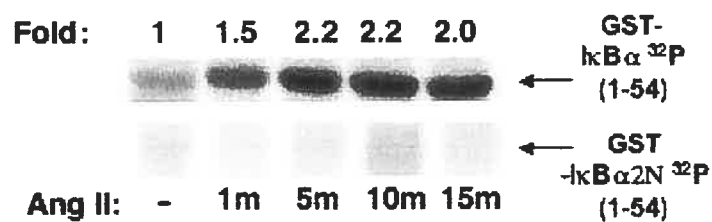
A**B**

Figure 1: A NF-κB superrepressor antagonizes Ang II-induced *IL-6* transcription in VSMC

A**B****C**

GST-lkB α wt (1-55): 21-KKGRLLDDRHD**S**GLD**S**MKDEEYEQMVKELQEIRLE-55
 GST-lkB α 2N (1-55): 21-KKGRLLDDRHD**A**GLD**A**MKDEEYEQMVKELQEIRLE-55

Figure 2: Activation of the canonical IKK complex in Ang II-treated VMSC

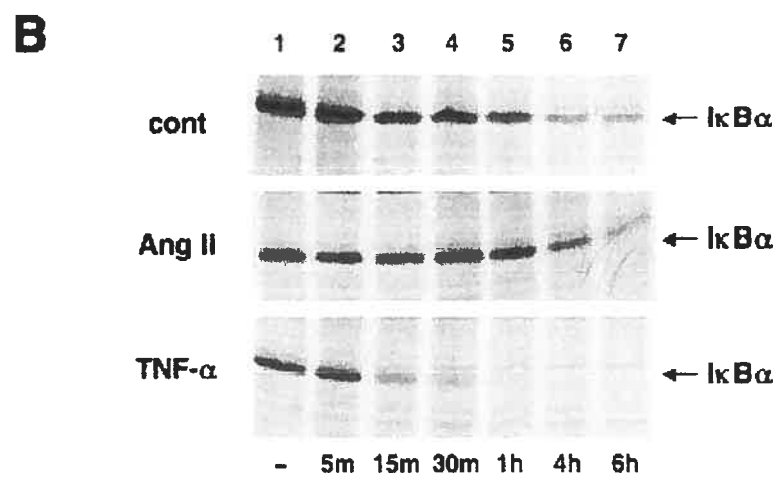
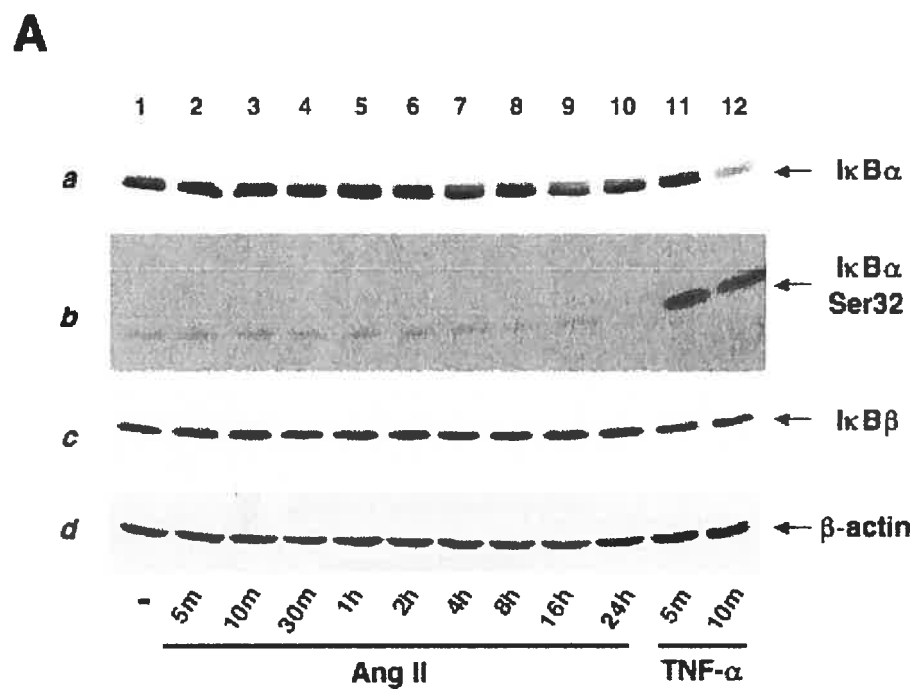


Figure 3: Ang II does not lead to N-terminal phosphorylation of IκBα nor degradation in VSMC

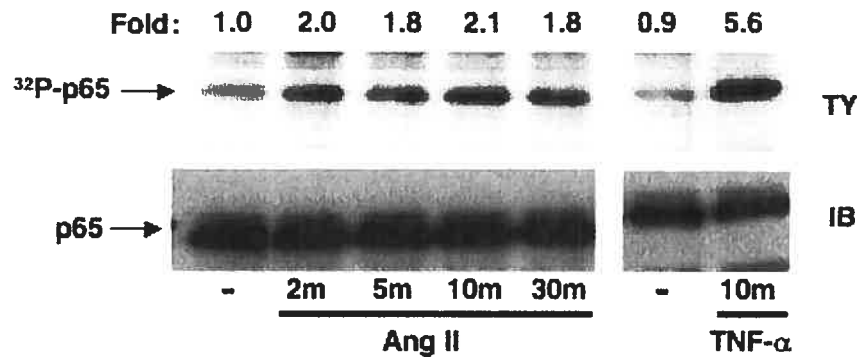
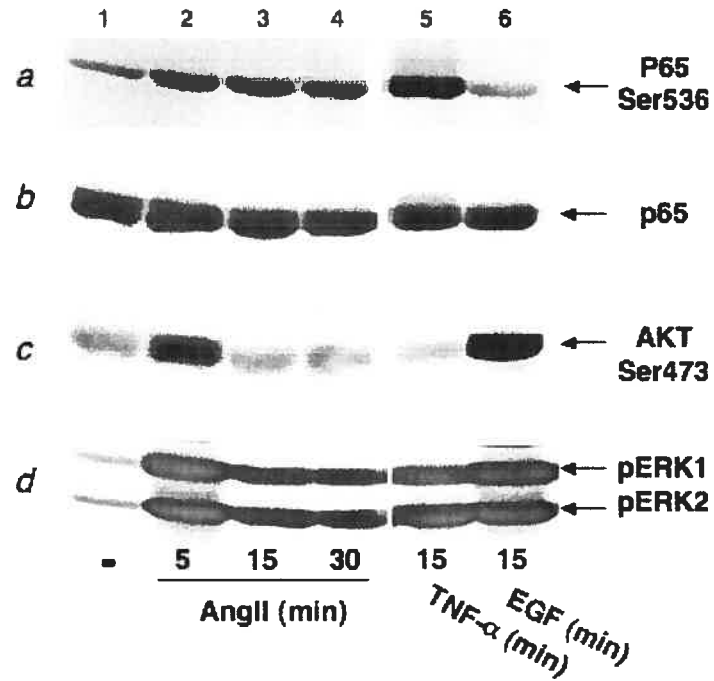
A**B**

