HAL
open science

Evaluation de la fonction de NOX1 sur modèle animal transgènique

Gaetan Gavazzi

To cite this version:

Gaetan Gavazzi. Evaluation de la fonction de NOX1 sur modèle animal transgènique. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00145555

HAL Id: tel-00145555

https://theses.hal.science/tel-00145555v1

Submitted on 10 May 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

N°

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE – GRENOBLE 1 - JOSEPH FOURIER

Ecole doctorale de Chimie et Science du Vivant

Biologie structurale et nanotechnologie

Evaluation de la fonction de NOX1 sur modèle animal transgènique

Gaëtan GAVAZZI

Soutenance : 9 juin 2006

Thèse dirigée par : Pr Karl–Heinz Krause /Françoise Morel

Membres du Jury

Pr Françoise Morel	Présidente
Dr Corinne Dupuy,	Rapporteur
Dr Patrick Lacolley,	Rapporteur
Pr Gille Faury	Examinateur
Pr Alain Franco	Examinateur
Pr Karl–Heinz Krause	Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du laboratoire de biologie du vieillissement (Hôpitaux Universitaire de Genève, Suisse) et du Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire (GREPI EA 2938 /CHU Grenoble, France)

Remerciements

« Rien ne sert de courir….Il faut goûter tout son temps, lentement,
……. Mais sans attendre »

Anonyme

Je voudrais remercier tous les membres du jury d'avoir accepter de participer à ce jury de thèse. En particulier Mme le Dr C Dupuy et au Dr P. Lacolley qui ont eu à goûter aux péripéties de fin de thèse.

à Karl–Heinz Krause qui m'accompagne depuis plusieurs années entre Suisse et France, entre Science et gériatrie, entre dégustations œnologiques et quelques courses à pied. Que cela continue……

Un remerciement spécial au Pr. Françoise Morel qui a toujours su me conseiller dans la longue route du travail scientifique forte de son expérience à accueillir ces médecins un peu perdus qui « tombent en science ». J'espère être à la hauteur de sa confiance.

Un remerciement particulier au Pr. Alain Franco qui, en tant que gériatre, a su m'accueillir dans sa discipline et me permettre de m'y ancrer et, en tant qu'enseignant à su m'apprendre que l'on peut faire beaucoup de chose à la fois.

Un grand Merci à tous les membres du (ex) Laboratoire de biologie du vieillissement, en particulier, à Christine (++) Thérèse, Charlie, Hélène, Karen, Michela, et aussi un dernier venu Angelo…pour le temps passé avec eux et leurs aides non comptables.

Pour tous les Autres…..un spécial « thank ».....aussi

Ils sont nombreux, amis d'ici et d'ailleurs, amis présents, amis absents auxquels je pense. En espérant être fidèle à eux et à ce que nous sommes,

……..qu'ils soient avant tout remercier d'être ce qu'ils sont …

Mais non il y a aussi les Autres/Autres,

Pour qui aucun remerciement ne convient

……Et je ne peux pas oublier ces quelques uns qui peuplent mon quotidien…….
Claudine, Emma, Clarisse….s'il y a une seule raison c'est vous
Pierrot et Colette, Pierre et Maryse
Michel et Paulette, Pascale, Laure, Jacky, Laurent, Aurore, Léa, Ange, Perrine et, Alban

Table des Matières

Liste de des Abréviations 6

Résumé (Français) 8

Abstract (English) 9

Introduction 11

1. NOX homologues, structures, activation et régulation 12

A. NOX2 14

a) Structure 14
b) Activation 14
c) Régulation 15

B. NOX3 16

C. NOX 4 17

D. NOX5 18

E. DUOX1 / DUOX2 19

F. NOX1 20

a) Structure 20
b) Activation 20
c) Régulation 21

2. NOX homologues, fonctions communes et particularités 23

A. Fonctions communes 23

B. Fonctions spécifiques 25

a) NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 et DUOX 25
b) NOX1 27

3. Hypothèses de travail 33

Modèle Animal - la souris déficente pour NOX1 35

1. Construction du modèle 35

2. Phénotype 38

Evaluation de la fonction de NOX1 *in vivo* au niveau colique 40

1. Méthode 40

A. Protocole dextran sulfate sodium (DSS) 40

B. Modèle de neutropénie 43

C. Analyses Statistiques 45

2. Résultats 45

A. Les colites au DSS sont plus sévères chez les souris déficientes pour NOX 1 45

B. Les bactéries sont impliquées dans la sévérité de l'atteinte de la colite à DSS chez les souris déficientes pour NOX1. 51

C. Les Neutropénies induites au 5 FU sont plus sévères chez les souris déficientes pour NOX1 54

3. Discussion 60

A. La colite au DSS est plus sévère chez les souris déficientes pour NOX1 60

a) NOX1 et proliféraion cellulaire colique 64
b) NOX1 et NO 65
c) NOX1 participe aux défenses antimicrobiennes coliques 67

B. NOX1 limite-t-elle la translocation bactérienne ? 70

C. Conclusions concernant la fonction Colique de NOX1 71

Fonction vasculaire de NOX1 74

1. Introduction 74

2. Methodes 76

A. Les animaux 76

B. Mesures des pressions artérielle et paramètres cliniques 76

C. Préparation et implantation des minipompes 77

D. Préparations des tissus 77

E. Analyses d'imagerie quantitative 78

F. Puce à ADN à partir du tissu aortique 79
G. PCR temps réel 80
H. Mesures des concentrations plasmatiques de NOx (nitrate/nitrite) 80
I. Analyses Statistiques 81
3. Résultats 81
A. La Production d'ERO au niveau de la média aortique est dépendante de NOX1 81
B. Les souris déficientes pour NOX1 présentent une diminution de la pression artérielle systolique. 84
C. NOX1 participe à la survenue de dissection aortique. 86
D. NOX1 participe à la survenue de l'hypertrophie médiale mais pas à la prolifération cellulaire 88
E. NOX1 participe à l'accumulation de la Matrice Extracellulaire. 92
F. NOX1 et l'angiotensine II entrainent une modification d'expression génique dans l'aorte. 95
G. DDAH1 et nitrite oxyde 100
4. Discussion 104
A. NOX1 et pression artérielle 104
B. NOX1 et dissection aortique 107
C. Rôle de NOX1 dans le remodelage vasculaire induit par l'angiotensine II 108
D. NOX1, DDAH-1 et la voie du NO 110
Conclusions et Perspectives 111
Références 112
Annexe 1 : Article publié 124

Liste de des Abréviations

AIR	Région auto-inhibitrice
AP-1	Activating protein 1
ADNc	Acide dexoxyribonucleique complémentaire
ARNm	Acide ribonucleique messager
BMP4	Bone morphogenic protein 4
CaCo2	Human colon carcinoma cell line
AMPc	Adenosine 3', 5' -mono-phosphate cyclique
CMLV	Cellules musculaires lisses des vaisseaux
COX-2	Cyclooxygenase-2
DDAH1	Dimethylarginine dimethylamino-hydrolase 1
DEN	Diethylnitrosamine
DPI	Diphenyleneiodonium
DUOX	Dual oxidase
EF hand	Calcium-binding motif composed of two helixes (E and F)
EGF	Epidermal growth factor
ERO	Espèces réactives dérivées de l'Oxygène
EST	Expressed sequence tag
FAD	Flavin adenine dinucleotide
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
IFN-γ	Interferon-γ
IL-8	Interleukine-8
IL10	Iinterleukine-10
IRF	Interferon regulatory factor
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MMP	Métalloprotéases
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Forme réduite de nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADH	NADH dehydrogenase
NF-kB	Nuclear factor kappa B
NO	Nitrite Oxyde
NOS	Nitrite Oxyde Synthase
NOX	NADPH oxidase
NOX1 KO	Souche de souris déficiente pour le gène NOX (KO= Knock Out)
PCNA	Proliferative Cell nuclear Antgene
PMA	Phorbol 12-myristate 13 acetate (activateur de PKC)
PB1	Phox and Bem 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PHOX	Phagocyte Oxydase
PI3 kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKCδ	Protein kinase C δ
PPR	Région poly-proline
PTP	Protein tyrosine phosphatase
PX	Phox domain

ROS	Reactive Oxigen Species
RT-PCR	Reverse transcriptase – polymerase chain reaction
SPF	Specific Pathogen Free
SH3	Src homology domain 3
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOD	Superoxyde dismutase
STATs	Signal transducers and activators of transcription
TGF-β	Transforming growth factor β
TSB-4	Thrombospondine –4
TLR4	Toll-like receptor 4
TLR5	Toll-like receptor 5
TIMPS	Tissue Inhibitor of Métalloprotéases
TNFα	Tumor necrosis factor
VSMC	Cellules musculaires lisses vasculaires

Pour des raisons de simplification le groupe de souris ayant un génotype C57/B6J dit « sauvage » est symbolisé par l'abbréviation « WT » (pour wild type) et le groupe de souris déficientes pour le gène NOX1 est symbolisé par l'abbréviation « KO » (pour Knock Out).

Résumé (Français)

Les NOX Homologues représentent une nouvelle famille de protéines transmembranaires dont la caractéristique commune est d'être le cœur catalytique de la production d'anions superoxydes. Elles ont toutes une structure proche de NOX2 (ou gp91^{Phox} selon l'ancienne nomenclature), la mieux caractérisée d'entre elles, et sont organisées en 6 ou 7 domaines transmembranaires. Cette famille compte actuellement 7 membres, NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 et DUOX 1 et DUOX2 ; elles ont une distribution tissulaire, cellulaire et intracellulaire spécifique les rendant quasi ubiquitaires dans l'organisme. Les fonctions de ces enzymes sont essentiellement rattachées à celles des espèces réactives de l'oxygène (ERO) mais dépendent aussi de leurs localisations. NOX2 est l'enzyme à l'origine de la production des ERO des phagocytes activés et a donc une fonction antimicrobienne. NOX3 est impliquée dans les pathologies du système vestibulaire et les DUOX1 et 2 sont des éléments clés de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes. Les autres NOX, (NOX1, NOX4, NOX5), individualisées depuis quelques années seulement, ont une distribution tissulaire et cellulaire d'expression ARNm bien caractérisée, mais les données sur leurs fonctions physiologiques ou physiopathologiques restent fragmentaires ; Ces données sont le plus souvent issues d'expérimentations *in vitro* ou *ex vivo* n'évaluant leurs fonctions que de façon indirecte ou dans des systèmes simplifiés. Ainsi, en utilisant un modèle animal de souris déficientes pour le gène NOX1 établi dans le laboratoire, nous avons évalué directement la fonction de NOX1 dans le colon et dans le système vasculaire.
La première partie de ce travail a eu pour objectif de déterminer si NOX1 exerce une activité antibactérienne au niveau du colon et participe au contrôle de la translocation bactérienne à travers la muqueuse colique. NOX1 participe à la sévérité de la colite au Dextran Sulfate Sodium par l'intermédiaire de la flore colique et protège de la translocation bactérienne dans un modèle de neutropénie induite. Cependant, ces résultats devront être confirmés car les expérimentations ont toutes été réalisées avec des souris dont le fond génétique n'avait une homologie que de 87.5%. La seconde partie de notre travail devait déterminer si NOX1 exerce une activité régulatrice de la pression artérielle systolique et participe à la survenue de l'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II. Nous montrons, avec des souris de génération F6 (homologie>98.5%), que NOX1 participe à la régulation physiologique de la pression artérielle, à la survenue de l'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II et à la survenue de dissection aortique. NOX1 agit dans le tissu vasculaire par au moins 3 mécanismes, en favorisant l'accumulation de matrice extracellulaire, en régulant l'expression génique et en diminuant la biodisponibilité du NO.

Mots clés
NOX1-Pression artérielle-Angiotensine II - Dissection aortique -Défenses antimicrobiennes-colon

Laboratoires
Collaboration entre le Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire (GREPI EA 2938/CHU Grenoble, France) et le Laboratoire de biologie du vieillissement (Hôpitaux Universitaire de Genève, Suisse)

Abstract (English)

The NOX family enzyme is constituted by Superoxide-generating NADPH oxidases homologues of gp91^{Phox}; as the well characterized NOX2 (new denomination for gp91^{Phox}) their catalytic subunit exhibits a common structure of 6 or 7 transmemmbrane domaine (ROS). The total number of enzymes in the family increased to 7 throught the past 5 years ; it includes, NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 et DUOX 1 et DUOX2 ; Tissue and cellular distributions of mRNA expression of the enzymes are well defined and show that superoxide generating enzyme are quasi-ubiquitous. General functions are Reactive oxygen species (ROS) dependent but their cellular localisations are of importance. NOX2 produces ROS in stimulated phagocytes and is the known microbicidal enzyme. NOX3 is responsible for vestibular dysfunction and DUOX1 and DUOX 2 allow iodination to thyroglobuline resulting in biosynthesis of thyroid hormon. While mRNA expressions of the other NOXs (namely NOX1, NOX4 and NOX5) are well defined, their biological functions are still not known. *In vitro* and *ex vivo* data provide only indirect informations which not allow understanding complexes interplay of the biological function.

We have then generated NOX1-deficient mice to further investigate directly the *in vivo* functions of NOX1 in colon and vascular tissues.

First, we used a F3 generation mice to determine whether NOX1 participate in the antibacterial defences and whether it limits bacterial translocation. We show that NOX1 is involved in the severity of Dextran Sulfate Sodium induced colitis via bacterial colonic flora and decrease the bacterial translocation in the gut. However, we have to be cautious because of the weakness of homology of the genetic background (87.5%) which in turn, may modify the results.

Second, we investigated whether NOX1 regulates basal blood pressure and participates in angiotensin II induced hypertension. All experiments were realized with F6 generation mice. NOX1-deficient mice had lower basal blood pressure, an almost complete loss of sustained blood pressure response to angiotensin II and were strongly protected from ATII-induced aortic dissection. our results establish an important role for NOX1 in the vascular ATII response, in particular extracellular matrix accumulation, regulation of gene expression, and cross talk with the nitric oxide system.

Key words
NOX1-Arterial blood pressure-Angiotensin II - Aortic dissection – Animicrobial defences-Colon

Lab'membership :
Collaborative work-Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire (GREPI EA 2938/CHU Grenoble, France) et le Laboratoire de biologie du vieillissement (Hôpitaux Universitaire de Genève, Suisse)

CHAPITRE I

Introduction

Introduction

Les NADPH oxydases sont des complexes protéiques enzymatiques dont la première, gp91^{PHOX} est connue depuis plus de 30 ans (Babior 2000; Vignais 2002). Sa découverte est le résultat des recherches parallèles sur une pathologie humaine, la granulomatose chronique aseptique, et la fonction bactéricide des polynucléaires neutrophiles (Babior 2000; Vignais 2002). Depuis et jusqu'à il y a encore quelques années, la majorité des recherches concernait les mécanismes protéiques régulant son activation, son assemblage et ses différents rôles au niveau des cellules phagocytaires (Sumimoto et al. 2005)

Depuis un peu plus de 5 ans, d'autres enzymes dont les séquences génomiques apparaissent proches de NOX2 (antérieurement appelée gp91^{PHOX}), ont été décrites dans différents tissus et compartiments cellulaires de différentes espèces vivantes (mammifères mais aussi microorganismes et plantes) (Lambeth 2004). Ce groupe d'enzymes constitue dorénavant une nouvelle famille d'enzymes appelée NOX pour **N**ADPH **Ox**ydase.

Elles sont toutes caractérisées par une capacité à transporter un électron à travers une membrane biologique permettant une production constitutive ou induite d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$). Elles ont toutes un cœur protéique transmembranaire qui, pour la majorité, interagit avec des protéines cytosoliques et membranaires constituant ainsi le complexe oxydase actif. C'est la protéine transmembranaire qui donne sa spécificité à la NADPH oxydase.