Figure 4: Ang II-induced rapid phosphorylation of p65 in VSMC

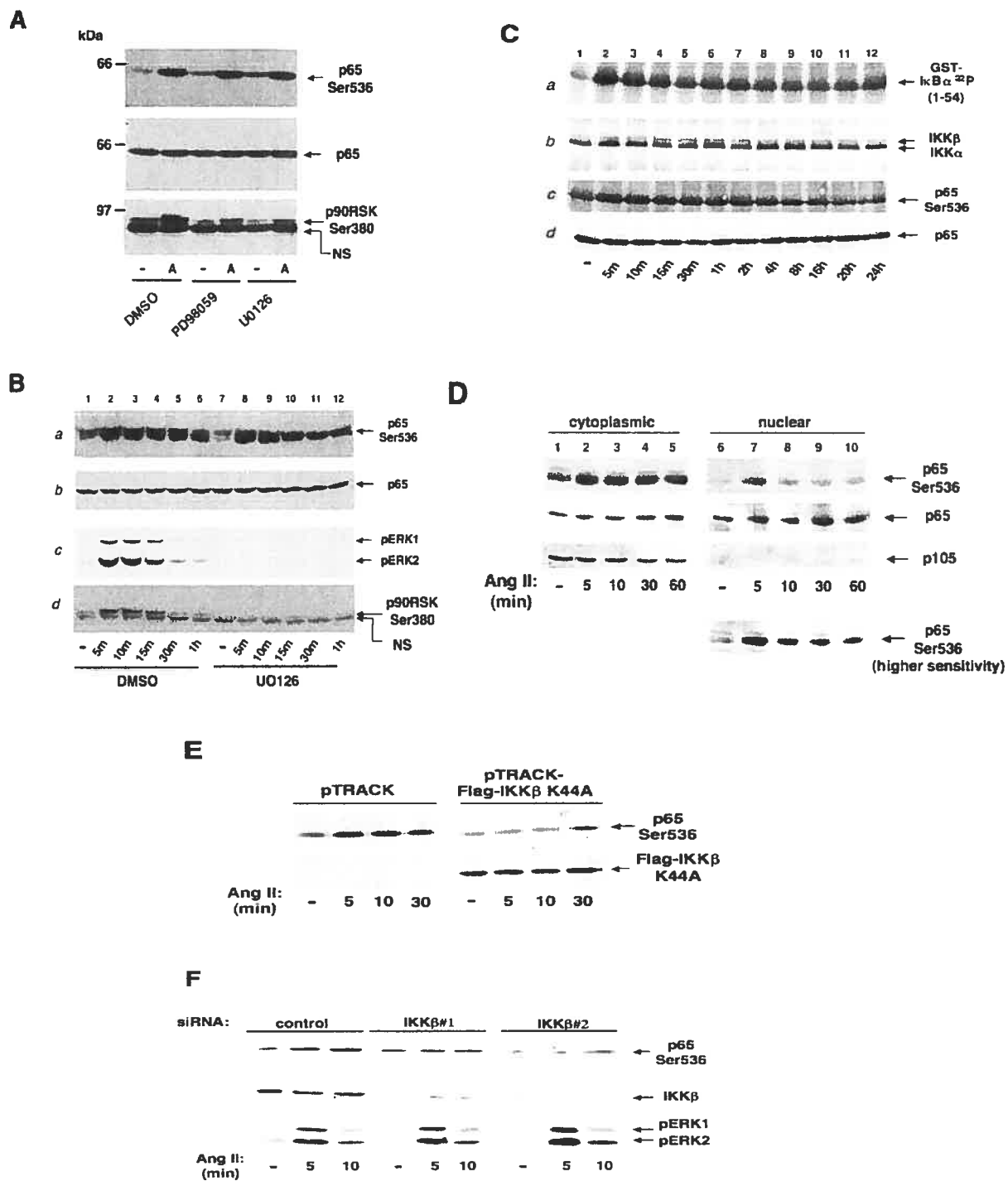


Figure 5: Ang II-induced Ser-536 phosphorylation of p65 is dependent of IKKβ

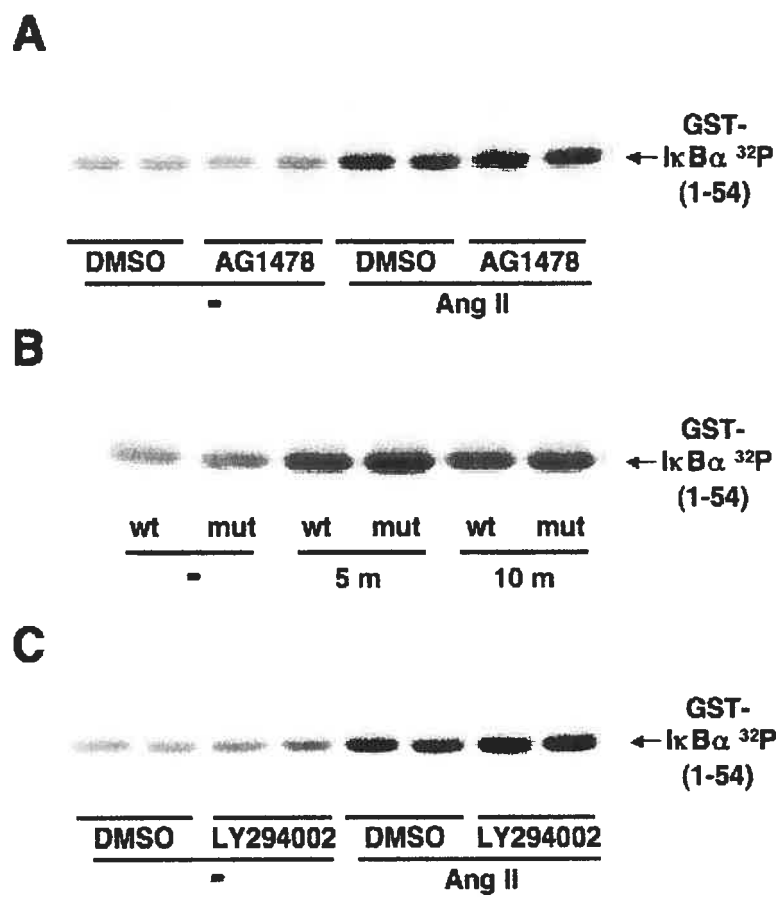


Figure 6: Activation of the IKK complex by Ang II is independent of EGFR transactivation and the PI3-kinase pathway

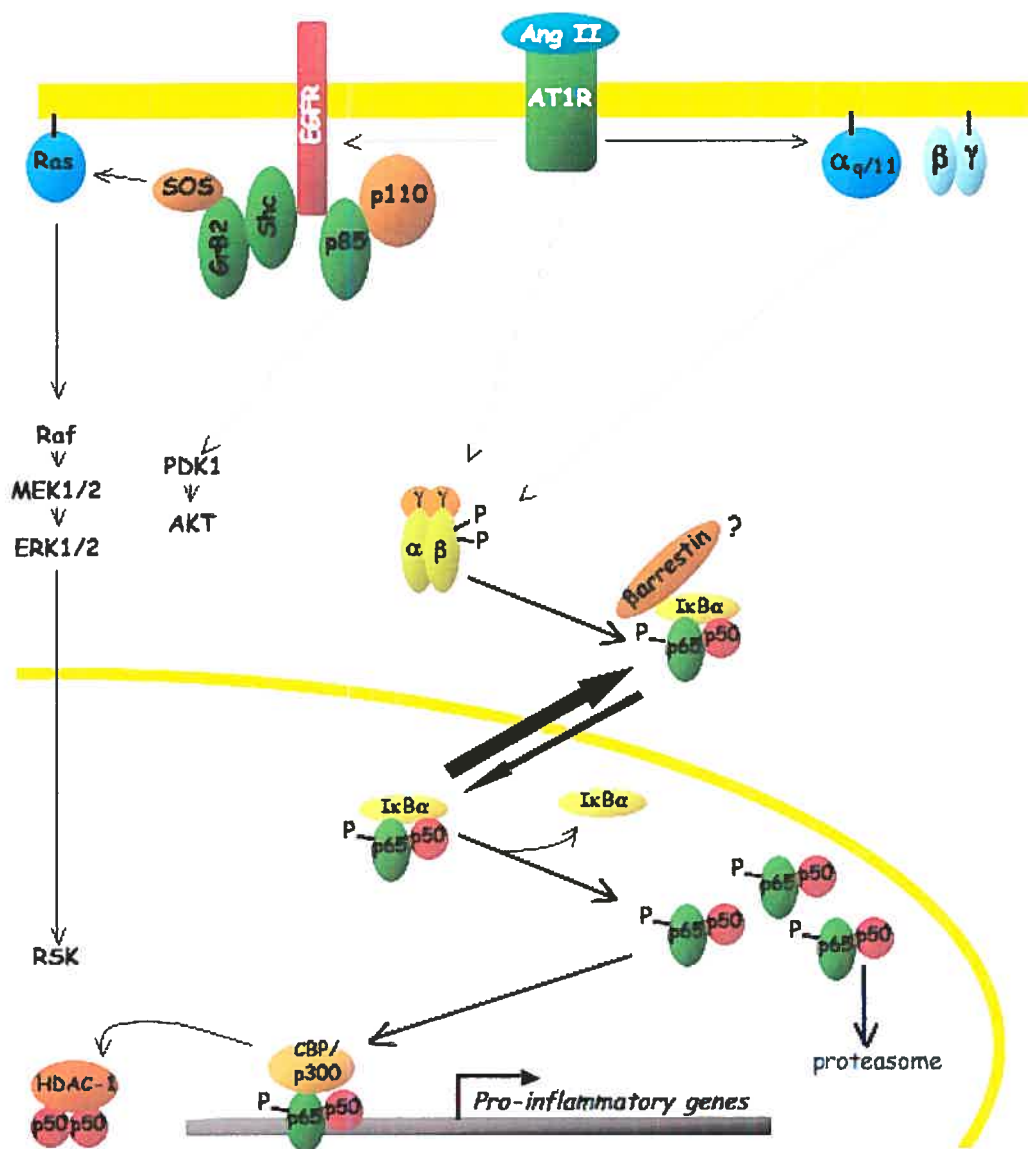


Figure 7: Proposed model for the activation of NF-κB by Ang II in VSMC

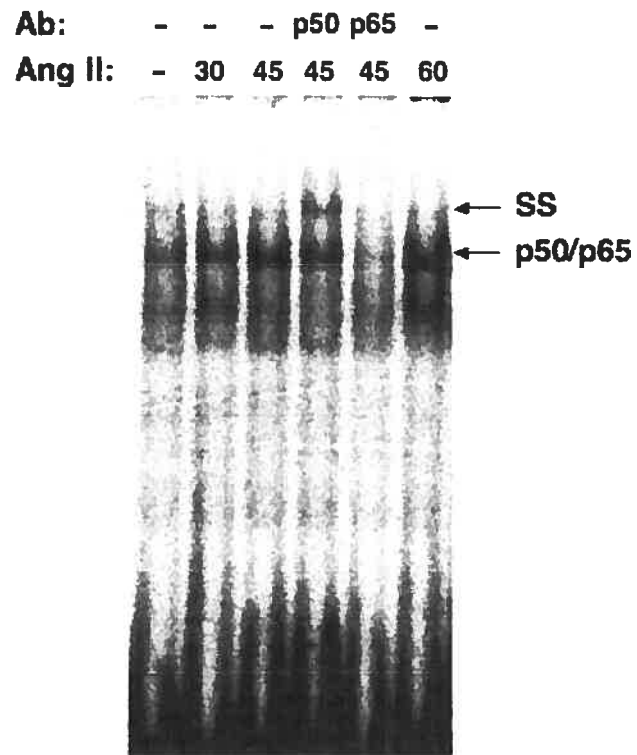


Figure supplémentaire 1: Increase DNA binding activity in VSMC exposed to Ang II

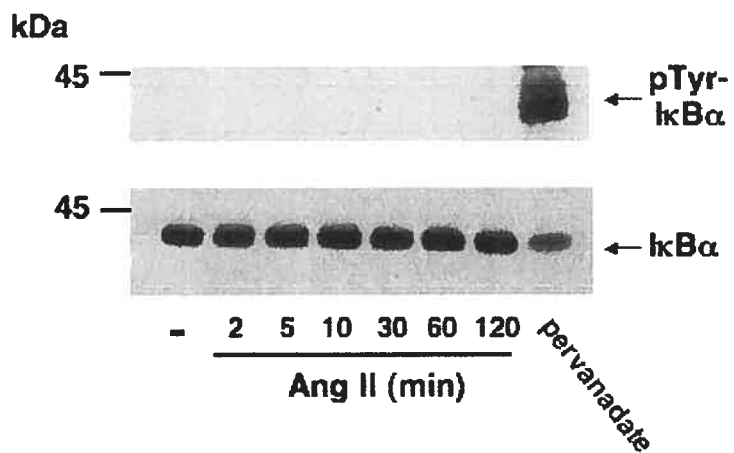
A

Figure supplémentaire 2A: Ang II does not lead to phosphorylation of IkBα on tyrosine residues

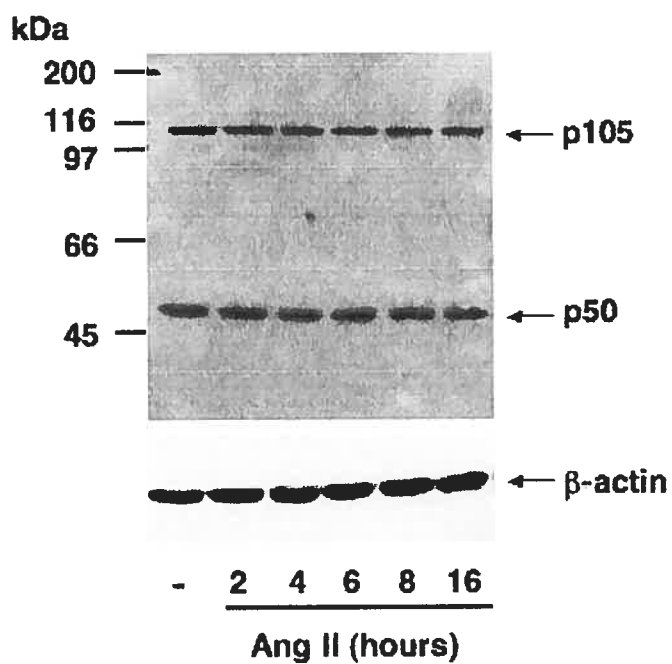
B

Figure supplémentaire 2B: No processing of p105 is observed in Ang II-treated VSMC.