Cette famille est donc constituée de 7 membres dont la première découverte, gp91^{PHOX} se nomme dorénavant NOX2 ; les autres sont NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX 1 et DUOX2. Ces deux dernières enzymes se nomment ainsi en raison d'une caractéristique biochimique supplémentaire, une activité peroxydase-like qui les ont fait appeler **Du**al **Ox**ydase.

En raison de leurs distributions quasi ubiquitaires, de nombreuses questions se posent donc quant à leur origines, activations, régulations, fonctions, à la fois communes et spécifiques.

1. NOX homologues, structures, activation et régulation

Une structure générale est communément admise bien qu'aucune protéine y incluse NOX2 n'a pour l'instant été mis en évidence par cristallographie. La partie intramembranaire C-terminale comporte des domaines de fixation pour NADPH et NADH, et pour FAD. Pour les 5 NOX (NOX1-5), la partie NH2-terminale possèdent 6 domaines transmembranaires et un domaine intramembranaire; Pour NOX 5, la partie N-terminale est constituée d'un domaine dit EF hand, site de fixation du Calcium (figure 1). Les DUOX possèdent un domaine transmembranaire supplémentaire qui fait que la partie N-terminale se situe sur le versant extramembranaire ; sur celui ci se situe un domaine peroxydase-like permettant grâce à une superoxyde dismutase de transformer l'$O_2^{-\cdot}$ en H_2O_2. Enfin pour toutes les NOX/DUOX il existe 4 résidus Histidine très conservés dans les 3ème et 5ème domaines transmembranaires (figure 1). Leurs positions respectives permettent l'accrochage de 2 hèmes qui permettent le passage des électrons à travers la membrane (Lambeth 2002; Geiszt et al. 2004; Lambeth 2004).

Historiquement, NOX2 a été découverte la première : en raison de l'avancement des travaux sur le système oxydase, il a été rapidement mis en évidence des systèmes analogues non dépendant de NOX2 dans des cellules n'ayant aucune fonction phagocytaire connue. NOX1 a été découverte à partir de l'analyse génomique d'un complexe protéique de ce type dans des cultures cellulaires (Suh et al. 1999; Banfi et al. 2000). Elle a tout d'abord été nommée MOX 1 pour mitogène oxydase 1 car retrouvée par un des deux groupes comme impliquée dans la prolifération cellulaire (Suh, Arnold et al. 1999)

L'identification génomique de **NOX3** (Kikuchi et al. 2000; Cheng et al. 2001), **NOX4** (Geiszt et al. 2000; Cheng, Cao et al. 2001; Shiose et al. 2001) et **NOX5** (Banfi et al. 2001; Cheng, Cao et al. 2001) a été rapide alors que **DUOX1 et DUOX2** ont d'abord été identifiées au niveau protéique, dans la thyroïde et par là appelées Thox pour **Th**yroïde **Ox**ydase (Dupuy et al. 1999; De Deken et al. 2000; Dupuy et al. 2000). Elles ont toutes des spécificités de structure, de localisations tissulaires et cellulaires (tableau n°1).

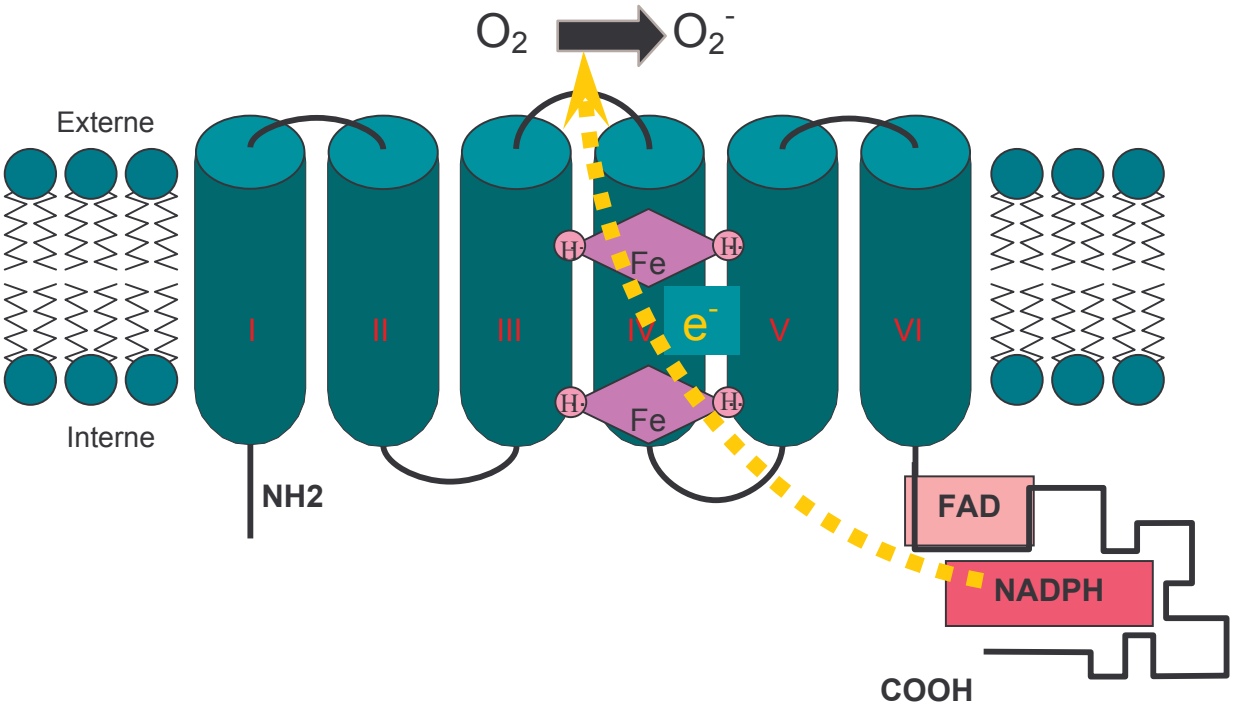


Figure 1 : Représentation de la structure de base de la famille NOX-DUOX, enzymes permettant le transport des électrons (e^-). Le domaine protéique NOX est défini par six domaines transmembranaires renfermant deux domaines hèmes (Fe) intramembranaires coordonnés par les résidus Histidine (H), ainsi qu'une région C-terminale (COOH) cytosolique sur laquelle sont localisés deux motifs de fixation pour FAD et quatre motifs de fixation pour une molécule NAD(P)H. Les différentes isoformes se différencient ensuite par le nombre et l'emplacement des sites potentiels de N-glycosylation (d'après Taylor et al. 1993; Lambeth et al. 2000).

A. NOX2

a) Structure

NOX2 est le modèle original de description des NOX homologues. La protéine a été découverte dans les suites de travaux successifs, d'une part sur les ERO et leurs rôles dans la bactéricidie des phagocytes (Rossi et al. 1964; Klebanoff 1970; Babior et al. 1973), et d'autre part sur un déficit génétique conduisant à une pathologie humaine atteignant des jeunes enfants, la granulomatose chronique aseptique (Berendes et al. 1957; Holmes et al. 1967; Quie et al. 1967). (Holmes, Page et al. 1967; Quie, White et al. 1967). Le lien entre la diminution de la bactéricidie chez ces jeunes patients et l'activité oxydase est réalisé en 1967 (Holmes, Page et al. 1967; Quie, White et al. 1967). La protéine gp91^{Phox}, puis son gène codant ont été individualisés dans la décade suivante (Segal et al. 1978; Segal et al. 1978; Royer-Pokora et al. 1986; Teahan et al. 1987) alors que, parallèlement, il devenait évident que d'autres protéines étaient impliquées dans l'activation de cette protéine membranaire inactive dans des cellules non stimulées ; les différentes sous unités nécessaires à son activation sont p40^{phox},p67^{phox}, p47^{phox}, p22^{phox}, Rac1 et Rac2 ; p22^{phox} et NOX2 (gp91^{Phox}) forment un complexe protéique stable au sein de la membrane ; gp91^{Phox} possède donc l'ensemble de la machinerie permettant le transfert d'électron d'un côté à l'autre de la membrane.

Les mécanismes régissant l'activité et la régulation de l'ensemble du complexe (production d'$O_2^{\cdot}$) ne sont pas encore complètement élucidés.

b) Activation

L'activation peut être considérée comme se produisant de la façon suivante (revue par (Takeya et al. 2003; Sumimoto, Miyano et al. 2005) :

A l'état de repos, p22^{phox} et gp91^{Phox} forment un complexe protéique stable au sein de la membrane alors que p40^{phox},p67^{phox}, p47^{phox}, rac (rac1 ou rac2) se situent dans le cytoplasme. Sous l'influence d'un stimulus tel que le PMA dans un système membranaire acellulaire, les sous unités p67^{phox}, p47^{phox}, Rac1 et Rac2 migrent à la membrane et se fixent sur des sites spécifiques de gp91^{Phox} et p22^{phox}.

p47^{phox} se lie à p22^{phox} au niveau d'une région PPR (région riche en proline) en juxtaposition avec gp91^{Phox}. p47^{phox} possède dans sa région C-terminale, 2 domaines SH3 qui ne peuvent se lier à la région PPR qu'en l'absence d'activité d'une région auto-inhibitrice (AIR). Dans sa région N-

terminale elle possède une région dite domaine PX (Phosphoinositide-interacting PX) qui peut interagir avec des phosphoinositides membranaires ; la phosphorylation de $p47^{phox}$ induite par la stimulation cellulaire ou par du PMA permet un changement conformationnel permettant la levée de l'activité auto inhibitrice rendant les sites SH3 et le domaine PX accessibles.

$p47^{phox}$ permet à $p67^{phox}$, de migrer et interagir avec le complexe protéique ; $p67^{phox}$ possède 4 motifs tétratricopeptides, deux domaines SH3 (un central et un à sa partie C-terminale), et un domaine PB1 entre les deux domaines SH3 ; Le domaine SH3 C-terminal de $p67^{phox}$ interagit avec le domaine PPR de $p47^{phox}$ alors que les motifs tétratricopeptides N terminaux de $p67^{phox}$ interagissent avec la forme activée de Rac. Enfin, PB1 interagit avec la région OPCA de $p40^{phox}$; Rac migre de façon indépendante à la membrane et son interaction avec $p67^{phox}$ rend fonctionnel son domaine d'activation. Cependant, certains ont rapporté une activation directe de Rac par interaction avec $gp91^{Phox}$.

De façon générale, $p47^{phox}$ est considérée comme une molécule « organisatrice » et $p67^{phox}$ comme une molécule « activatrice » .$p40^{phox}$ aurait un rôle régulateur majorant l'activation du complexe. (Takeya and Sumimoto 2003; Sumimoto, Miyano et al. 2005)

c) Régulation

NOX2 peut actuellement être considérée comme quasi ubiquitaire au niveau tissulaire ; sa distribution dépend essentiellement des cellules phagocytaires mais l'expression ARN a été aussi retrouvée dans des cellules non phagocytaires telles que les cardiomyocytes, les cellules endothéliales (Lassegue et al. 2001; Li et al. 2002; Mollnau et al. 2002) ou les cellules musculaires lisses des petites artères résistantes (Touyz et al. 2002) et les neurones (Serrano et al. 2003; Vallet et al. 2005), suggérant des rôles particuliers très différents de son rôle initial (tableau n° 1).

Au niveau cellulaire, elle est principalement localisée sur la membrane cytoplasmique mais est aussi retrouvée dans le secteur intracellulaire dans les membranes de « vésicules secrétoires » (Cross et al. 2004). Dans le cerveau elle serait localisée près des espaces synaptiques (Tejada-Simon et al. 2005).

Son expression peut être augmentée soit au niveau ARN soit au niveau post-transcriptionnel (Touyz, Chen et al. 2002) elle est aussi régulée dans certaines conditions (infarctus du myocarde sténose carotidienne) (Fukui et al. 2001; Szocs et al. 2002) ou par certaines molécules (PMA, interferon γ ,Angiotensine II) (Newburger et al. 1988; Suzuki et al. 1998; Hattori et al. 2005;

Wang et al. 2005). Il existe aussi des mécanismes post-transcriptionnels de régulation impliquant des régions promotrices (Lien et al. 1997) et certains facteurs tels que PU.1 (Suzuki, Kumatori et al. 1998)

Enzyme	Autres noms	Localisation principale	Autres Localisations
NOX1	NOH-1, MOX1, GP91-2	Epithélium colique	muscle lisse, endothélium prostate, utérus, placenta, ostéoclastes, péricytes rétiniens
NOX2	CYBB, gp91^{phox},	Phagocytes	lymphocytes B, neurones, muscles striés et muscles lisses, endothélium cardiomyocytes, hépatocytes, cellules de la moelle hématopoïétique
NOX3	GP91-3	Otoconie	Rein et rate fœtaux, os et cerveau
NOX4	RENOX, KOX-1, KOX	Rein	endothélium ostéoblastes et ostéoclastes, VSCM, fibroblastes, Cellules myocardiques, muscles lisses, cellules de la moelle hématopoïétique, fibroblastes, kératinocytes, cellules mélaniques et neurones
NOX5	-	tissus lymphoïdes, testicules	endothélium, fibroblastes, muscles lisses, placenta, ovaires et utérus, estomac, tissu fœtal
DUOX1	Thox1, LNOX1, NOXEF1	thyroïde	Épithélium bronchique, cervelet et testicules, placenta, Prostate (eddens2001)
DUOX2	Thox2, LNOX2, NOXEF2, p138^{tox}	thyroïde	Épithélium gastro-intestinal (colon, duodénum), glandes rectales, glandes salivaires Épithélium bronchique, pancréas et utérus, épithélium vésical

Tableau n°1 : Répartition tissulaire des différentes enzymes NOX1-5, DUOX1 et DUOX2 (d'après Lassegue et al. 2003; Geiszt and Leto 2004; Lambeth 2004).

B. NOX3

NOX3 a une homologie de structure protéique de 56% avec NOX2. Une première approche génomique permettait de prévoir en 2000 que la protéine devrait contenir l'ensemble des éléments nécessaires a la fonction oxydase (Kikuchi, Hikage et al. 2000); Préalablement retrouvée à de bas niveaux d'expression dans le rein et la rate fœtaux, l'analyse fonctionnelle

d'une atteinte vestibulaire de la souris dite « Head tilt » a récemment permis de rattacher NOX3 à l'organe responsable du déficit fonctionnel, l'otoconie (Paffenholz et al. 2004); parallèlement , NOX3 est mise en évidence au niveau de plusieurs organes de l'oreille interne par une approche génomique permettant de démontrer une expression beaucoup plus forte à ce niveau que lors des premières descriptions (Banfi et al. 2004). La protéine est connue et des anticorps sont disponibles. Il semble que son activation soit au moins liée à $p22^{phox}$. Elle a ensuite été décrite comme inductible, stimulus dépendant, nécessitant l'association à des sous unités de NOX2 ($p47^{phox}$ et $p67^{phox}$), ou constitutive en cas d'association à des sous unités homologues $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ appelées respectivement NOXO1 et NOXA1 (Banfi, Malgrange et al. 2004; Paffenholz, Bergstrom et al. 2004). Le type des sous unités réellement présentes et nécessaires n'est donc pas encore clairement établi pour toutes les localisations de NOX3 (tableau n°1).

C. NOX 4

NOX4 a été primitivement extraite du mRNA de rein (Geiszt, Kopp et al. 2000; Cheng, Cao et al. 2001; Shiose, Kuroda et al. 2001) et a été logiquement nommé Renox. Depuis l'identification de l'ensemble des NOX, Renox a été rebaptisée NOX4 et est la NOX homologue la plus largement exprimée dans les tissus (tableau n° 1). Ses plus hauts niveaux d'expression restent au niveau du rein et du système vasculaire. Plusieurs variants existent, et plusieurs anticorps contre la protéine sont disponibles donnant des résultats reproductibles ; Elle présente une homologie de 39% avec NOX2 l'éloignant phylogénétiquement de NOX1 NOX2 et NOX3.
L'activation de NOX4 est constitutive et indépendante de toute sous unité cytoplasmique mais malgré cette activité constitutive, elle est augmentée par la surexpression de $p22^{phox}$ (Ambasta et al. 2004; Martyn et al. 2005). $p22^{phox}$ semble donc jouer un rôle important pour NOX4 (Ambasta, Kumar et al. 2004; Martyn, Frederick et al. 2005; Sumimoto, Miyano et al. 2005). Sa localisation intracellulaire a été rapportée différemment selon les cellules étudiées : le réticulum endoplasmique est fortement suggéré dans certaines cellules transfectées (Martyn, Frederick et al. 2005; Van Buul et al. 2005), et dans les nuclei pour les Cellules Musculaires Lisses Vasculaires (CMLV) (Hilenski et al. 2004; Van Buul, Fernandez-Borja et al. 2005)
L'activité de NOX4 conduit à une détection d'H_2O_2. plus que d'$O_2^{\cdot-}$ suggérant l'absence de production d'$O_2^{\cdot-}$ par NOX4 (Martyn, Frederick et al. 2005). La détection extracellulaire de H_2O_2

et la localisation intracellulaire principale de NOX4 (dans le réticulum endoplasmique) pourraient toutefois expliquer l'absence de détection de superoxydes. Ainsi, malgré une production d'anion superoxydes, la rapidité de la dismutation conduirait à la formation d'H_2O_2 passant secondairement et librement la membrane cytoplasmique.

Une surexpression de l'ARNm de NOX4 est démontrée pour différents stimulants externes tels que le stress mécanique au niveau vasculaire (Hwang et al. 2003) le stress du réticulum endoplasmique (Pedruzzi et al. 2004), l'hypoxie et l'ischémie (Suliman et al. 2004; Vallet, Charnay et al. 2005), le TGF1β (Sturrock et al. 2005) alors que les résultats sont discordants pour l'angiotensine II ; Tantôt, l'angiotensine II majore l'expression de NOX 4 (Wingler et al. 2001; Higashi et al. 2003; Matsuno et al. 2005), tantôt elle la diminue (Lassegue, Sorescu et al. 2001), tantôt elle ne la modifie pas (Byrne et al. 2003; Gavazzi et al. 2006); la discordance des résultats concernant cet effet de l'angiotensine II, pourrait être mis sur le compte des différences de modèles présentés n'impliquant pas obligatoirement les mêmes types cellulaires.

D. NOX5

NOX5 a été décrite préalablement par deux groupes ayant mis rapidement en évidence la caractéristique structurale de NOX5, à savoir la présence de 4 structures de liaison au calcium, motifs dit « EF hand » sur la partie N-terminale de NOX5 (Banfi, Molnar et al. 2001; Cheng, Cao et al. 2001). 4 isoformes ont été mis en évidence dans différents tissus, Nox5α, Nox5β, Nox5δ, Nox5γ (Banfi, Molnar et al. 2001; Cheng, Cao et al. 2001).

Son expression principale se situe dans les organes lymphoïdes et les testicules alors même qu'elle n'est pas retrouvée dans les lymphocytes circulants (Banfi, Molnar et al. 2001) (tableau n° 1). Elle paraît aussi plus éloignée phylogénétiquement des autres NOX et elle n'est pas présente chez certains mammifères tels que les souris et le rat (Sumimoto, Miyano et al. 2005).

Son activation est constitutive et indépendante de toute sous unité cytoplasmique ou membranaires ($p22^{phox}$) pour tous les isoformes sauf Nox5β qui nécessite une activation par ionomycine. En lien avec sa particularité structurale, son activation est aussi calcium dépendante. (Banfi, Molnar et al. 2001)

E. DUOX1 / DUOX2

La recherche de l'origine de la production calcium dépendante d'H_2O_2 par les cellules épithéliales thyroïdiennes a abouti à la découverte des DUOX (Dupuy et al. 1999; De Deken, Wang et al. 2000; Dupuy, Pomerance et al. 2000). La purification de la protéine permet l'utilisation de nombreux outils non disponibles pour les autres NOX homologues.

Sur le plan structural, il s'agit de protéines glycosilées possédant un domaine transmembranaire supplémentaire par rapport aux autres NOXs. La partie N-terminale située sur la face extra-membranaire possède un domaine Peroxydase-like; elles possèdent aussi 2 domaines EF Hand sur la partie N terminale intramembranaire. L'homologie avec NOX2 est mesurée à 50%. Elle est de 77% pour les DUOX entre elles ((Sumimoto, Miyano et al. 2005)) :

Les deux DUOX ont été retrouvées dans la thyroïde mais aussi dans des tissus différents notamment le tractus gastro-intestinal pour DUOX 2. et dans l'épithélium bronchique pour DUOX1 (tableau n°1). Dans les thyrocytes, les DUOX sont situées sur le pôle apical des cellules mais une localisation intracellulaire est aussi démontrée (De Deken et al. 2002)

Un débat existe toujours quant au type d'ERO produit par ces enzymes ; La majorité estime qu'il s'agit d'enzyme H_2O_2 productrices (Dupuy et al. 1991; Leseney et al. 1999), alors que d'autres estiment qu'il existe une formation primaire de superoxydes (Nakamura et al. 1989; Nakamura et al. 1991).

Son activation est calcium dépendante mais peu de données concernent les sous unités nécessaires à son activation. L'activation Ca2+ dépendante serait différente de celle de NOX5 ; l'EF hand servirait plus comme un domaine auto inhibiteur levée de façon réversible par la mise en contact avec du calcium (Ameziane-El-Hassani et al. 2005); Deux agents activateurs (PMA et PKC) ont récemment démontré une voie d'activation Ca2+ indépendant (Wong et al. 2004; Fortemaison et al. 2005). Une régulation existe au niveau de l'ARNm grâce à différents stimuli, Insuline pour DUOX2, IL4 ou IL-13 pour DUOX1 (Sumimoto, Miyano et al. 2005).

F. NOX1

a) Structure

NOX1 est la NOX ayant la plus forte homologie avec NOX2 ; Elles ont une séquence génétique composée du même nombre d'exons de taille proche et situé sur le même chromosome ; ceci concourt à ce que la séquence protéique prédite ait une homologie de près de 60%. Elle possède un variant chez lequel l'exon 11 manquant empêche son activation (Geiszt et al. 2004).

NOX1 a été découverte à partir d'une banque de donnée génomique alors que deux groupes recherchaient des enzymes capables de produire des anions superoxydes donc des homologues de NOX2 ; Le gène candidat a été ensuite cloné a partir de cellules épithéliales coliques (Suh, Arnold et al. 1999; Banfi, Maturana et al. 2000). Aucune particularité structurelle sur le plan de NOX1 n'est à retenir en dehors du fait qu'elle n'utilise pas préférentiellement les mêmes sous-unités que NOX2. La production d'ERO par NOX1 était reconnue comme faible jusqu'à la découverte d'un analogue de $p47^{phox}$, NOXO1 et un analogue de $p67^{phox}$, NOXA1 (Banfi et al. 2003; Geiszt et al. 2003).

L'expression colique de NOX1 est majoritairement issue des cellules épithéliales coliques (Suh, Arnold et al. 1999; Banfi, Maturana et al. 2000); elle se situerait majoritairement au niveau de la surface (Szanto et al. 2005) de l'épithélium bien que certains aient rapporté une expression majeure au fond des cryptes (Geiszt et al. 2003). Elle a aussi été retrouvée de façon constitutive ou inductible dans de nombreux autres tissus, cellules ou cultures cellulaires (tableau n°1). : Cellules musculaires lisses des vaisseaux (CMLV) (Lassegue, Sorescu et al. 2001), utérus, prostate (Suh, Arnold et al. 1999; Banfi, Maturana et al. 2000), cellules endothéliales (Kobayashi et al. 2004; Ago et al. 2005) placenta, et ostéoclastes (Suh, Arnold et al. 1999; Lee et al. 2004) , CaCO2-. (Perner et al. 2003; Clark et al. 2004), A431 (Morazzani et al. 2004), DLD-1 (Perner, Andresen et al. 2003), and HT-29 , (Perner, Andresen et al. 2003) et lignées cellulaires épithéliales bronchiques ,A549 (Griendling 2004). Elle a aussi été retrouvée dans le tractus digestif (estomac) des cobayes (Kawahara et al. 2001).

b) Activation

Schématiquement, l'activation maximale se fait avec les sous unités NOXO1 et NOXA1, la protéine Rac et $p22^{phox}$ mais restent possibles avec $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ (Système vasculaire)

(Lambeth 2004; Sumimoto, Miyano et al. 2005). Plusieurs expérimentations ont permis de déterminer leurs importances respectives dans l'activation de NOX1 (Sumimoto, Miyano et al. 2005). En présence de NOXO1 et NOXA1, la production de superoxydes, devient beaucoup plus élevée qu'en présence des sous unités classique ($p47^{phox}$,et $p67^{phox}$) et ce, bien qu'elle reste inférieure à la production de NOX2 par les polynucléaires.

D'autres particularités sont à signaler : i) en l'absence de $p22^{phox}$, une production de superoxyde est encore possible dans une culture cellulaire CHO où NOX1 est transfectée (Takeya and Sumimoto 2003; Takeya et al. 2003) suggérant que $p22^{phox}$ n'est pas absolument nécessaire pour l'activité de NOX1 ; ii) il existe une différence entre le modèle d'activation des cellules issues de la souris et celui l'humain ; l'activité constitutive chez l'humain resterait faible par rapport à celle de la souris (Takeya and Sumimoto 2003; Lambeth 2004) iii) L'absence d'AIR sur NOXO1 explique en partie l'activation constitutive de NOX1 dans le système. Puisqu'en son absence l'activation du système nécessite un activateur (Takeya and Sumimoto 2003) iv) NOX1 peut majorer sa production d'ERO sous certains stimulants (PMA), notamment dans le système NOX1/NOXO1/NOXA1 chez l'humain (Takeya and Sumimoto 2003; Lambeth 2004; Sumimoto, Miyano et al. 2005).

c) Régulation

L'expression ARNm de NOX1 peut être majorée par l'interféron γ (Geiszt, Witta et al. 2003; Kuwano et al. 2005), le PDGF β (Lassegue, Sorescu et al. 2001), la PGF2α (Katsuyama et al. 2002). et l'angiotensine II (Lassegue, Sorescu et al. 2001; Wingler, Wunsch et al. 2001; Mollnau, Wendt et al. 2002; Wang et al. 2002; Lassegue et al. 2004)) : dans des lignées cellulaires T84 (cellules épithéliales coliques), NOX1 est surexprimée par l'interféron (Kuwano, Kawahara et al. 2005), les lipopolysaccharides d'*Helicobacter pilori* stimulent son expression dans les cellules de la muqueuse gastrique du cobaye (Kawahara, Teshima et al. 2001; Kawahara et al. 2005), la flagelline de *Salmonella enteritidis* augmente l'expression de NOX1 via les TLR5 (Geiszt, Witta et al. 2003); dans le système vasculaire elle peut être surexprimée *in vitro* et *in vivo* par l'angiotensine II (Lassegue, Sorescu et al. 2001; Wingler, Wunsch et al. 2001; Mollnau, Wendt et al. 2002; Wang, Johns et al. 2002; Lassegue and Griendling 2004), dans les cellules endothéliales par BMP4 (Sorescu et al. 2004)et dans les cellules A7r5, par le récepteur à l'EGF via les PI3 kinases et la PKCδ, (Ushio-Fukai et al. 2004; Fan et al. 2005)

Un gradient d'expression augmente aussi du colon proximal au colon distal mimant le gradient de la charge bactérienne intracolique (Glebov et al. 2003; Szanto, Rubbia-Brandt et al. 2005).

Enfin, plusieurs sous localisations cellulaires de NOX1 sont admises montrant des niveaux d'expression différents selon l'état d'activation cellulaire: dans le réticulum endoplasmique (Janiszewski et al. 2005) ou des cavéoles intracytoplasmiques des cellules musculaires lisses des vaisseaux (Hilenski, Clempus et al. 2004), dans le cytoplasme ou les noyaux des kératinocytes de différentes lignées cellulaires (Chamulitrat et al. 2003).

2. NOX homologues, fonctions communes et particularités

A. Fonctions communes

Les NOX homologues produisent toutes des anions superoxydes, $O_2^{\cdot-}$. Les espèces radicalaires sont liées à des réactions en cascade dont la première molécule est $O_2^{\cdot-}$, l'anion superoxyde. Il est transformé en peroxyde d'hydrogène spontanément ou grâce à l'action d'une superoxydismutase ou de l'acidité du milieu. Les autres éléments de la cascade incluent le peroxynitrite, l'acide chlorhydrique dérivé de la peroxydation du peroxyde d'hydrogène, et la réaction avec le Fe3+ permet la formation de radicaux hydroxyles. (Klebanoff 1980; Thannickal et al. 1995; Cross and Segal 2004). (Figure n°2). Les ERO ont des caractéristiques communes avec les espèces radicalaires dérivés du NO (Cross and Segal 2004).

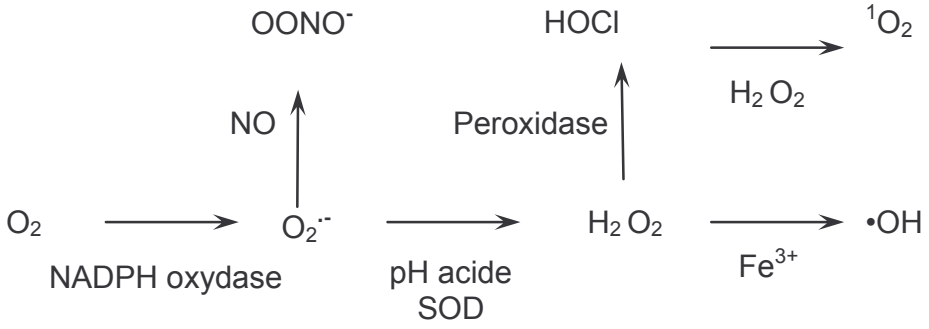


Figure 2 : **Cascades de formation des radicaux libres selon** : $O_2^{\cdot-}$ = superoxyde, H_2O_2 = peroxyde d'hydrogène SOD = Superoxyde dismutase, $OONO^-$ = Peroxynitrite, HOCl = radical hydroxyl, $^1O_2$-. , NO = Nitrite Oxyde (d'après Krause KH gracieusement).

Production radicalaire et fonctions potentielles :

Primitivement l'anion Superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est généré par une NADPH oxydase ou d'autres oxydases (xanthine oxydase, mitochondrie…); la formation en cascade se passerait de la façon suivante de la face endomembranaire et exoamembranaire (figure 1) : La réaction enzymatique débute par l'oxydoréduction entre une molécule de NADPH ou NADH et le cofacteur FAD ;

deux électrons passent de NAD(P)H sur le groupement flavinique. Les électrons transitent alors dans la bicouche lipidique via les deux hèmes portés par les histidines ; sur la partie extramembranaire les électrons vont réduire deux molécules de di-oxygène en anion superoxyde. D'autres enzymes assurent cette production (mitochondries, Xanthine Oxydase, peroxydases, NO non couplé) mais à des niveaux moins importants pour ce qui concerne la production extracellulaire d'ERO (Cross and Segal 2004). Nous n'aborderons pas le rôle de ces enzymes dans notre travail.