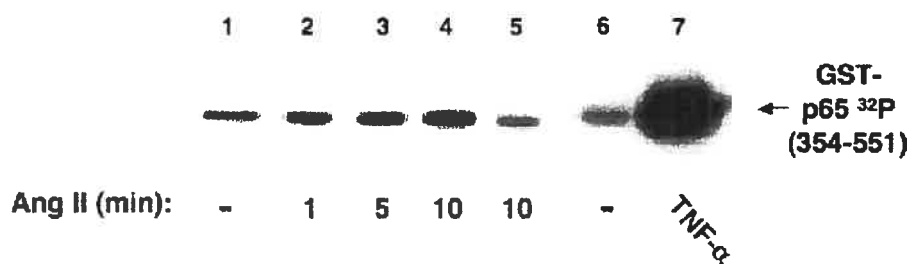


Figure supplémentaire 3: In vitro phosphorylation of the TAD of p65 by the IKK complex

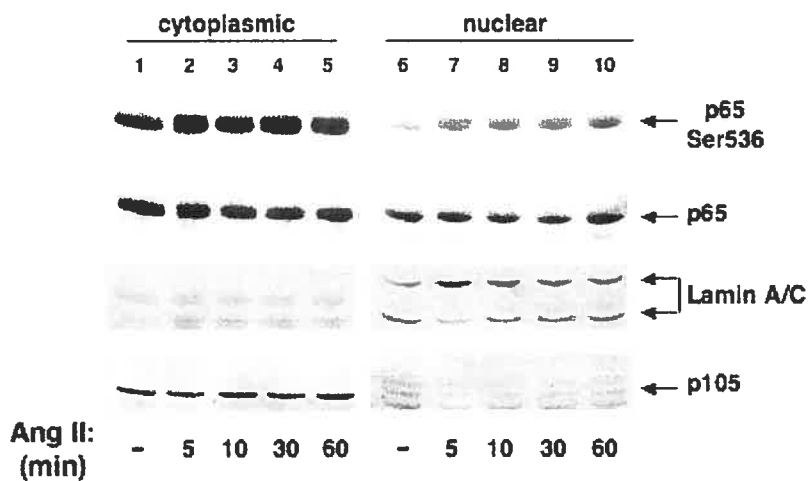


Figure supplémentaire 4: Ang II treatment leads to nuclear accumulation of phosphorylated p65 in the presence of MG-132

3 CHAPÎTRE III. DISCUSSION

3.1 Maladies cardiovasculaires et inflammation chronique

L'inflammation est maintenant bien connue pour être impliquée dans les maladies cardiovasculaires. En effet, certaines molécules inflammatoires sont connues pour être associées à une augmentation des risques cardiovasculaires. Parmi les plus connues, on retrouve IL-6, IL-10, ICAM-1, VCAM-1, le TNF- α et la C-reactive protein (CRP) qui est d'ailleurs maintenant reconnu comme un marqueur de choix. Ces molécules peuvent être utilisées comme biomarqueurs pour diagnostiquer les risques de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, les maladies coronariennes et les accidents vasculaires cérébrales (Ferrario and Strawn, 2006). D'ailleurs, dans le cas de l'athérosclérose en particulier, l'inflammation est impliquée dans toutes les phases du développement allant de la dysfonction endothéliale, à l'infiltration de cellules inflammatoires et à la déstabilisation de la plaque athéromateuse. L'Ang II joue un rôle clé dans la réponse inflammatoire et par le fait même dans l'athérosclérose. Elle va permettre le recrutement de cellules inflammatoires, des macrophages, qui à leur tour vont sécréter de l'Ang II créant ainsi un rétrocontrôle positif. Plusieurs molécules proinflammatoires sont produites suite à une stimulation à l'Ang II comme des molécules d'adhésion, des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance. Certaines sont produites directement suite aux effets de l'Ang II sur les cellules ou indirectement suite à l'activation de facteurs de transcription comme NF- κ B. Parmi les gènes induits suite à l'activation de NF- κ B par l'Ang II on retrouve principalement l'*IL-6*, *MCP-1*, *IL-8*, *RANTES*, *VCAM-1* et *ICAM-1* (Suzuki et al., 2003). Les liens sont cependant nébuleux entre l'activation de voie proinflammatoire comme celles menant à l'activation de NF- κ B et l'activation de GPCR comme l'AngII. L'importance de NF- κ B dans plusieurs pathologies cardiovasculaires et la quantité immense de stimuli qui peuvent l'activer mérite cependant que l'on se concentre sur la compréhension de ces modes d'activation. Notre étude avait d'ailleurs pour but de mieux comprendre le lien entre un régulateur de la pression artérielle, l'Ang II et un médiateur central de l'inflammation NF- κ B.

3.2 Implication de cette nouvelle voie dans les rôles physiologiques de l'Ang II

Certaines voies d'activation de NF- κ B sont plutôt bien caractérisées. Parmi les plus connues, on retrouve celle du TNF- α , de l'IL-1 β et des lipopolysaccharides. Cependant, pour ce qui est de l'Ang II le mode d'activation n'était pas connu. En fait, très peu de données existent sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B suite à l'activation d'un GPCR. Dans certain cas, l'activation du GPCR active une série de kinases dont AKT ou la PKC, ce qui permettrait l'activation du complexe IKK et de la voie classique par le fait même. La formation des ROS a également été proposée pour activer NF- κ B (Ye, 2001). Cependant, dans tous les cas, la cascade d'activation n'est pas entièrement comprise et plusieurs inconnus demeurent. Dans le cas du AT₁R et AT₂R, le peu d'information disponible est assez contradictoire. Les travaux effectués dans notre laboratoire ne démontrent aucune dégradation de I κ B α/β suite à la stimulation du AT₁R dans les CMLV (Figure 3, page 79). Ceci diffère avec d'autres équipes qui observaient une faible dégradation de l'inhibiteur (Han et al., 1999; Pueyo et al., 2000; Ye, 2001). Cependant, la faible dégradation de l'inhibiteur dans ces cas laisse supposer l'existence d'une autre voie d'activation. D'autres modes d'activation de NF- κ B suite à une stimulation à l'Ang II ont également été proposées par d'autres équipes. Parmi celles-ci, on retrouve la dégradation de p105 en p50 et la phosphorylation en tyrosines de I κ B α (Wu et al., 2004). Encore une fois les résultats que nous avons obtenus (Figure supplémentaire 2, page 85) diffèrent de ces équipes puisque ces deux paramètres ne sont pas modifiés suite à une stimulation à l'Ang II dans les CMLV. Les résultats générés par ces deux équipes n'ont pas été reproduits dans la littérature et nous n'avons pas d'explication qu'en à la variation observée.

Nous proposons donc un nouveau modèle dans lequel une stimulation du AT₁R par l'Ang II permet l'activation du complexe IKK. À notre connaissance, il s'agit de la première étude démontrant une activation significative du complexe IKK par un GPCR. Il

y a également eu une étude qui portait sur l'activation du complexe IKK par le carbachol mais rien de plus n'a été fait (Todisco et al., 1999). Une fois activé, le complexe IKK phosphoryle la sous-unité p65 de NF- κ B sur le résidu sérine 536. Cette voie d'activation de NF- κ B contribue aux effets proinflammatoires de l'Ang II. Il est cependant difficile de mesurer toute l'importance de la voie NF- κ B dans les effets proinflammatoire de l'Ang II au niveau cardiovasculaire puisque que d'autres facteurs de transcription sont également activés par l'Ang II. Parmi ces facteurs, on retrouve CREB et AP-1 qui sont aussi connus pour transactiver la transcription de gènes proinflammatoires (Funakoshi et al., 1999; Schmidt-Ott et al., 2000). De plus, la phosphorylation de p65 sur la sérine 536 s'observe non seulement dans les CMLV mais également dans les adipocytes traités à l'Ang II. Cette activation de NF- κ B dans les adipocytes peut donc en partie expliquer l'état d'inflammation chronique que l'on retrouve chez les patients obèses (Skurk et al., 2004). La phosphorylation de p65 s'observe aussi dans des segments artériels soumis à une pression élevée soutenue et contribuerait ainsi à l'activation de NF- κ B (Lemarie et al., 2003). Ces études portant sur la phosphorylation de p65 sur la sérine 536 permettent de faire un lien moléculaire entre l'inflammation causée suite à l'activation de NF- κ B et deux facteurs de risques bien connus de l'athérosclérose, soit l'obésité et l'hypertension.