La fonction la plus connue des ERO est la fonction antibactérienne. Cependant, si la production des ERO et particulièrement de superoxyde est un élément clé de cette fonction les mécanismes propres conduisant à la bactéricidie sont toujours sujets à controverse (Cross and Segal 2004). Brièvement, deux modèles existent : l'un, dans lequel les ERO ont une activité de bactéricidie directe, l'autre dans lequel ils ne sont qu'un des éléments d'une cascade d'évènements complexes aboutissant aussi à la bactéricidie (Cross and Segal 2004) ; les NOX peuvent en effet agir de façon indirecte sur les facteurs de virulence de la bactérie, sur le pH intraphagosome et encore plus probablement sur les variations de concentrations en ions H+ et K+ (Cross and Segal 2004) ; ceux ci permettraient l'activation d'enzymes (protéases) directement impliquées dans la bactéricidie (Reeves et al. 2002; Reeves et al. 2003; Cross and Segal 2004).

D'autres fonctions régulatrices ont été attribuées à la production d'ERO: la transduction du signal qu'elle soit en lien avec l'inhibition des tyrosine phosphatases, l'activation de kinases ou d'autres voies de la phosphorylation, serait parmi les rôles les plus importants. Les ERO ont aussi été associés depuis longtemps à la mort cellulaire, l'apoptose et à la sénescence (Forman et al. 2002; Agarwal et al. 2003; Lambeth 2004) mais ont aussi été impliqués dans la prolifération cellulaire via H_2O_2 (Arnold et al. 2001). D'autres fonctions telles que la phosphorylation protéique (Verweij et al. 2002), les régulations d'expression géniques (Hancock et al. 2001), de prolifération cellulaire (Suh, Arnold et al. 1999; Abid et al. 2000), de facteurs transcriptionnels, (Chiarugi 2005), de l'activité des métalloprotéases (MMP) (Li et al. 2005; Luchtefeld et al. 2005; Wang et al. 2005), la sensibilité à l'hypoxie (Suliman, Ali et al. 2004), la biosynthèse de protéine complexe (crosslinking), l'angiogénèse (Arbiser et al. 2002), la régulation et l'antagonisation du NO (Mollnau, Wendt et al. 2002; Matsuno, Yamada et al. 2005), ont été suggérées pour les différentes NOXs.

Nombreuses de ces fonctions ont été mises en évidence sur des modèles cellulaires *in vitro* et plus rarement *in vivo* avec des résultats quelques fois contradictoires ; quoiqu'il en soit, il paraît probable que la localisation de la production d'$O_2^{\cdot-}$, son niveau de production guident à la fois sa fonction et ses possibilités d'interactions (Cross and Segal 2004).

B. Fonctions spécifiques

a) NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 et DUOX

Les fonctions spécifiques de chacune des NOX homologues sont donc à mettre en perspective avec leurs localisations tissulaires, cellulaires et probablement intracellulaires.
La majorité de ces fonctions sont liés à la production d'ERO mais un certain nombre de fonctions des NOX pourrait être indépendante de cette production radicalaire.

Les fonctions majeures des NOX2, NOX3 et des DUOX1 et DUOX2 sont connues ; L'historique de leurs découvertes fait que leur fonction était connue avant la mise en évidence de la protéine et de l'ARNm.

NOX2 est la principale actrice de l'initiation de la bactéricidie dans les cellules phagocytaires ; elle fait en ce sens partie des mécanismes innés du système de défense de l'organisme. Cependant compte tenu de la diversité des rôles des ERO, des différents niveaux d'activation reconnus de NOX2 et de sa large distribution dans l'organisme, il semble que de nombreux autres rôles puissent lui être attribués ; prolifération cellulaire et transduction du signal dans plusieurs types d'organes et de type cellulaires sont parmi les fonctions les plus acceptées (Irani 2000; Liu et al. 2003; Geiszt and Leto 2004; Lambeth 2004).Cependant peu d'évidence expérimentale *in vivo* implique directement NOX2 ; l'absence de pathologies autres qu'infectieuse chez les patients atteints de Granulomatose Chronique Aseptique pourrait aussi suggérer le peu d'impact de NOX2 dans d'autres pathologies (Dinauer et al. 1992). Cependant il faut savoir que peu de pathologies dégénératives cardio-vasculaires, neuronales ou rénales ne présentent des évolutions suffisamment rapides pour devenir des pathologies actives repérables dans les premières décennies de vie, durée de vie actuelle de ces patients. Dans le même sens, l'impact dans le

vieillissement n'a même jamais été évalué alors qu'une des théorie du vieillissement est basée sur les modifications de la balance radicalaire à savoir la perte de l'équilibre entre production d'ERO et mécanismes anti-oxydants (Schoneich 1999). Une étude toutefois au niveau de l'estomac de patients âgés a corrélé son niveau d'expression ARNm à l'âge (Salles et al. 2005).

NOX3 est associée potentiellement à toute pathologie de l'oreille interne ; Elle est exprimée dans le vestibule et la cochlée ; dans le système vestibulaire, elle est impliquée dans la formation de l'otoconie et son déficit se traduit logiquement et phénotypiquement, chez la souris, par un syndrome vestibulaire (souris "head tilt" ou "tête penchée") (Paffenholz, Bergstrom et al. 2004). L'impact des ERO dans d'autres pathologies du système auditif telles que la toxicité médicamenteuse ou la presbyacousie est largement décrit (Kopke et al. 1997; Yamasoba et al. 1998; McFadden et al. 1999). Cependant peu de donnée sont disponibles quant au rôle de NOX3 dans ces pathologies ; l'argument principal en faveur du rôle de NOX3 est sa surexpression dans la toxicité médicamenteuse du cysplatyl (Banfi, Malgrange et al. 2004). A contrario, l'absence de déficit auditif chez les souris "head tilt" évoque, ou une absence de rôle de NOX3 dans le système auditif malgré une expression cochléaire, ou un mécanisme d'action plus complexe.

Les DUOX 1 et 2 ont comme fonction principale la formation des hormones thyroïdiennes (Dupuy, Ohayon et al. 1999; De Deken, Wang et al. 2000). Il n'existe par contre que peu de données sur leurs implications physiologiques et pathologiques ; la possibilité d'un rôle dans les défenses antimicrobiennes en raison de leurs capacités à produire de l'H_2O_2 associées à des localisations épithéliales est souvent rapportée (Geiszt, Witta et al. 2003; Geiszt and Leto 2004; Lambeth 2004).

Pour les NOX1, NOX4 et NOX5, la fonction même principale n'est toujours pas connue.

NOX4 est essentiellement impliquée dans la régulation de phénomènes rénaux (Geiszt, Kopp et al. 2000; Geiszt and Leto 2004; Lambeth 2004) au niveau de la régulation de la production d'érythropoïétine par sensibilité à l'$O_2^{\cdot -}$ (Cheng, Cao et al. 2001; Shiose, Kuroda et al. 2001; Suliman, Ali et al. 2004) de la survenue de la néphropathie diabétique (Gorin et al. 2005).
Des fonctions extra-rénales potentielles ont aussi été identifiées : Résorption osseuse par activation des ostéoclastes (Yang et al. 2002; Yang et al. 2004), régulation de la pression

artérielle et l'athérosclérose dans des proportions qui restent à définir (Sorescu et al. 2002; Griendling 2004; Lassegue and Griendling 2004; Mueller et al. 2005), remodelage cardiaque sous stress mécanique (Byrne, Grieve et al. 2003), transduction du signal insulinique (Mahadev et al. 2004).

Le rôle physiologique de **NOX5** est jusqu'à présent difficile à appréhender compte tenu du manque de systèmes cellulaires stables pour l'étudier ; elle a été récemment impliqué dans la prolifération cellulaire dans les cancers de prostate (Brar et al. 2003). L'absence d'expression chez les rongeurs n'est pas non plus un élément favorable à la compréhension de son rôle.

b) NOX1

NOX1 est la NOX homologue la seconde découverte ; une double paternité de cette découverte fait que deux types de fonctions lui sont généralement attribuées : un rôle dans la prolifération cellulaire et un rôle dans les défenses antibactériennes.
Un lien entre NOX1 et prolifération cellulaire potentielle est soutenu par plusieurs arguments : (i) Les ERO sont impliqués dans ce type de mécanismes depuis de nombreuses années ainsi que dans l'apoptose ; ii) Suh et al ont découvert NOX1 au travers d'une lignée cellulaire corrélant l'expression de NOX1 avec ses capacités de prolifération et de transformation en lignée (Suh, Arnold et al. 1999) ; iii) des souris nude (athymiques) ont développé des tumeurs de type fibrosarcome après injection de cellules transfectées par NOX1 (Suh, Arnold et al. 1999) ; iv) NOX 1 est surexprimée dans plusieurs types de cancer chez l'humain (Fukuyama et al. 2005; Lim et al. 2005; Wartenberg et al. 2005), v) NOX1 stimule l'angiogénèse tumorale via VEGF, le récepteur à VEGF (Arbiser, Petros et al. 2002; Ushio-Fukai and Alexander 2004), vi) NOX1 a été impliquée dans la prolifération de différents types cellulaires, cellules musculaires lisses vasculaire (CMLV) (Sorescu, Weiss et al. 2002; Brandes et al. 2005), kératinocytes (Chamulitrat, Schmidt et al. 2003; Chamulitrat et al. 2004). Des arguments contre-balançant cette hypothèse sont néanmoins nombreux : i) depuis la première observation de NOX1 (Suh, Arnold et al. 1999), la reproduction de la transformation des fibroblastes n'a pu être reproduite ; la caractérisation de la lignée cellulaire utilisée a permis de mettre en évidence le rôle d'une autre molécule V12ras

dans la transformation et la prolifération cellulaire; cela limite aussi l'interprétation des résultats de l'injection de ces cellules dans les souris athymique (Lambeth 2004) , ii) qu'une molécule soit surexprimée dans une phase de croissance ou de transformation cellulaire ne démontre pas son rôle promoteur de la croissance et la prolifération cellulaire, mais démontre une association entre les phénomènes ; iii) d'autres groupes n'ont pas retrouvés de lien entre cancers coliques et expression de NOX1(Geiszt and Leto 2004; Szanto, Rubbia-Brandt et al. 2005) ; la variabilité avec laquelle NOX1 est retrouvée dans différents modèles de cancers suggère que la surexpression de NOX1 est plus probablement conséquente à la prolifération ou transformation de certains types de cancers coliques que l'une des causes de la prolifération.

L'autre fonction majeure potentielle de NOX1 et expliquant sa présence au niveau du colon est son rôle dans les défenses contre les microorganismes.

Ils semble que la plus importante expression de NOX1 au niveau ARNm se situe au niveau des cellules épithéliales coliques ; La régulation de cette expression par des cytokines proinflammatoires telles que l'Interféron γ (Geiszt et al. 2003; Geiszt and Leto 2004; Kuwano, Kawahara et al. 2005) ou par une activation des TLR de type 4 ou 5 des colonocytes (récepteurs pour bactéries ou champignons) soutient cette hypothèse (Kawahara et al. 2001; Kawahara et al. 2004; Kuwano, Kawahara et al. 2005); Plus encore, l'activation de la fonction oxydase de la protéine (NOX1) en parallèle à cette surexpression dans un modèle vivant tel que le cobaye (Kawahara, Kohjima et al. 2005) ou dans des lignées cellulaires épithéliales coliques (Kuwano, Kawahara et al. 2005) est un argument supplémentaire.

Cependant d'autres enzymes pourraient être impliquées dans les défenses antibactériennes via la production radicalaire notamment DUOX2 au niveau du colon (Geiszt, Witta et al. 2003). Le gradient d'expression de NOX1 en parallèle de celui de la bactériologie colique n'est qu'une association et aucune activité directe de NOX1 sur des microorganismes n'a été prouvée. Ainsi il existe peu de preuve directe de la fonction antimicrobienne de NOX1.

Parmi l'ensemble des pathologies, celles d'origines cardiovasculaires sont les plus fréquentes ; de multiples gènes et mécanismes physiopathologiques sont impliqués dans leurs survenues et leurs évolutions (Griendling et al. 2000; Zalba et al. 2001; Bengtsson et al. 2003; Cai et al. 2003; Lassegue and Griendling 2004). Nombres des mécanismes font aussi intervenir la production d'ERO (Griendling, Sorescu et al. 2000; Zalba, San Jose et al. 2001; Bengtsson, Gulluyan et al. 2003; Cai, Griendling et al. 2003; Lassegue and Griendling 2004; Mueller, Laude et al. 2005). En

effet, au niveau vasculaire, les ERO sont non seulement promoteurs d'une inflammation mais aussi impliqués dans le tonus vasomoteur via le nitrite oxyde, l'activation de métalloprotéases , l'apoptose et la prolifération de cellules musculaires lisses et cellules endothéliales , l'agrégation plaquettaire (Zalba, San Jose et al. 2001; Bengtsson, Gulluyan et al. 2003; Lassegue and Griendling 2004; Fortuno et al. 2005; Mueller, Laude et al. 2005).

Plusieurs producteurs d'ERO sont présents au sein des vaisseaux : les xanthines oxydase, les mitochondries, le NO non couplé et les NADPHoxydases ou NOX. Cependant, il semble que la plus importante source d'ERO soit dépendante des NOX (Bengtsson, Gulluyan et al. 2003; Lassegue and Griendling 2004; Fortuno, Jose et al. 2005; Laude et al. 2005; Mueller, Laude et al. 2005).

Il n'existe pas une NOX unique exprimée dans le système vasculaire mais une large distribution des NOX1, NOX2 et NOX4, principalement dépendante du type cellulaire et de la localisation du vaisseau dans l'organisme (Lassegue and Clempus 2003). Le tableau n°2 résume les données actuelles sur les localisations cellulaires des différentes NOX et sous unités dans le système vasculaire. Une revue extensive, récemment publiée montre la variabilité des résultats en fonction des techniques utilisées (PCR, Northern Blot, Southern blot) (Lassegue and Clempus 2003). Les sous unités sont toutes exprimées dans la majorité de secteurs cellulaires cependant peu de données sont actuellement disponibles pour les NOXO1 et NOXA1 (Lassegue and Clempus 2003; Ago, Kitazono et al. 2005).

NOX1, NOX2, $P22^{phox}$, $P47^{phox}$, $P67^{phox}$, peuvent être régulées au niveau ARNm ou activées (production d'ERO) par différentes substances *in vitro,* dans des cultures cellulaires primaires, *ex vivo*, et dans certains modèles animaux *in vivo* (Lassegue and Clempus 2003). Les données sont plus contradictoires pour NOX4 (Byrne, Grieve et al. 2003; Lassegue and Clempus 2003). Les agents potentiellement inducteurs sont l'endothéline-1, le PDGF, l'angiotensine II, l'interféron γ, le stress mécanique, les LDL et le PMA, alors que d'autres diminuent leur expression ou activité (statine , PPARά) (Lassegue and Griendling 2004).Une surexpression de NOX1 accompagne la surexpression de $P22^{phox}$ obtenue par transgénèse de souris C57B6/J suggérant un mécanisme stabilisateur de $P22^{phox}$ selon un mécanisme analogue à celui de NOX2 (Laude, Cai et al. 2005).

L'implication des ERO dans les pathologies cardio-vasculaires et en particulier dans l'hypertension est ancienne (Zalba, San Jose et al. 2001; de Champlain et al. 2004; Lassegue and Griendling 2004). La découverte des NOX homologues producteurs principaux d'ERO dans différents compartiments de la structure du vaisseaux en même temps que leurs inductions par

une substance très impliquée dans la survenue d'hypertension artérielle, l'angiotensine II, incite à aborder les hypothèses de façon plus précise.

Tableau n°2: Distribution cellulaire des NOX et des différentes sous-unités
D'après Griendling et al. 2000; Zalba et al. 2001; Bengtsson et al. 2003; Cai et al. 2003; Lassegue and Griendling 2004.

	Cellules Endotheliales	**Fibroblastes**	**CMLV**	**Macrophages PNN**
NOX 1	-/+ Artère cérébrale de rat	-/+	++	+
NOX 2	+	-/+	-/+ Artère résistante ()	+++
NOX 4	+++	++	+	-
P22^{phox}	++	+	+++	+++
P47^{phox}	-/+	+	+	+++
P67^{phox}	+	+	+	+++
NOXO1	-/+	?	?	?
NOXA1	-/+	?	?	?

CMLV : cellules musculaire lisse des vaisseaux ; PNN Polynucléaire Neutrophile ;
-/+ données contradictoires sur l'expression ;
- Non exprimée + faiblement exprimée; ++ exprimée ; +++ fortement exprimée ;

Ainsi, plusieurs données *in vitro* concernant NOX1 pour NOX2, P47^{phox} et P22^{phox} sont en faveur de son rôle dans la régulation de la pression artérielle (Wingler, Wunsch et al. 2001; Fortuno, Jose et al. 2005; Mueller, Laude et al. 2005). Des données sur modèle animal sont disponibles pour NOX2, P47^{phox} et P22^{phox} : pour NOX2, les données récentes lui attribuent ou un

rôle modeste (Wang et al. 2001) ou une absence de rôle (Touyz et al. 2005); pour $P47^{phox}$ une seule étude montre son implication de façon très nette (Landmesser et al. 2002) ; pour $P22^{phox}$ les données les plus récentes établissent son importance sans pouvoir dire s'il existe des modifications d'expressions des autres sous unités cytosoliques mais en impliquant fortement la surexpression de NOX1 dans la survenue d'une hypertension artérielle dépendante de la production d'ERO (Laude, Cai et al. 2005). Plus directement, deux études publiées concomitamment fin 2005 par deux groupes concurrents (une étude chez des souris déficientes pour NOX1 (Matsuno, Yamada et al. 2005) et une étude sur une souris surexprimant NOX1 (Dikalova et al. 2005)) démontrent l'implication de NOX1 dans l'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II. Ces résultats seront commentés plus longuement dans la suite de ce travail. (Chapitre IV).

L'implication des NOX semblent donc très variables et probablement variables selon les modèles utilisés en particulier pour l'hypertension artérielle.

3. Hypothèses de travail

Considérant les fonctions potentielles de NOX1, nos deux hypothèses de travail ont été les suivantes :

NOX1 exerce une activité antibactérienne au niveau du colon et participe au contrôle de la translocation bactérienne à travers la muqueuse colique.

NOX1 exerce une activité régulatrice de la pression artérielle et participe à la survenue de l'hypertension artérielle systémique.

Plusieurs possibilités existaient pour tester ces hypothèses ; aucun modèle cellulaire ou *ex vivo* ne permet de tester ces deux hypothèses sur un même modèle. Les nombreux modèles cellulaires montrent aussi tous leurs limites : spécificité des cultures cellulaires donnant des résultats contradictoires, limite des traitements in vitro, utilisation difficile pour des types cellulaires éloignés.

Le passage à un modèle vivant semble donc nécessaire à une meilleure compréhension des différents rôles des NOX dans le système vasculaire.

Ainsi, un modèle vivant de souris transgènique a été choisi; La construction d'une souris transgènique déficiente pour NOX1 (NOX1KO) a été réalisée dans le laboratoire en association avec un partenaire, la société ANTEQ qui a réalisé l'électroporation. (Cf Chapitre 2 Modèle Animal).

La méthodologie concernant la première hypothèse a été d'utiliser un modèle de colite inflammatoire, colite au Dextran Sulfate Sodium (DSS) qui offrait l'avantage d'être très largement utilisé et pour lequel l'influence de la flore bactérienne a été rapportée (Rath et al. 2001) ; Pour tester l'implication de NOX1 dans la limmitation de la translocation bactérienne, un second modèle par induction de neutropénie a été utilisé.

La seconde hypothèse a testé le rôle de NOX1 dans la régulation de la pression artérielle dans des conditions basales puis sous l'influence de l'angiotensine II, substance connue pour induire à la fois une hypertension artérielle, un remodelage de la média artérielle et une production d'ERO dépendante des NOX.

CHAPITRE II

Modèle Animal

La souris déficiente pour NOX1

Modèle Animal - la souris déficiente pour NOX1 (KO)

1. Construction du modèle

Le gène de NOX1, situé sur le chromosome X en position q22, est constitué de 13 exons sur une longueur de 31 kpb et code pour une protéine de 564 acides aminés. Le vecteur cible a été construit pour éliminer la partie codante la plus significative de NOX1 entre l'exon III et l'exon VI (figure n° 3) ; il a été remplacé par le gène de la résistance à la Néomycine (NéoR). Ce vecteur, a été construit dans le laboratoire (travail réalisé par B.Banfi) et la génération de la souris a été réalisée par la société ANTEQ (Suisse). Les sondes pour le Southern blot (sonde a et b) ont été choisies en dehors de la séquence du gène introduit.

La génération des souris déficientes pour le gène NOX1 a ensuite été réalisée, grâce à l'électroporation de cellules souches embryonnaires (CSE) issues de souches de souris 129SvJ avec le vecteur construit. Des 1000 électroporations de CSE, 418 clones ont pu être analysés par une PCR exhaustive et vérifiés par southern blot (non montré) ; 101 CSE ont eu une électroporation efficace. Le Clone #3E3 a été alors sélectionné pour une injection dans des blastocystes de souris sv129J (figure 4A); les blastocystes ont été implantées dans des souris pseudo-gravides. Les chimères males obtenues ont été ensuite croisées avec des souris femelles permettant d'obtenir la génération F1 de souris NOX1 déficiente. Les femelles F1 ont alors été analysées par PCR à la recherche de la présence de l'allèle NOX1 KO et une vérification Southern blot effectuée en cas de positivité. Quatre animaux #30, #31, #32 et #33 ont été identifiés comme transgènique (Figure 3B). Ces femelles ont ensuite été croisées avec des C57BL/6J pour obtenir la génération F2. Les figures 3C et 3D montrent un mâle F2 hémizygote (#65), une femelle hétérozygote (#66) et une wild type 129SvJ utilisant la probe A ou la sonde Néo. La souris de souche C57BL/6J est en effet la souche la plus communément utilisée pour les expérimentations animales. Les animaux de génotypes déficients pour NOX1 ayant un fond génétique proche des sv129 ont donc ensuite été croisés secondairement avec une souche de fond génétique C57BL/6J jusqu'à obtenir des générations F7. Une colonie de souris NOX1 déficiente a été crée à partir de cette dernière génération. Le nom de cette souris est selon la nomenclature

internationale B6/129S9-NOX1<tmm1Din>. Les résultats montrés dans la partie expérimentale sur le colon ont été effectuées avec des souris de génération F2 et F3 alors que les expérimentations sur le modèle vasculaire ont été effectuées avec des souris de génération F6. Les souris contrôles étaient soient des souris de génotype sauvage dit « Wild-type » (WT) de même parenté soient des souris sauvages C57BL/6J issues d'un autre élevage. Pour nos expérimentations seuls les mâles de 12 à 30 semaines et de poids de 25 à 35g ont été utilisés. Les animaux étaient gardés dans des conditions libres de pathogènes spécifiques (SPF) et transférés en animalerie conventionnelle quelques semaines avant les expérimentations.

Le génotype NOX1 -/- ou le génotype sauvage de chaque animal utilisé a été déterminé à partir de l'ADN isolé de la queue de la souris. L'isolement de l'ADN a été réalisé grâce au DNAeasy Kit (Quiagen®) et des ADNc ont été fabriquées. Deux PCR pour chaque analyse étaient réalisées, l'une pour la recherche de l'allèle WT, l'autre pour la recherche de l'allèle NéoR signant le génotype NOX1 -/-.

Les amorces pour les PCR sur les ADNc des souris C57/black6J dite Wild type (WT) étaient: 5'-TAG CCT GGC TGT TCC CTC ACC CAA A (forward) et 5'-GGG ACA GCT TCC TGC ATC CCT CTG T (reverse). L'amorce reverse pour les ADNc des souris NOX1KO a été choisie pour débuter à l'intérieur du gène Neo R: 5'-TAG CCT GGC TGT TCC CTC ACC CAA A (forward) and 5'-TCG GAT CGA GCG CTC TGA AGT TCC T (reverse). La figure 5 A montre les résultats de génotypage ; La bande WT est de taille 300pb et la bande pour les KO était de 140pb

Toutes les souris étaient gardées dans des conditions sanitaires et de confort équivalents (accès libres à l'eau et à la nourriture, dans une salle silencieuse stabilisée à 25°C avec des cycles luminosité/obscurité de 12heures).

La procédure animale a été soumise et acceptée par le comité d'éthique de l'université de Genève et l'office vétérinaire cantonal de Genève (Suisse).

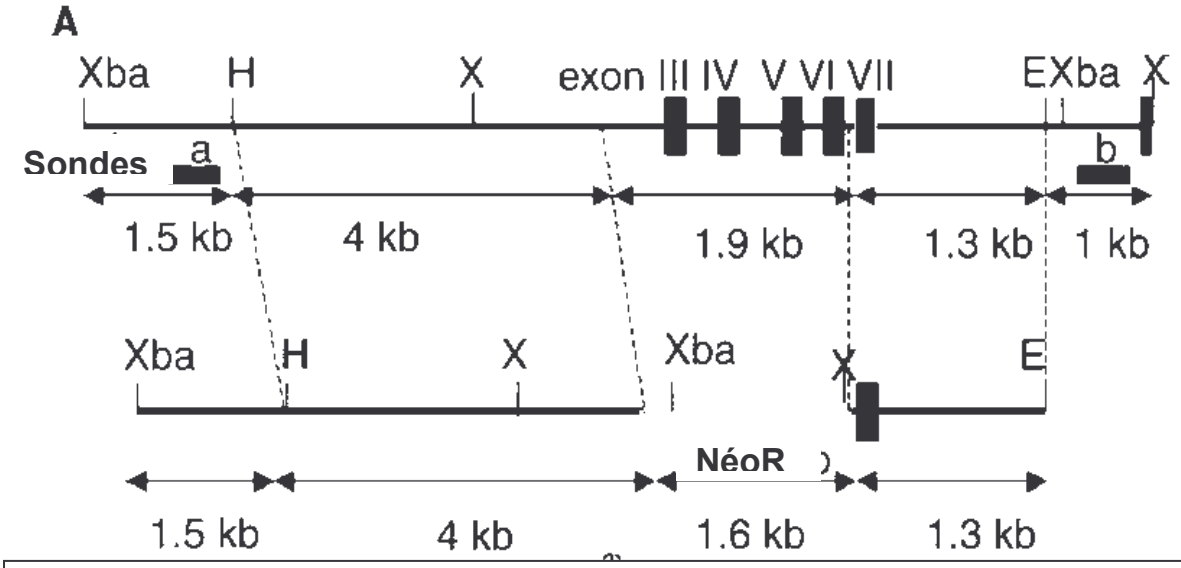


Figure n° 3 : Construction de la souris déficiente pour NOX1 (KO).
Schéma du gène NOX1 (en haut) et du vecteur (en bas). Le gène NéoR (1.6 kb) remplace la partie du Gène de NOX1 comprise entre l'exon III et l'exon VI (1.9kb). Les sites de restriction ayant permis la construction sont indiqués (sites X=Xmn1 et Xba= Xba1) ainsi que la position des sondes pour les Southern blot (sondes a et b) permetttant la vérification de la construction ; les flèches indiquent les différentes tailles des parties de gènes contenues dans le NOX1 et la construction réalisée.

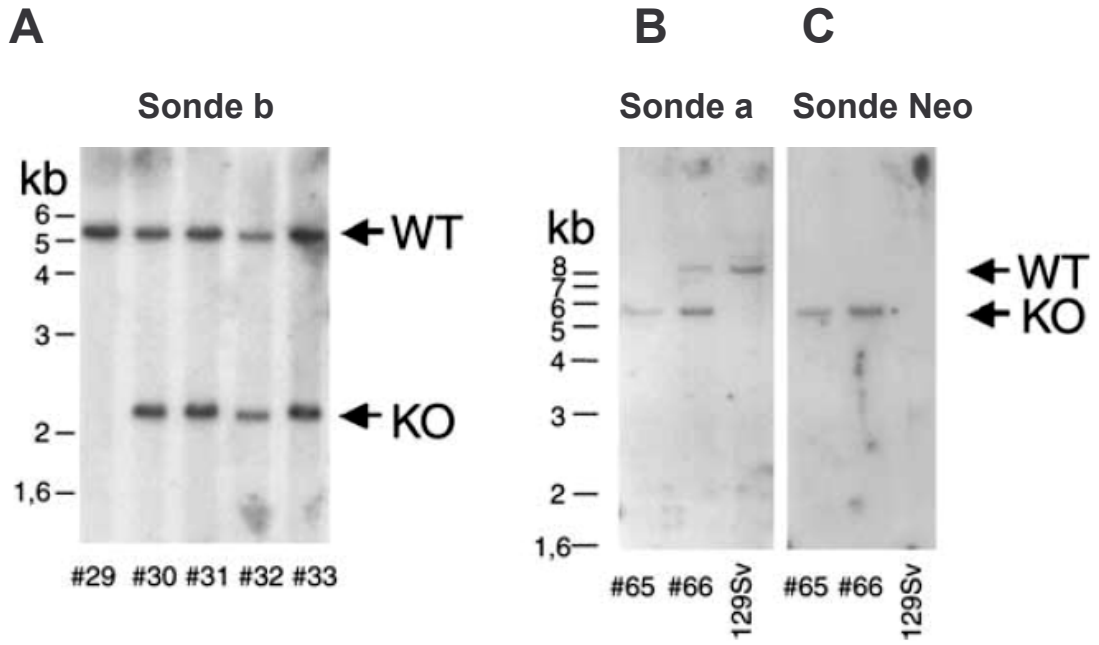


Figure n° 4: Vérification de la construction de la souris déficiente en NOX1 (KO) comparée à la souris de génotype 129Sv ou WT. (**A**) Analyse Southern blot (sonde b) de la digestion par Xmn1 de l'ADN chez les souris de première génération dite « **F1** » (les souris #30, #31; #32; #33 sont porteuses du gène NéoR et la souris #29 est WT). (**B**) Analyse Southern blot (sonde a) de la digestion par Xba1 génomique ADN chez les souris de seconde génération dite « **F2** » (#65, mâle hémizygote et #66, une femelle hétérozygote et 129SvJ = contrôle WT.) (**C**) Analyse Southern blot (sonde Néo) de la digestion par Xba1 génomique ADN chez les souris F2 (#65, mâle hémizygote et #66, une femelle hétérozygote et 129SvJ = contrôle WT) .

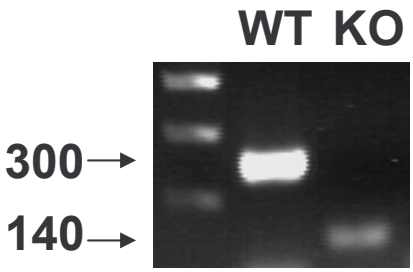


Figure n° 5 : **Génotypages des souris de génotype sauvage (WT) et déficient pour NOX1 (KO) ;** les. Génotypage sont réalisés à partir de la queue de la souris. Les longueurs attendues des fragments WT et KO sont respectivement de 300 et 140 paires de bases. Un exemple pour chaque génotype est donné.

2. Phénotype

Les souris déficientes pour le gène NOX1 de fond génétique sv129 ont ensuite été croisées avec des souris de fond géntique C57/Black6J, souris habituellement utilisées pour l'expérimentation animale. Des croisements successifs sont nécessaires pour l'obtention d'un fond génétique commun. Le phénotype de la souris déficiente pour NOX1 après trois générations a été analysé. Jusqu'à 30 semaines : Aucune différence de nombre de naissance entre la colonie NOX1 (issue des Back cross) et la colonie WT n'a été remarquée ; aucune différence particulière de croissance, de mortalité, de poids de consommation d'eau n'a été retrouvée (données non publiées).