3.3 Explication du modèle

Plusieurs travaux de recherches ont porté sur la dégradation de l'inhibiteur I κ B α et sur la production NF- κ B-dépendante de molécules proinflammatoire suite à une stimulation à l'Ang II (Brasier et al., 2000; Buss et al., 2004b; Chandrasekar et al., 2006; Funakoshi et al., 1999; Griendling et al., 1997; Han et al., 1999; Ortego et al., 1999; Skurk et al., 2004; Tummala et al., 1999; Wong et al., 2003; Wu et al., 2004; Zahradka et al., 2002). Cependant, aucune étude n'a vérifié si le complexe IKK ou si la voie canonique était activée par l'Ang II. Cette étude visait donc à clarifier la voie d'activation qui est impliquée. Les résultats qui ont été obtenus, dans le cadre de ce projet de recherche, nous

permettent d'élaborer un modèle pour expliquer la séquence d'évènement qui induit l'activation de NF- κ B suite à une stimulation à l'Ang II de CMLV (Figure 7, page 83).

Tout d'abord, à l'aide d'essais kinase *in vitro*, nous avons observé que la liaison de l'Ang II à son récepteur AT1 permet l'induction soutenue et concentration dépendante de l'activité phosphotransférase du complexe IKK (Figure 2, page 78 et 5C, page 81). Contrairement à ce qui est normalement observé, cette activation du complexe IKK n'amène pas la dégradation de I κ B α (Figure 3, page 79). La voie canonique d'activation de NF- κ B n'est donc pas impliquée dans ce cas. Alors comment peut-on expliquer que nous n'observons pas de dégradation de I κ B α dans notre modèle? Une étude récente a permis de mettre en évidence qu'il y avait un recrutement des β -arrestines sur I κ B α lorsque les cellules étaient exposées à une stimulation des récepteurs β -adrénergiques (Gao et al., 2004; Witherow et al., 2004). Dans ce cas, la liaison des β -arrestines à I κ B α avait pour effet d'empêcher la dégradation de l'inhibiteur induite suite à une stimulation au TNF- α (Gao et al., 2004). Le AT $_1$ R fait parti de la famille des GPCR qui sont connus pour subir une internalisation rapide suite à leur activation. L'internalisation favorise le recrutement de β -arrestines ce qui pourrait faciliter par la suite le recrutement des β -arrestines sur I κ B α . Des expériences sont présentement en cours pour vérifier cette hypothèse.

S'il n'y a pas de dégradation de l'inhibiteur, alors comment NF- κ B réussit-il à être activé? Une étude récente a démontré que la sous-unité p65 de NF- κ B était phosphorylée en Ser536 suite à une stimulation à l'Ang II dans les CMLV (Zhang et al., 2005). Leur étude concluait que cette phosphorylation était principalement effectuée par la kinase RSK. Pour vérifier leur hypothèse, ils ont utilisé un inhibiteur de MEK 1/2, le U0126, pour imhiber la voie MEK/ERK/RSK, ainsi que des ARN à interférence. Nos résultats diffèrent sensiblement de leur conclusion puisque nous avons observé que la phosphorylation de p65 en Ser536 dépendait plutôt du complexe IKK. En effet, dans notre cas, l'utilisation de deux inhibiteurs contre la kinase MEK 1/2, soit le PD98059 et le U0126 bloquait l'activation de RSK sans affecter la phosphorylation de p65 en Ser536 (Figure 5A et B, page 81).

Cependant, la cinétique d'activation du complexe IKK corrélait avec la cinétique de phosphorylation de p65 en Ser536 (Figure 5C, page 81). On remarque ainsi que lorsque l'activité phosphotransférase du complexe IKK diminue après quatre heures, la phosphorylation de la p65 sur la Ser536 diminue au même moment. De plus, nous avons observé que la phosphorylation se produisait principalement dans le cytoplasme (Figure 5D, page 81). Or, bien que IKK- β puisse phosphoryler p65 en Ser536 dans le cytoplasme (Mattioli et al., 2004; Sakurai et al., 2003), RSK quand à elle phosphoryle p65 exclusivement dans le noyau (Bohuslav et al., 2004). Encore une fois, cette observation laisse croire que c'est le complexe IKK et non RSK qui est impliquée dans la phosphorylation de p65 en Ser536 suite à une stimulation à l'Ang II. Pour s'assurer du rôle du complexe IKK, nous avons ensuite transfecté une version dominante négative de la kinase IKK- β dans des cellules 293T qui exprimaient le AT₁R, ce qui empêchait toute phosphorylation de p65 en Ser 536 lors d'une stimulation à l'Ang II. De plus, lorsque l'on régulait à la baisse l'expression de IKK- β à l'aide de siRNA dans les CMLV, on observait encore une fois qu'une stimulation à l'Ang II ne permettait plus la phosphorylation de p65 en Ser536. Nous ne pouvons expliquer pour le moment la différence entre notre étude et celle de Zhang et al. Les expériences avec les inhibiteurs PD98059 et U0126 ont été effectuées dans des CMLV provenant de deux espèces de rats différentes soit les Sprague-Dawley et les Wistar-Kyoto (Données non présentées). Dans les deux cas, nous n'avons observé aucune modulation de la phosphorylation de p65 en Ser536 en présence des inhibiteurs.

Dans notre modèle (Figure 7, page 83), la phosphorylation en Ser536 de p65 est suffisante pour activer NF- κ B même s'il n'y a pas de dégradation de l'inhibiteur pour libérer le complexe et permettre sa translocation dans le noyau. Le complexe formé de I κ B α et de NF- κ B se retrouve en équilibre entre le cytoplasme et le noyau. Cependant, comme le signal de localisation nucléaire (SLN) est masqué par I κ B α et que le signal d'export nucléaire (SEN) est quand à lui accessible, la proportion de NF- κ B dans le noyau est très faible. L'état de phosphorylation de p65 modifie néanmoins cet équilibre ainsi que

l'état d'activation de NF- κ B. En effet, il a été démontré qu'une forme phosphomimétique de p65 s'associait davantage à TAFII31 (Buss et al., 2004b) et augmentait le recrutement de p300 (Chen et al., 2005). La phosphorylation de p65 en Ser 536 augmente donc l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. De plus, il a été démontré que la phosphorylation de p53, une autre sous-unité de NF- κ B, permettait d'induire l'activation de NF- κ B sans qu'il y ait dégradation de I κ B α (Bohuslav et al., 2004). Cette étude proposait un modèle dans lequel la phosphorylation de p53 permettait d'augmenter sa présence au noyau ainsi que sa liaison à l'ADN (Bohuslav et al., 2004). À partir de ces données, nous proposons un modèle dans lequel, la phosphorylation de p65 en Ser536 diminue l'affinité de l'inhibiteur pour NF- κ B. Ceci expose donc, le SLN et permet une accumulation progressive d'une sous-population de p65 phosphorylé en Ser536 dans le noyau. P65 s'associe alors à TAFII31 et recrute CBP/p300 pour moduler les gènes sous le contrôle de NF- κ B. Il est également intéressant de noter que la phosphorylation en Ser536 augmente la dégradation de p65 (Lawrence et al., 2005). La phosphorylation de p65 en Ser 536 régule donc l'activité de NF- κ B suite à une stimulation à l'Ang II de façon positive, en augmentant l'accumulation nucléaire et l'activité de p65, et de façon négative, en augmentant la dégradation de p65.