Le phénotype le plus attendu concernait le colon. L'histologie colique n'a montré aucune différence entre les groupes de souris WT et déficient pour NOX1 (KO) (figure n° 6).

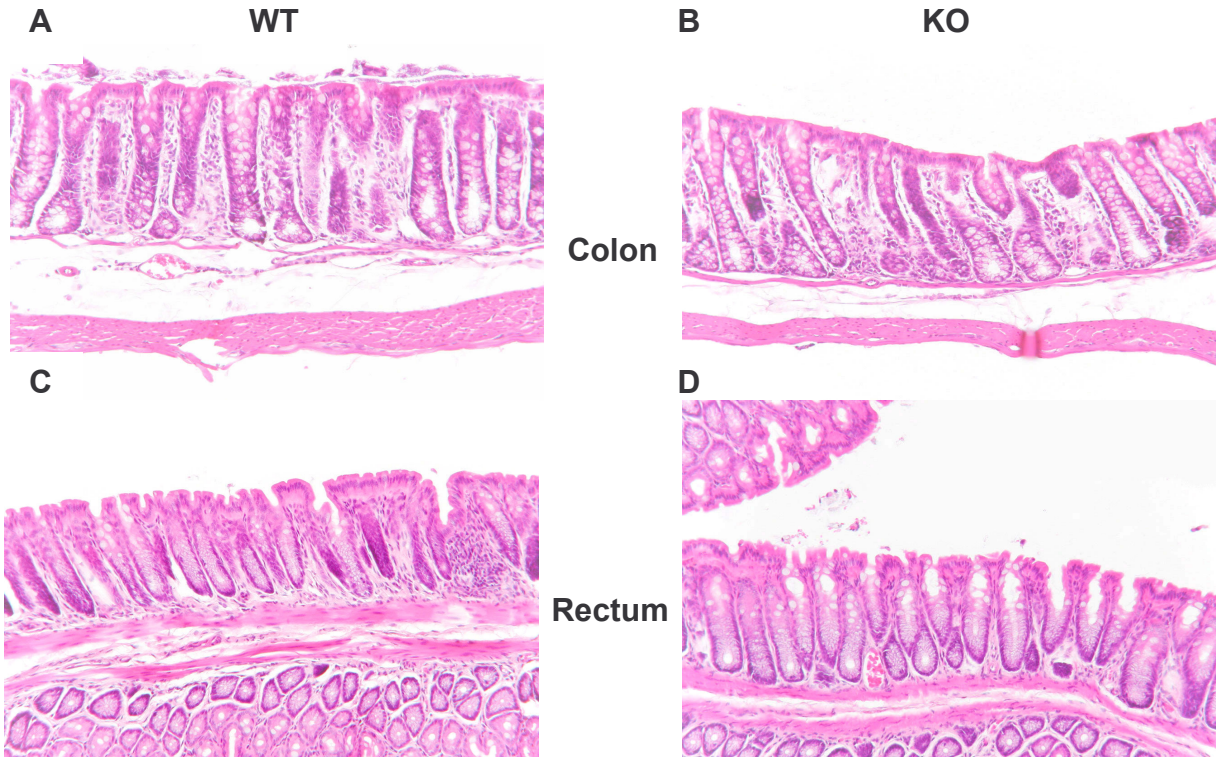


Figure n° 6 Coupe longitudinale histologique de colon et rectum chez les souris wild type (WT) et déficientes pour NOX1 (KO), Coloration à l'hématoxyline/éosine : chez WT (A et C) et chez des souris les KO (B et D). Aucune différence n'est constatée. X100.

CHAPITRE III

Evaluation de la Fonction de NOX1 dans le colon

Evaluation de la fonction de NOX1 in vivo au niveau colique

1. Méthode

L'objectif de travail est d'évaluer la fonction antibactérienne de NOX1 au niveau colique dans un modèle animal. De façon très sommaire, NOX 1 pourrait permettre, par son activité productrice d'espèces radicalaires, d'empêcher le passage bactérien à travers la lumière colique.

Le modèle de souris génétiquement modifiée utilisé est celui décrit au préalable (chapitre "modèle animal"). Pour cette phase d'expérimentation, des souris déficientes pour le gène de NOX1 de génération F3 ont été comparées à des souris dite Wild type (possédant le gène d'intérêt NOX1) ; les 2 groupes de souris étaient issues de la même lignée (parenté) permettant d'augmenter les chances d'homologie génétique excepté pour le gène NOX1; la détermination du génotype s'effectuait à partir du DNA isolé à partir de la queue de chaque souris (chapitre "modèle animal"); Les animaux étaient nés dans des conditions libres de tout pathogène spécifique de la souris (animalerie « SPF »), puis avaient une phase d'acclimatation de quelques semaines dans une animalerie conventionnelle avant de participer aux expérimentations.

A. Protocole dextran sulfate sodium (DSS)

2 types d'expérimentation complémentaires ont été réalisés.
Un modèle de colites inflammatoires connu pour le rôle particulier des bactéries sur la sévérité de la colite a été choisi. Les colites au dextran sulfate sodium (DSS) sont habituellement utilisées à des concentrations de 3 à 5% sur une durée de 7 jours Les expérimentations préliminaires ayant montré une mortalité chez tous les animaux entre les 6ème et 7ème jour, les expérimentations au DSS ont été réalisées sur une durée de 5 jours à une

concentration de 3% en quantité libre à chaque souris ; 4 groupes de souris étaient constituées ; WT sans DSS, WT avec DSS, déficientes pour NOX1 sans DSS, et avec DSS.
14 souris ont été inclues dans chaque groupe au cours de 5 expérimentations différentes (2 souris de chaque groupe à chaque expérimentation).

a) colite au DSS : Procédure expérimentale animale

Les animaux étaient isolés dans des cages le temps de l'expérimentation. L'âge des souris variait de 16 à 30 semaines. Un distributeur d'eau contenant du DSS à 3% était installé et renouvelé chaque jour pour un accès libre. La nourriture était standardisée pour tous les animaux et disponible *ad libitum*. Le poids, les selles, et l'aspect de l'animal (mobilité prostration, aspect de souffrance) étaient contrôlé chaque jour jusqu'à la fin de l'expérimentation, le 5ème jour. L'animal était sacrifié par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane 5%. Une dissection de l'animal pour prélever l'ensemble du Colon était effectuée. Le poids et la longueur du colon n'ont pas été mesurés. Chaque prélèvement était fixé par une immersion de 48 heures dans le Paraformaldéhyde 4% Ph 7.4.

Paramètres mesurés

Les Paramètres cliniques, histologiques et bactériologiques suivant été mesurés

-Les paramètres cliniques

Le taux de mortalité à J5 a été calculé. Le poids, la survenue d'une détection sanguine positive sur les selles (hématest®) quotidien validé chez la souris et aspect macroscopique), et la quantité d'eau consommée ont été mesurées quotidiennement. Un calcul de quantité de DSS consommé rapporté au poids de la souris a été réalisé sur 2 expérimentations (soit 8 souris par groupe). Un score global d'activité de la colite a été utilisé (): La perte de poids rapportée au poids de J0, était cotée de la façon suivante : 0 s'il le poids ne change pas, 1pour une perte de poids entre 1 et 5%, 2 entre 5 to 10%, 3 entre 10 et 20%, 4 si> 20%. La consistance des selles était cotée de la façon suivante: 0 pour des selles bien formées, 2 pour des selles collantes et molles et 4 pour des selles liquides. Le saignement digestif a été cotée à 0 si l'hématest est négatif, 2 si l'hématest est positif, 4 s'il y a saignement macroscopiquement visible. Le score total correspond a l'addition des ces 3 scores divisé par 3 permettant une classification sur 4 points, l'animal asymptomatique étant côté à 0 et l'animal présentant le score maximal d'activité de la colite étant côté à 4 (cooper).

-Les paramètres histologiques

Les prélèvements coliques du colon transverse étaient enrobés en paraffine et 4 à 6 sections de 10 µm réalisées chacune à distance de 20 µm. Des colorations par hématoxyline -éosine ont

été réalisées sur 4 à 6 coupes pour chaque échantillon. L'analyse des coupes a été qualitative puis la sévérité de la colite a été mesurée par un score de sévérité validé par Dieleman LA (Dieleman et al. 1998) ; il s'agit d'une cotation mesurant 4 paramètres, la sévérité de l'inflammation (0=sans, 1=légère, 2=modérée,3=sévère), la profondeur de l'atteinte muqueuse (0=sans, 1=muqueuse, 2=muqueuse et sous muqueuse, 3=transmurale), le type d'atteinte des cryptes (0=sans,1=1/3 basal,2=2/3 basal et sous muqueuse, 3= surface épithéliale seulement intacte, 4=atteinte complète crypte et perte complète de l'épithélium), la régénération (4 =Aucune réparation tissulaire, 3=Surface épithéliale pas intact, 2=Régénération mais avec atteinte des cryptes,1= Régénération quasi complète, 0=régénération complète). L'addition de ce score était ensuite multiplié par un facteur de 1 à 4 selon le % de l'atteinte (1 = 0-25%, (2 = 26-50%,3=:51-75%, 4=76-100%)

Chaque évaluation a été réalisée sans connaître l'origine du prélèvement; 1 mesure/ coupe soit 4 à 6 mesures ont été réalisées pour chaque prélèvement.

- *Les paramètres bactériologiques*

Des études semi quantitatives de bactériologie colique à partir des selles ont aussi été effectuées grâce à des méthodes de dilutions sériées. Des prélèvements de liquides péritonéaux et de sang ont été inoculés sur milieux de croissance liquide.

Les prélèvements de selles ont été étalés sur des agars et Blood agar (recherche bactéries aérobies) ; la recherche de bactéries anaérobies a utilisé des chambres à anaérobies et s'est effectuée sur des milieux spéciaux; CDC (Center for Disease Control, et milieu sélectif GV (gentamycine vancomycine pour anaérobies gram négatif) et PEA (anaérobies gram positif).

b) colite au DSS et antibiotiques Procédure expérimentale animale

Afin de tester l'influence de la flore bactérienne dans le mécanisme de la colite et tester une évolution différente selon le génotype, 3 expérimentations complémentaires associant au modèle de colite au DSS 3%, une infusion d'antibiotique dans les mêmes conditions expérimentales pour les 2 groupes de souris; le protocole d'inoculation des antibiotiques était le suivant : les antibiotiques imipénème et vancomycine ont été choisis sur des critères bactériologiques et leurs efficacités déjà connues dans des modèles de colites au DSS (Rath, Schultz et al. 2001). Du premier jour de l'exposition au DSS jusqu'au dernier jour (J5), des injections intrapéritonéales quotidiennes à la même heure d'imipénème à 20 mg/kg/j et de vancomycine à 20 mg/kg/j ont été réalisées.

6 souris ont été inclues dans chaque groupe au cours de 3 expérimentations différentes (2 souris de chaque groupe pour chaque expérimentation, comparées à 2 souris contrôles, DSS sans antibiotique). Le choix de ne pas inclure de souris contrôle sans DSS était justifié par les premiers résultats du modèle de colite au DSS (absence d'atteinte inflammatoire colique pour toutes les souris contrôles).

Les mêmes paramètres cliniques que la colite au DSS sans antibiotique ont été utilisés mais l'absence de données sur la consistance des selles et le saignement n'ont pas permis un calcul de l'index d'activité de la colite. Les scores histologiques ont été mesurés de la même manière que dans le modèle DSS sans antibiotiques.

B. Modèle de neutropénie

La possibilité d'une majoration de la translocation bactérienne chez les souris déficientes pour NOX1 (KO) est plausible puisque l'absence de NOX1 semble accentuée une colite qui, sous l'effet d'antibiotiques redevient comparables à celle des souris contrôles. L'absence de bactériologie positive dans le sang de ces animaux ou dans le péritoine malgré la présence d'atteinte péritonéale, peut être en lien avec un bon fonctionnement du système de défense antibactérien non spécifique. Ainsi, nous proposons de réduire ces défenses non spécifiques afin de faciliter la permanence des translocations bactériennes (Wallace et al 1997). Le modèle choisi est un modèle de neutropénie induite par le 5-Fluoro-Uracyl à la posologie unique de 200mg/kg en intrapéritonéal (Wallace et al 1997). Il permet d'obtenir des neutropénies profondes $<500/mm^3$ avec une myelotoxicité maximale entre J6 et J8 (Wallace et al 1997).

Les expérimentations ont été réalisées en animalerie conventionnelle chez 14 animaux par groupe (typage bactérien pour n=8) et chez 12 animaux par groupe en animalerie SPF (mesures quantitatives et typage bactérien)

Procédure Expérimentale animale

Les animaux étaient isolés dans des cages le temps de l'expérimentation. L'âge des souris variait de 16 à 30 semaines. Les souris avaient un accès libre à la boisson et à une nourriture standardisée *ad libitum*. La durée de l'expérimentation était de 7 jours.

Avant l'expérimentation, une mesure de l'hémoglobine et des polynucléaires neutrophiles a été réalisée grâce un prélèvement de sang effectué chez 8 souris par groupe dont 4 par groupe hébergées en zone conventionnelle.

L'injection de 5-FU a été réalisée au Jour 1 ; les signes de souffrance des animaux ont été identifiés chaque jour de l'expérimentation (prostration, poils hérissés, mouvements anormaux, anorexie, tremblements, perte de poids supérieure à 15% du poids préalable). L'animal était sacrifié par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane 5%. Le jour du sacrifice un prélèvement sanguin pour évaluer la sévérité de la neutropénie et rechercher des bactéries dans le sang était effectué. Une dissection de l'animal pour prélever le foie, la rate et le liquide péritonéal. Chaque organe était homogénéisé de façon stérile dans 1 ml Nacl 0.9%.

Les Paramètres cliniques, sanguins et bactériologiques suivant été mesurés

- *Paramètres cliniques,* (n= 18/groupe, n= 10 en conventionnel et n =8 en SPF)

Température rectale quotidienne, poids

-*Paramètres sanguins,* (n = 16 /groupe n= 8 en conventionnel et en SPF)

Quantification des neutrophiles avant et à la fin de l'expérimentation

-*Paramètres bactériologiques*, (n=8/groupe en zone conventionnelle, 12/groupe en zone SPF)

En zone conventionnelle, un étalement sur gélose au sang et mise en culture était réalisé pour identification bactérienne. Le sang et le liquide péritonéal 500 µl à 1000 µl étaient inoculés dans des flacons d'hémocultures classiques (BACTEC) pour toutes les souris en zone conventionnelles.

En zone SPF, une quantification bactérienne par dilution sérielle a été réalisée de la manière suivante : de chaque organe homogénéisé (foie et rate) dans un ml de NaCl 0.9%, 100 µl étaient mélangés à 900 µl de NaCl 0.9% ; des dilutions sérielles jusqu'au 1/10000ème pour le foie et 1/1000ème pour la rate ont permis une analyse quantitative des bactéries ; 100 µl soit 1/10ème de chaque dilution était étalé sur des gélose au sang. La quantité retenue était la plus élevée de toutes les dilutions. La quantification bactérienne a été exprimée en Log CFU/Organe.

L'identification bactérienne a été réalisée selon des méthodes classiques dans le laboratoire de bactériologie des Hôpitaux Universitaires de Genève (P. Rohner, gracieusement) à partir des cultures sur gélose au sang et des hémocultures (sang et liquide péritonéal).