Notre modèle n'explique pas cependant comment la signalisation entre le récepteur AT1 et l'activation du complexe IKK s'effectue. En effet, cette voie n'est pas comprise pour le moment. Nous avons donc effectué certains essais pour étudier ces voies. Il est connu que les GPCR sont capables de transactiver certains récepteurs à activité tyrosine kinase (Eguchi and Inagami, 2000; Shah et al., 2006; Voisin et al., 2002). Comme ces récepteurs sont impliqués dans la croissance et la survie des cellules, et que ces effets sont problématiques dans l'athérosclérose, nous avons cru intéressant de les étudier. Plus précisément, un lien très clair a été démontré entre la transactivation du EGFR suite à l'activation du récepteur AT1 et l'activation des voies MEK/ERK/RSK et PI 3-kinase/AKT (Romashkova and Makarov, 1999; Tanaka et al., 2005). Les kinase ERK et AKT sont également connus pour moduler la croissance et la survie cellulaire. De plus, il a été démontré que PDK-1 et AKT peuvent activer le complexe IKK. Nous avons donc vérifié si

la transactivation du EGFR et la voie PI 3-kinase/PDK/AKT étaient impliqués dans l'activation du complexe IKK par l'Ang II. Une approche pharmacologique et moléculaire n'a cependant pas permis d'établir un lien entre la transactivation du EGFR ou la voie PI 3-kinase/AKT et l'activation du complexe IKK.

3.4 Perspectives

3.4.1 Aspects moléculaires

La découverte de cette nouvelle voie d'activation de NF- κ B par l'Ang II dans les CMLV n'est que le début d'une série d'études qui pourront être réalisés dans le laboratoire. Tout d'abord, il serait intéressant d'étudier davantage I κ B α . Le fait qu'il ne soit pas dégradé suite à l'activation du complexe IKK demeure un mystère qu'il faudrait résoudre. Comme je l'ai mentionné, les β -arrestines pourraient jouer un rôle dans la protection de l'inhibiteur contre la dégradation et la phosphorylation (Gao et al., 2004; Kim et al., 2005). De plus, l'internalisation rapide du récepteur à l'ang II suite à son activation ne signifie pas un arrêt rapide de sa signalisation. En effet, les β -arrestines jouent également un rôle dans la signalisation de AT₁R internalisés (Hunyady and Catt, 2006). Comme nous n'avons pu identifier le lien entre le AT₁R et l'activation du complexe IKK, l'étude de cette voie pourrait permettre de mieux caractériser la voie d'activation IKK suite à une stimulation à l'Ang II. Une autre avenue pourrait également être explorée. Lors d'expériences préliminaires, j'ai obtenu des résultats intéressants qui démontrent que la tank-binding kinase (TBK-1) est activée suite à une stimulation à l'Ang II dans les CMLV. En essai kinase, la cinétique d'activation de TBK-1 est la même que celle du complexe IKK. De plus, il a été démontré que TBK pouvait à la fois activer le complexe IKK et phosphoryler p65 sur la Ser536 (Fujita et al., 2003). Elle est donc un bon candidat pour faire le lien entre AT₁R et le complexe IKK. Encore une fois, la signalisation qui relie l'activation d'un GPCR à l'activation de TBK-1 n'est pas connue. Il faudrait donc investiguer davantage sur les voies possiblement impliquées. Finalement, il est bien connu que les observations

produites *in vitro* ne sont pas toujours représentatives de celles faites *in vivo*. Il serait donc intéressant de ce rapporter à un modèle animal pour observer la phosphorylation de p65 *in vitro* et ses effets sur l'activation de NF- κ B.

3.4.2 Aspects cliniques

Cette étude est particulièrement importante puisqu'elle établit un lien entre l'Ang II, un régulateur de la pression artérielle, et l'activation de NF- κ B, un médiateur central de la réponse inflammatoire. La découverte de l'implication du complexe IKK et de la phosphorylation de p65 en Ser536 ouvre la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'athérosclérose.

Comme il a été mentionné dans l'introduction, les traitements actuels contre l'athérosclérose reposent principalement sur la modification des comportements à risque ou le traitement des facteurs de risque. Malgré tout, certains médicaments comme les statines semblent très efficaces pour traiter l'athérosclérose. Ces molécules sont efficaces autant sur les hommes que les femmes même s'ils sont à un niveau de risque élevé. Les effets vont au-delà de ceux ayant trait à la régulation du cholestérol sanguin (Shepherd, 2006). Il semble que les statines soient très efficaces pour diminuer la production de ROS, la migration des CMLV vers l'intima des vaisseaux en plus de diminuer la production de molécules proinflammatoire sous le contrôle de NF- κ B (Chandrasekar et al., 2006; Holschermann et al., 2006). Il a même été démontré que la combinaison d'une statines avec un inhibiteur du PPAR- γ permettait de bloquer le stress oxydatif médié par l'Ang II (Chen and Mehta, 2006). Il serait donc intéressant de vérifier si la nouvelle voie découverte pourrait être impliquée dans les effets des statines sur le traitement de l'athérosclérose.

De plus, il est possible d'agir sur l'activation du complexe IKK. En effet, il a été démontré que l'aspirine pouvait inhiber l'activité de la kinase IKK- β (Yin et al., 1998). Il est également intéressant de noter qu'une étude a noté que l'inhibition de la translocation de

p65 était indépendante de la dégradation de I κ B α par les inhibiteurs de COX-2 (Wong et al., 2003). Il est donc possible que l'aspirine puisse bloquer les effets proinflammatoires de l'Ang II en prévenant l'activation de IKK- β , empêchant ainsi la phosphorylation en Ser536 et, par le fait même, l'activation de NF- κ B. Il est également connu que plusieurs polyphénols, retrouvés dans le vin rouge, le thé ou le cacao, peuvent également agir sur l'activation du complexe IKK et ainsi prévenir l'activation des gènes sous le contrôle NF- κ B (Tsai et al., 1999). Il pourrait donc être intéressant encore une fois de vérifier si ces composés pourraient prévenir les effets pro-athérosclérotiques de l'Ang II.

Finalement, plusieurs composés pharmacologiques inhibants IKK β sont présentement étudiés par différentes compagnies. La plupart sont à l'étape d'étude pré-clinique pour le moment, mais certains semblent tout de même prometteurs. Le composé SPC-839 fait parti des molécules les plus étudiées en ce moment. Cet analogue de quinazoline développé par compagnie Celgene est assez spécifique pour IKK β comparativement à IKK α et réussit à inhiber IKK β ainsi que la production de *IL-6* et *IL-8* dans les cellules T-Jurkat (Karin et al., 2004). Il pourrait donc être envisagé comme outil thérapeutique contre le développement de l'athérosclérose.