C. Analyses Statistiques

La comparaison des scores cliniques, du poids et des scores histologiques ont utilisé le test d'analyse de variance (ANOVA) avec mesures d'interaction. La comparaison des cultures quantitatives bactérienne du foie et de la rate a utilisé un Test de Mann Whitney (test non paramétrique) en raison du faible nombre d'échantillon et de la distribution anormale des groupes. Toutes les données sont rapportées en moyenne ± SD (déviation standard). L'hypothèse était rejetée si $p < 0.05$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Stata 8.2, (statistical package, Stata Corporation, Collège Station, Texas 77845 USA).

2. Résultats

A. Les colites au DSS sont plus sévères chez les souris déficientes pour NOX1

La mortalité est de 2/14 chez les souris déficientes pour NOX1 et de 1/14 chez les C57B6/J. Le poids moyen de base et l'âge des souris n'étaient pas différents entre les 2 groupes (figure 7A). La perte de poids et l'évolution de la perte de poids ne sont pas non plus significativement différents entre les 2 groupes (p=0.13) (figure 7B); Il faut noter aussi que l'hémoglobine prélevée avant et après DSS sur 4 animaux par groupe est significativement plus basse dans le groupe des souris déficientes pour NOX1 (figure 7C) suggérant une sévérité plus importante dans ce groupe.

Sur le plan de l'activité clinique de la maladie évaluée seulement chez les souris n'ayant pas reçu d'antibiotique, l'index de sévérité de la perte de poids n'est pas différent entre les souris déficientes pour NOX1 et les WT (figure 8A). Le délai de survenue de selles hématiques évaluées par Hématest® est de 2.7 +/-0.8 jours pour les souris déficientes pour NOX1 et 3.6+/-1.2 jours pour les souris WT, mais à J5, 50 % des souris dans les 2 groupes avaient des selles macroscopiquement hématiques soit un délai de survenue de selles macroscopiquement hématiques équivalent (3.6 +/-0.9 jours). Le saignement digestif et la consistance des selles étaient équivalents dans les deux groupes (figure 8B et 8C). Au total, l'évolution du score d'activité clinique représenté par le cumul des scores cliniques de la

colite (poids, consistances des selles et hémorragie digestive) n'est pas significativement supérieure chez les souris déficientes pour NOX1 (figure 8D).

La quantité totale moyenne de DSS consommée sur 5 jours rapportée au poids des souris est équivalente dans les 2 groupes ; pour n= 8 souris /groupe, 63.5 +/- 16 mg/g pour les souris contrôles (C57B6/J), et 66.8 +/- 30 mg/g pour les souris déficientes pour NOX1, ce qui est supérieur aux quantités minimales rapportées pour obtenir une activité significative du DSS sur la muqueuse colique (Vowinkel T, 2004).

Une atteinte muqueuse est souvent visible macroscopiquement (nombre non répertorié) (figure 9A). Les analyses histologiques après coloration hématoxyline-éosine montrent des ulcérations de profondeurs et de surfaces variables, étagées sur l'ensemble du colon ; Il n'existe pas d'atteinte chez les souris ne recevant pas de DSS et une atteinte très nette dans les deux groupes de souris exposée au DSS (figures 9B1 à B4). L'atteinte peut être transmurale chez la souris déficientes pour NOX1 avec des atteintes péritonéales (figure 9C). Aucune recherche de gradient de sévérité selon la localisation proximale ou distale n'a été recherchée ; cette recherche aurait été justifiée compte tenu de l'expression différentielle de NOX1 selon la localisation proximal ou distale des colonocytes, mais il apparaît que la sévérité de la colite au DSS et sa localisation est très dépendante de la souche elle-même ; ayant des souris de génération F3 la comparabilité pour un critère aussi précis nécessiterait probablement de réaliser les expérimentations sur des générations F7 où la concordance génétique est >99.5%. Les scores histologiques évaluant cette sévérité et analysant le type d'atteinte ont été mesurés selon la méthode de Morteau et al (Morteau et al. 2000). Ils montrent une atteinte significative dans les 2 groupes et une sévérité significativement supérieure chez les souris déficientes pour NOX1 (figure 10A) ; Cette différence de sévérité concerne essentiellement la profondeur de la paroi atteinte (p=0.05) et la surface de l'atteinte de la muqueuse (p=0.0009) (figure 10 B);. Les scores de sévérité de la régénération (p=0.31), de la profondeur de l'atteinte de cryptes (p=0.25) ne sont pas différents, et celui de l'inflammation montre une tendance à être plus importante chez les souris déficientes pour NOX1 (p=0.13).

L'exposition au DSS 3% étant équivalente dans les 2 groupes de souris, la sévérité de l'atteinte chez les souris déficientes pour NOX1 est donc liée à l'absence de NOX1.

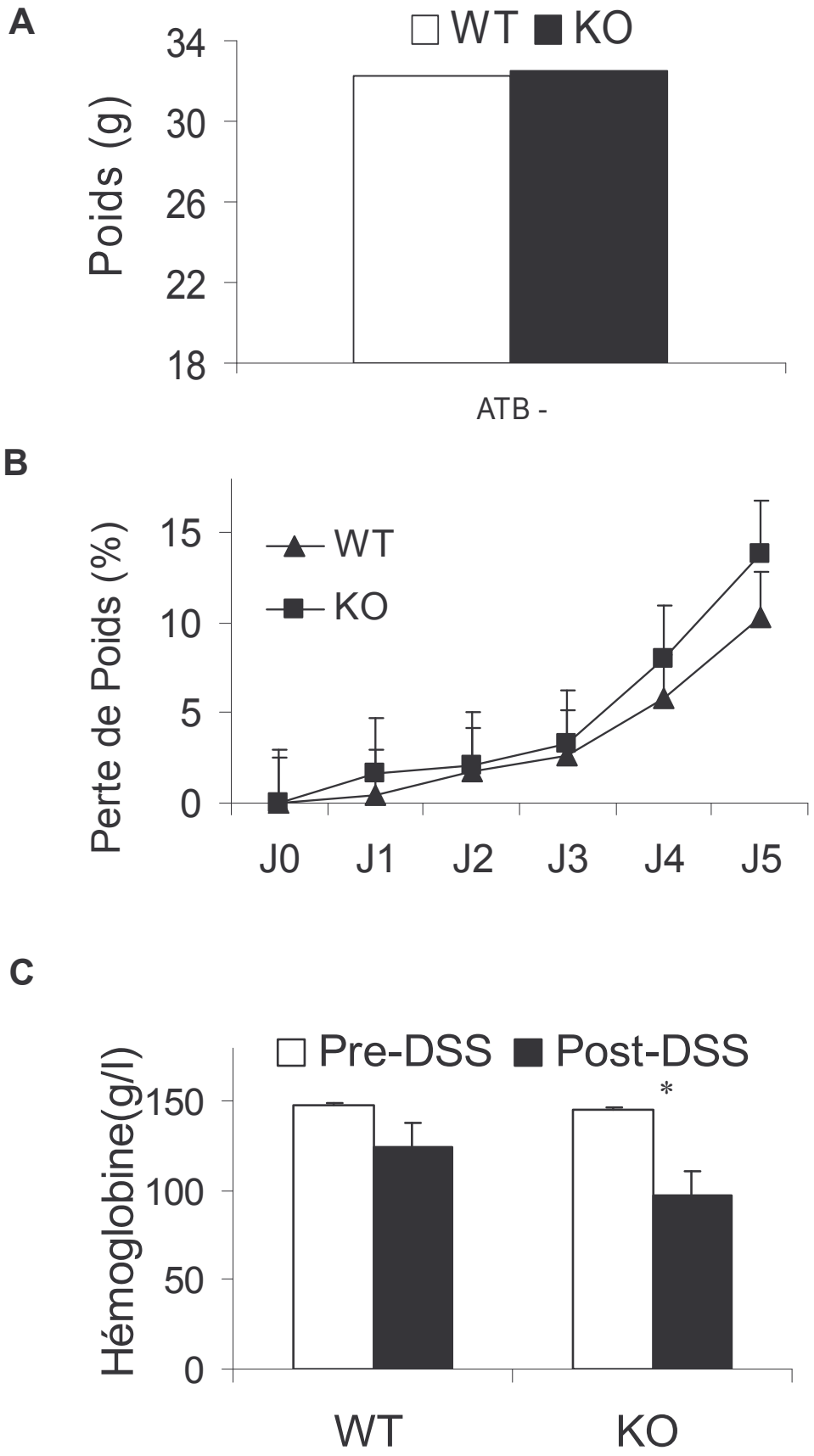


Figure 7 : Paramètres cliniques et biologiques des colites au DSS chez les souris WT et déficientes pour NOX1. Le poids de base est équivalent dans les deux groupes d'animaux soumis au DSS (**A**). L'évolution de la perte de poids n'est pas significativement différente dans les deux groupes (**B**) ; l'hémoglobine prélevée avant et après DSS sur 4 animaux par groupe est significativement plus basse dans le groupe des souris NOX1KO (**C**),*, P=0.04

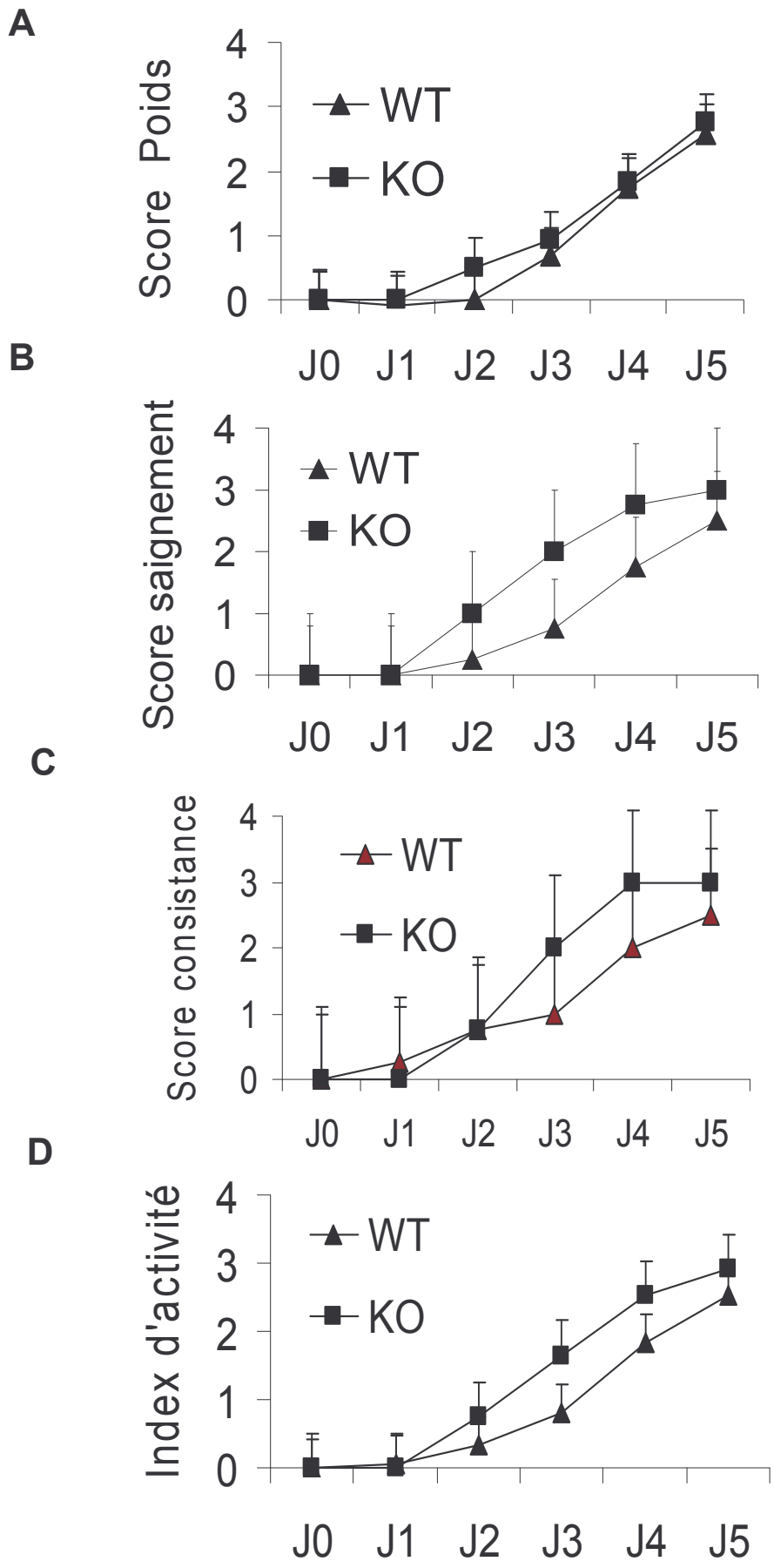


Figure 8 : Score de sévérité d la colite au DSS chez les souris WT et souris déficientes pour NOX1 (KO) (n=10/groupe). Il n'existe pas de différence entre les deux groupes pour la perte de poids (**A**), le saignement digestif (**B**), la consistance des selles (**C**), et l'index de gravité global (**D**).

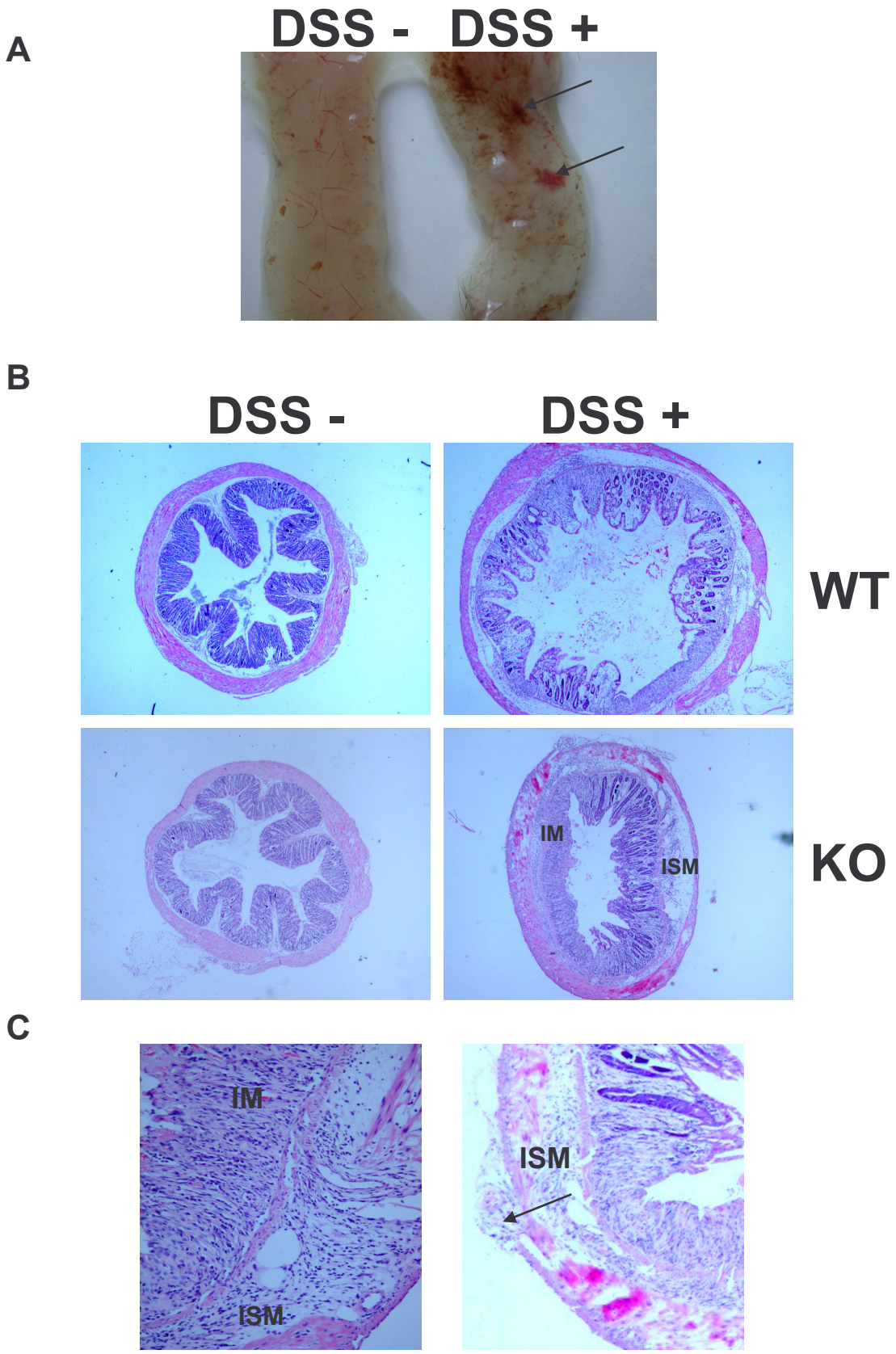


Figure 9 : Aspects macroscopiques et histologiques des colites au DSS. – aspect de zones hémorragiques multiples en cas de DSS (cf.flèches) (**A**), coupes histologiques transversales du colon transverse chez souris WT et déficientes pour NOX1 avec et sans DSS. Erosions complètes de l'épithélium, Inflammation Muqueuse (IM) et Inflammation Sous muqueuse (ISM) (**B**, 10x), Coupes histologiques de colon de souris déficientes pour NOX1 ayant reçu du DSS – aspect de péritonite (cf.flèches), Inflammation Muqueuse (IM) et Inflammation Sous Muqueuse (ISM)(**C**, 40x).