4 Conclusion

En somme, ce projet de recherche permet de mieux comprendre comment l'Ang II active le facteur de transcription NF- κ B. Comme, l'inflammation chronique est souvent impliquée dans les maladies cardiovasculaires, cette étude revêtait une importance particulière puisqu'elle a permis d'établir un lien entre l'Ang II, un régulateur important de la pression artérielle, et l'activation de NF- κ B, un médiateur central de la réponse inflammatoire. Ainsi, nous avons d'abord pu démontrer que la liaison de l'Ang II à son récepteur AT1 permet l'activation de NF- κ B selon une voie non-classique. En effet, bien qu'il y ait activation du complexe IKK, nous n'observons aucune phosphorylation ou dégradation protéasome-dépendante de l'inhibiteur I κ B- α . Nous proposons donc une nouvelle voie d'activation de NF- κ B dans laquelle l'activation du récepteur AT1 permet la phosphorylation de p65 sur la sérine 536. Cette phosphorylation est indépendante de la voie MEK-ERK-RSK mais implique clairement l'activation de IKK β . Il est intéressant de noter que cette nouvelle voie d'activation de NF- κ B permet une meilleure compréhension du rôle joué par l'Ang II dans le développement de l'athérosclérose. De plus, cette étude met en lumière le rôle du complexe IKK dans les effets proinflammatoires de l'Ang II et pourrait permettre d'ouvrir la voie vers l'étude de nouveaux outils thérapeutiques ciblant ce complexe pour le traitement de l'athérosclérose. À cet effet, nous pouvons maintenant penser que les inhibiteurs spécifiques de IKK β tel que celui développé par la compagnie Celgen, le SPC-839, pourront un jour faire partie de l'arsenal thérapeutique pour traiter cette maladie.

Bibliographie

- Bohuslav, J., L.F. Chen, H. Kwon, Y. Mu, and W.C. Greene. 2004. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem.* 279:26115-25.
- Brasier, A.R., M. Jamaluddin, Y. Han, C. Patterson, and M.S. Runge. 2000. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem.* 212:155-69.
- Buss, H., A. Dorrie, M.L. Schmitz, R. Frank, M. Livingstone, K. Resch, and M. Kracht. 2004a. Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. *J Biol Chem.* 279:49571-4.
- Buss, H., A. Dorrie, M.L. Schmitz, E. Hoffmann, K. Resch, and M. Kracht. 2004b. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF-kappaB at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including IkappaB kinase (IKK)-alpha, IKK-beta, IKK-epsilon, TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J Biol Chem.* 279:55633-43.
- Candido, R., T.J. Allen, M. Lassila, Z. Cao, V. Thallas, M.E. Cooper, and K.A. Jandeleit-Dahm. 2004. Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis. *Circulation.* 109:1536-42.
- Carey, R.M. 2005. Update on the role of the AT2 receptor. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 14:67-71.
- Chandrasekar, B., S. Mummidi, L. Mahimainathan, D.N. Patel, S.R. Bailey, S.Z. Imam, W.C. Greene, and A.J. Valente. 2006. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin. *J Biol Chem.* 281:15099-109.
- Chen, J., and J.L. Mehta. 2006. Angiotensin II-mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts: blockade by pravastatin and pioglitazone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291:H1738-45.

- Chen, L.F., S.A. Williams, Y. Mu, H. Nakano, J.M. Duerr, L. Buckbinder, and W.C. Greene. 2005. NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol.* 25:7966-75.
- Choy, P.C., Y.L. Siow, D. Mymin, and K. O. 2004. Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol.* 82:212-24.
- Claing, A., S.A. Laporte, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz. 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol.* 66:61-79.
- De Caterina, R., A. Zampolli, S. Del Turco, R. Madonna, and M. Massaro. 2006. Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 83:421S-426S.
- de Gasparo, M., K.J. Catt, T. Inagami, J.W. Wright, and T. Unger. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 52:415-72.
- Dickson, B.C., and A.I. Gotlieb. 2003. Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Pathol.* 12:237-48.
- Eguchi, S., and T. Inagami. 2000. Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept.* 91:13-20.
- Eguchi, S., K. Numaguchi, H. Iwasaki, T. Matsumoto, T. Yamakawa, H. Utsunomiya, E.D. Motley, H. Kawakatsu, K.M. Owada, Y. Hirata, F. Marumo, and T. Inagami. 1998. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 273:8890-6.
- Falk, E. 1992. Why do plaques rupture? *Circulation.* 86:III30-42.
- Falk, E. 2006. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 47:C7-12.
- Ferrario, C.M., R.S. Richmond, R. Smith, P. Levy, W.B. Strawn, and S. Kivlighn. 2004. Renin-angiotensin system as a therapeutic target in managing atherosclerosis. *Am J Ther.* 11:44-53.
- Ferrario, C.M., and W.B. Strawn. 2006. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 98:121-8.
- Fujita, F., Y. Taniguchi, T. Kato, Y. Narita, A. Furuya, T. Ogawa, H. Sakurai, T. Joh, M. Itoh, M. Delhase, M. Karin, and M. Nakanishi. 2003. Identification of

- NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol.* 23:7780-93.
- Funakoshi, Y., T. Ichiki, K. Ito, and A. Takeshita. 1999. Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 34:118-25.
- Gao, H., Y. Sun, Y. Wu, B. Luan, Y. Wang, B. Qu, and G. Pei. 2004. Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell.* 14:303-17.
- Gertz, S.D., and W.C. Roberts. 1990. Hemodynamic shear force in rupture of coronary arterial atherosclerotic plaques. *Am J Cardiol.* 66:1368-72.
- Griendling, K.K., M. Ushio-Fukai, B. Lassegue, and R.W. Alexander. 1997. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension.* 29:366-73.
- Hafidh, S., N. Senkottaiyan, D. Villarreal, and M.A. Alpert. 2005. Management of the metabolic syndrome. *Am J Med Sci.* 330:343-51.
- Han, Y., M.S. Runge, and A.R. Brasier. 1999. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res.* 84:695-703.
- Hansson, G.K., and P. Libby. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 6:508-19.
- Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18:2195-224.
- Hein, L., G.S. Barsh, R.E. Pratt, V.J. Dzau, and B.K. Kobilka. 1995. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature.* 377:744-7.
- Hein, L., L. Meinel, R.E. Pratt, V.J. Dzau, and B.K. Kobilka. 1997. Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol.* 11:1266-77.
- Holschermann, H., D. Schuster, B. Parviz, W. Haberbosch, H. Tillmanns, and H. Muth. 2006. Statins prevent NF-kappaB transactivation independently of the IKK-pathway in human endothelial cells. *Atherosclerosis.* 185:240-5.
- Hunyady, L., and K.J. Catt. 2006. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol.* 20:953-70.

- Hunyady, L., K.J. Catt, A.J. Clark, and Z. Gaborik. 2000. Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul Pept.* 91:29-44.
- Ichiki, T., P.A. Labosky, C. Shiota, S. Okuyama, Y. Imagawa, A. Fogo, F. Niimura, I. Ichikawa, B.L. Hogan, and T. Inagami. 1995. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 377:748-50.
- Karin, M., Y. Yamamoto, and Q.M. Wang. 2004. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 3:17-26.
- Kaschina, E., and T. Unger. 2003. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 12:70-88.
- Kim, J., S. Ahn, X.R. Ren, E.J. Whalen, E. Reiter, H. Wei, and R.J. Lefkowitz. 2005. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:1442-7.
- Kon, V., and K. Jabs. 2004. Angiotensin in atherosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 13:291-7.
- Lawrence, T., M. Bebien, G.Y. Liu, V. Nizet, and M. Karin. 2005. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature.* 434:1138-43.
- Lemarie, C.A., B. Esposito, A. Tedgui, and S. Lehoux. 2003. Pressure-induced vascular activation of nuclear factor-kappaB: role in cell survival. *Circ Res.* 93:207-12.
- Lilly, L. 2003. Pathophysiology of Heart Disease. A collaborative Project of Medical Students and Faculty. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore. 445 pp.
- Lonn, E., and J. Grewal. 2006. Drug therapies in the secondary prevention of cardiovascular diseases: Successes, shortcomings and future directions. *Curr Vasc Pharmacol.* 4:253-68.
- Lowe, G.O. 2003. Different locations of atherosclerosis--different risk factors, different therapies? *Pathophysiol Haemost Thromb.* 33:262-6.
- Maas, R., and R.H. Boger. 2003. Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities. *Atheroscler Suppl.* 4:5-17.
- Marieb, E.N. 1999. Anatomie et physiologie humaines. 1194 pp.

- Matsuura, E., K. Kobayashi, M. Tabuchi, and L.R. Lopez. 2006. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res.* 45:466-86.
- Mattioli, I., A. Sebald, C. Bucher, R.P. Charles, H. Nakano, T. Doi, M. Kracht, and M.L. Schmitz. 2004. Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import. *J Immunol.* 172:6336-44.
- Merlini, P.A., K.A. Bauer, L. Oltrona, D. Ardissino, M. Cattaneo, C. Belli, P.M. Mannucci, and R.D. Rosenberg. 1994. Persistent activation of coagulation mechanism in unstable angina and myocardial infarction. *Circulation.* 90:61-8.
- Miyazaki, M., and S. Takai. 2006. Tissue Angiotensin II Generating System by Angiotensin-Converting Enzyme and Chymase. *J Pharmacol Sci.* 100:391-7.
- Newby, A.C., and A.B. Zaltsman. 1999. Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res.* 41:345-60.
- Nicholson, A.C., and D.P. Hajjar. 2004. CD36, oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 41:139-46.
- Ortego, M., C. Bustos, M.A. Hernandez-Presa, J. Tunon, C. Diaz, G. Hernandez, and J. Egido. 1999. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis.* 147:253-61.
- Pahl, H.L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18:6853-66.
- Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz. 2006. Physiology of local Renin-Angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86:747-803.
- Pueyo, M.E., W. Gonzalez, A. Nicoletti, F. Savoie, J.F. Arnal, and J.B. Michel. 2000. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:645-51.
- Rocha, S., A.M. Martin, D.W. Meek, and N.D. Perkins. 2003. p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol.* 23:4713-27.

- Romashkova, J.A., and S.S. Makarov. 1999. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*. 401:86-90.
- Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, Y. Suzuki, M. Ruperez, and J. Egido. 2001. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 10:321-9.
- Sakurai, H., S. Suzuki, N. Kawasaki, H. Nakano, T. Okazaki, A. Chino, T. Doi, and I. Saiki. 2003. Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem*. 278:36916-23.
- Schmidt-Ott, K.M., S. Kagiya, and M.I. Phillips. 2000. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept*. 93:65-77.
- Schroeder, A.P., and E. Falk. 1995. Vulnerable and dangerous coronary plaques. *Atherosclerosis*. 118 Suppl:S141-9.
- Shah, B.H., A. Neithardt, D.B. Chu, F.B. Shah, and K.J. Catt. 2006. Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs. *J Cell Physiol*. 206:47-57.
- Shepherd, J. 2006. Who should receive a statin these days? Lessons from recent clinical trials. *J Intern Med*. 260:305-19.
- Skalen, K., M. Gustafsson, E.K. Rydberg, L.M. Hulten, O. Wiklund, T.L. Innerarity, and J. Boren. 2002. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 417:750-4.
- Skurk, T., V. van Harmelen, and H. Hauner. 2004. Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24:1199-203.
- Streblov, D.N., S.L. Orloff, and J.A. Nelson. 2001. Do pathogens accelerate atherosclerosis? *J Nutr*. 131:2798S-2804S.
- Suzuki, Y., M. Ruiz-Ortega, O. Lorenzo, M. Ruperez, V. Esteban, and J. Egido. 2003. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*. 35:881-900.
- Tanaka, H., N. Fujita, and T. Tsuruo. 2005. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1-mediated IkappaB kinase beta (IkkB) phosphorylation activates NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*. 280:40965-73.
- Todisco, A., S. Ramamoorthy, N. Pausawasdi, and K. Tacey. 1999. Carbachol activates IkappaB kinase in isolated canine gastric parietal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 261:877-84.

- Touyz, R.M., and C. Berry. 2002. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res.* 35:1001-15.
- Touyz, R.M., and E.L. Schiffrin. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 52:639-72.
- Tsai, S.H., Y.C. Liang, S.Y. Lin-Shiau, and J.K. Lin. 1999. Suppression of TNF α -mediated NF κ B activity by myricetin and other flavonoids through downregulating the activity of IKK in ECV304 cells. *J Cell Biochem.* 74:606-15.
- Tummala, P.E., X.L. Chen, C.L. Sundell, J.B. Laursen, C.P. Hammes, R.W. Alexander, D.G. Harrison, and R.M. Medford. 1999. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation.* 100:1223-9.
- Voisin, L., S. Foisy, E. Giasson, C. Lambert, P. Moreau, and S. Meloche. 2002. EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:C446-55.
- Wassmann, S., T. Czech, M. van Eickels, I. Fleming, M. Bohm, and G. Nickenig. 2004. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation.* 110:3062-7.
- Witherow, D.S., T.R. Garrison, W.E. Miller, and R.J. Lefkowitz. 2004. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8603-7.
- Wolf, G., U. Wenzel, K.D. Burns, R.C. Harris, R.A. Stahl, and F. Thaiss. 2002. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int.* 61:1986-95.
- Wong, B.C., X. Jiang, X.M. Fan, M.C. Lin, S.H. Jiang, S.K. Lam, and H.F. Kung. 2003. Suppression of RelA/p65 nuclear translocation independent of IkappaB-alpha degradation by cyclooxygenase-2 inhibitor in gastric cancer. *Oncogene.* 22:1189-97.
- Wu, L., M. Iwai, Z. Li, T. Shiuchi, L.J. Min, T.X. Cui, J.M. Li, M. Okumura, C. Nahmias, and M. Horiuchi. 2004. Regulation of inhibitory protein-kappaB and monocyte chemoattractant protein-1 by angiotensin II type 2 receptor-activated Src homology protein tyrosine phosphatase-1 in fetal vascular smooth muscle cells. *Mol Endocrinol.* 18:666-78.

- Ye, R.D. 2001. Regulation of nuclear factor kappaB activation by G-protein-coupled receptors. *J Leukoc Biol.* 70:839-48.
- Yin, M.J., Y. Yamamoto, and R.B. Gaynor. 1998. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature.* 396:77-80.
- Zahradka, P., B. Litchie, B. Storie, and G. Helwer. 2004. Transactivation of the insulin-like growth factor-I receptor by angiotensin II mediates downstream signaling from the angiotensin II type 1 receptor to phosphatidylinositol 3-kinase. *Endocrinology.* 145:2978-87.
- Zahradka, P., J.P. Werner, S. Buhay, B. Litchie, G. Helwer, and S. Thomas. 2002. NF-kappaB activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 34:1609-21.
- Zhang, L., Y. Ma, J. Zhang, J. Cheng, and J. Du. 2005. A new cellular signaling mechanism for angiotensin II activation of NF-kappaB: An IkappaB-independent, RSK-mediated phosphorylation of p65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1148-53.