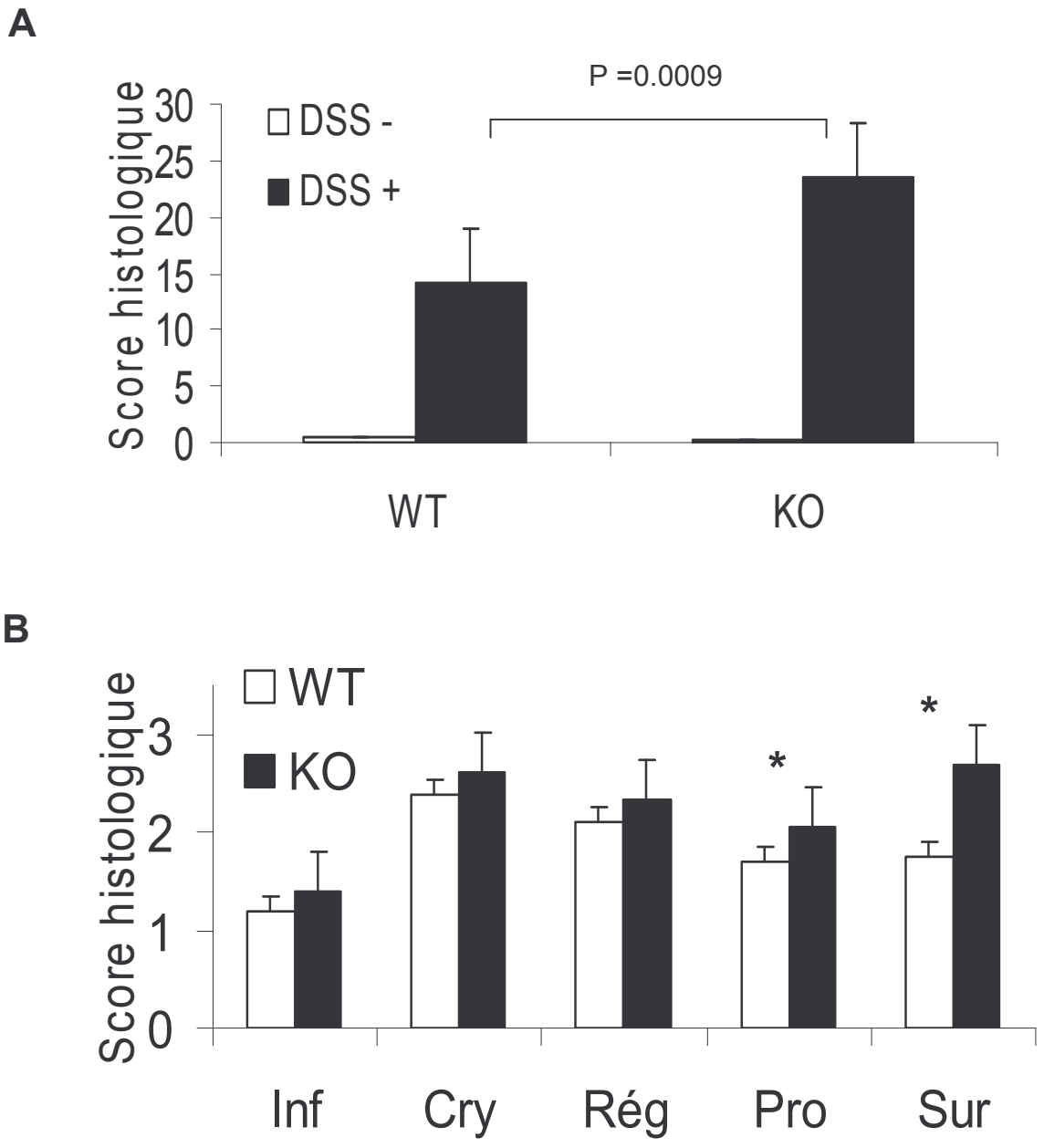


Figure 10 : Scores histologiques sur coupes transversales du colon transverse chez souris WT et déficientes pour NOX1 (KO) avec et sans DSS (4 à 6 coupes chez n=8/groupes). La colites est très nette chez les deux groupes ; LA colite est significativement plus sévère chez les NOX1 KO (**A**) . Scores de sévérité histologiques selon le type d'atteinte ; Inf = Inflammation, Cry =profondeur d'atteinte des Cryptes, Reg = Régénération épithéliale, Pro = Profondeur de l'atteinte de la paroi, Sur = Surface de l'atteinte ; La sévérité est significativement plus importante chez les NOX1 KO au niveau de la surface et la profondeur de l'atteinte ; *= $p \leq 0.05$(**B**).

B. Les bactéries sont impliquées dans la sévérité de l'atteinte de la colite à DSS chez les souris déficientes pour NOX1.

3 séries d'expérimentations d'exposition au DSS 3% ont été réalisées en associant une antibiothérapie systémique active sur une majorité des germes anaérobies et aérobies potentiellement pathogènes (imipénème et vancomycine par voies intra-péritonéales). Le poids de base des souris pour ces expérimentations était comparable entre elles (respectivement 32.1+/-0.5g pour WT et 32.3g +/-0.4g pour les souris déficientes pour NOX1) ainsi qu'à celui des souris n'ayant pas reçu d'antibiotique. L'évaluation de la perte de poids montre que l'antibiothérapie diminue la perte de poids pour les deux groupes (figure 11A) mais que l'évolution et le niveau de cette perte de poids ne sont pas significativement différents entre les 2 groupes ayant reçu des antibiotiques (figure 11B). Aucun index d'activité de la colite en dehors de cette perte de poids n'a été calculé. Les taux d'hémoglobine montrent par contre, que la perte d'hémoglobine est significativement moins importante chez les souris déficientes pour NOX1 ayant reçu des antibiotiques suggérant une diminution de la sévérité de la colite plus importante chez ces souris comapratively aux souris WT (figure 11C). La sévérité histologique de l'atteinte colique est significativement diminuée dans les deux groupes (figure 12A) mais cette diminution est significativement plus importante pour les souris déficientes pour NOX1 que pour les WT (figure 12A). Il persiste toutefois une atteinte largement supérieure aux souris n'ayant pas reçu de DSS (figure 10A). La diminution de la sévérité concerne à la fois l'inflammation, la profondeur de l'atteinte de la muqueuse, la profondeur de l'atteinte des cryptes, et la surface de l'atteinte pour les deux groupes (figure 12B et 12C). Cependant, chez souris déficientes pour NOX1, c'est la surface de l'atteinte et la profondeur de l'atteinte de la muqueuse qui diminuent le plus ; elles deviennent toutes deux équivalentes à celles des souris WT sous antibiotique (figure 12D) alors qu'elles étaient significativement différentes sans antibiotiques (figure 10B).

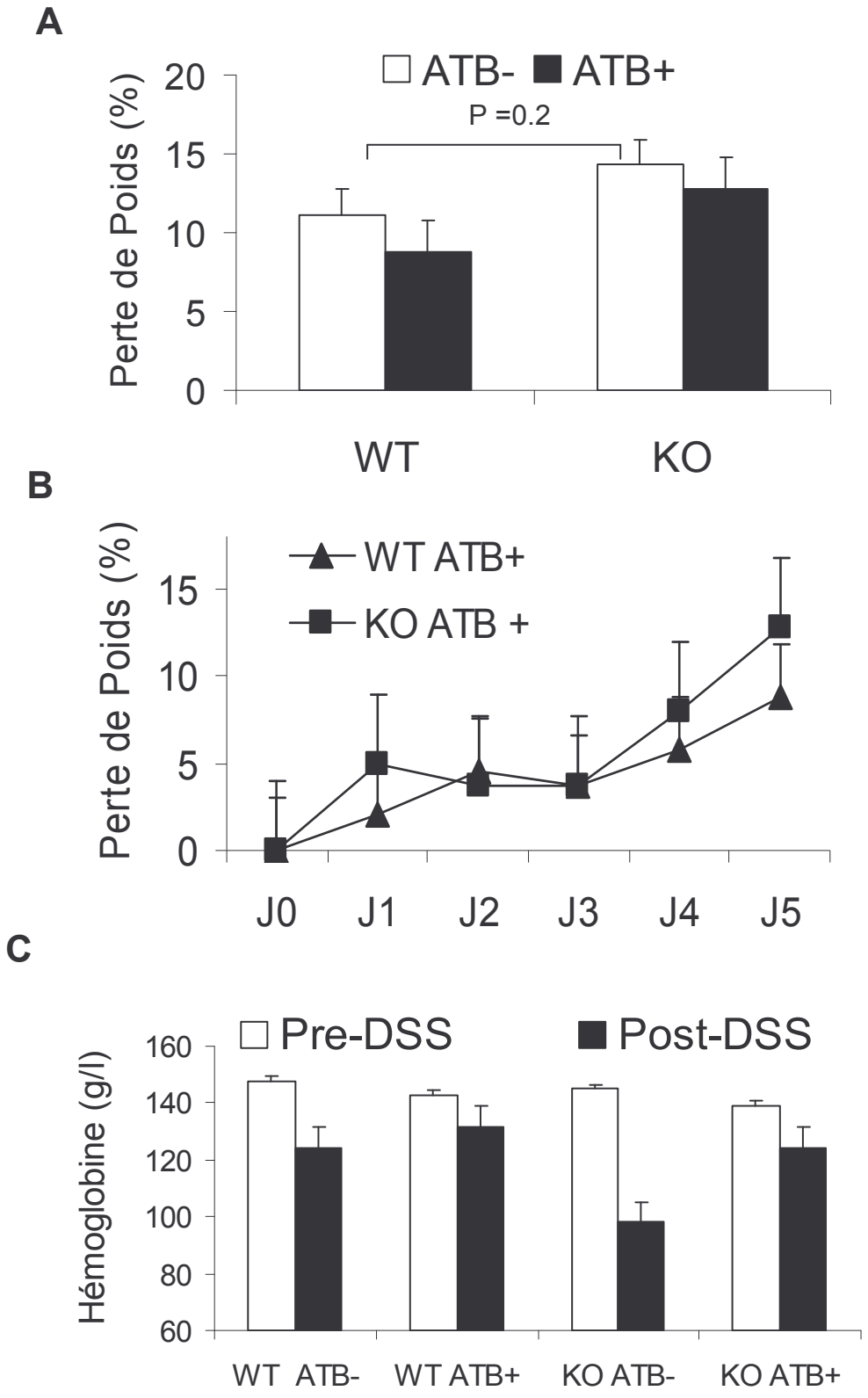
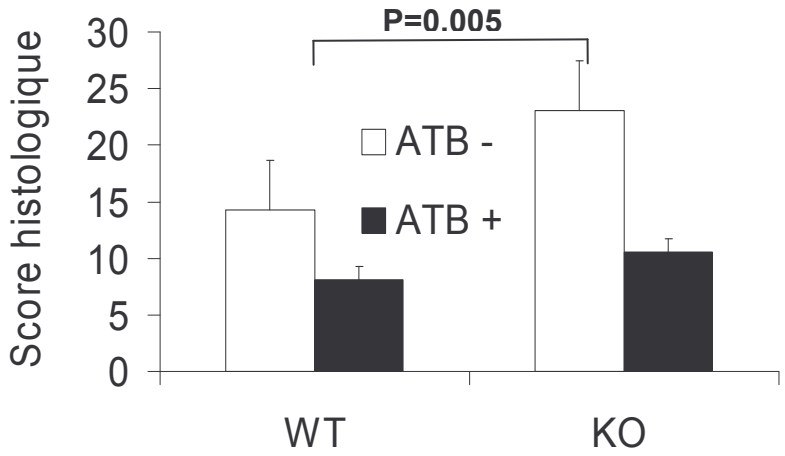
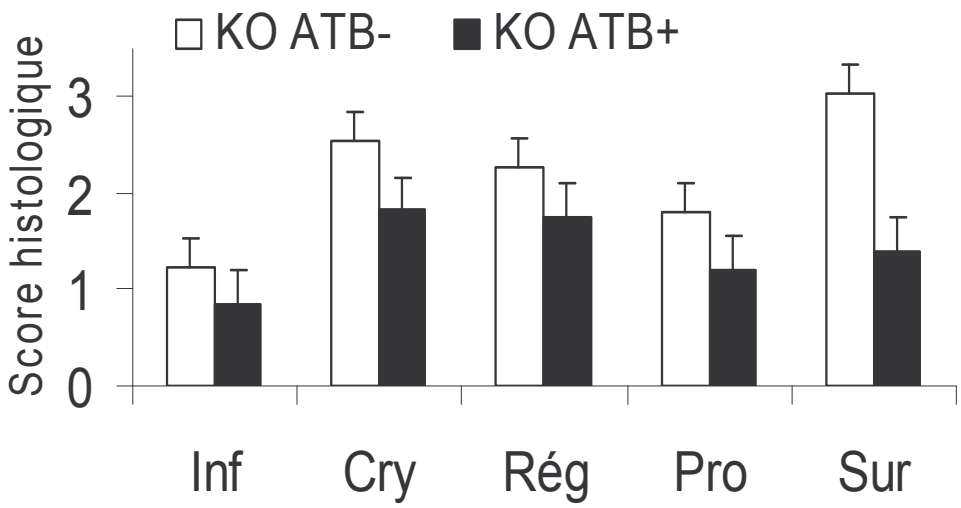


Figure 11: Paramètres cliniques et biologiques des colites au DSS chez les souris WT et déficientes pour NOX1 (KO) ayant reçu des antibiotiques (imipénème et vancomycine).
Le poids de base des souris de tous les groupes est comparable avec ou sans antibiotique. L'antibiothérapie diminue la perte de poids pour les deux groupes(**A**) (l'évolution et le niveau de la perte de poids ne sont pas significativement différents entre les 2 groupes ayant reçu des antibiotiques **B**). La perte d'hémoglobine est par contre significativement moins importante chez les souris déficientes pourNOX1 (KO) ayant reçu une antibiothérapie (**C**). Cela suggère, malgré l'absence d'autre différence évidente, une diminution de la sévérité de la colite plus importante chez les souris déficientes pour NOX1 *p=0.05.

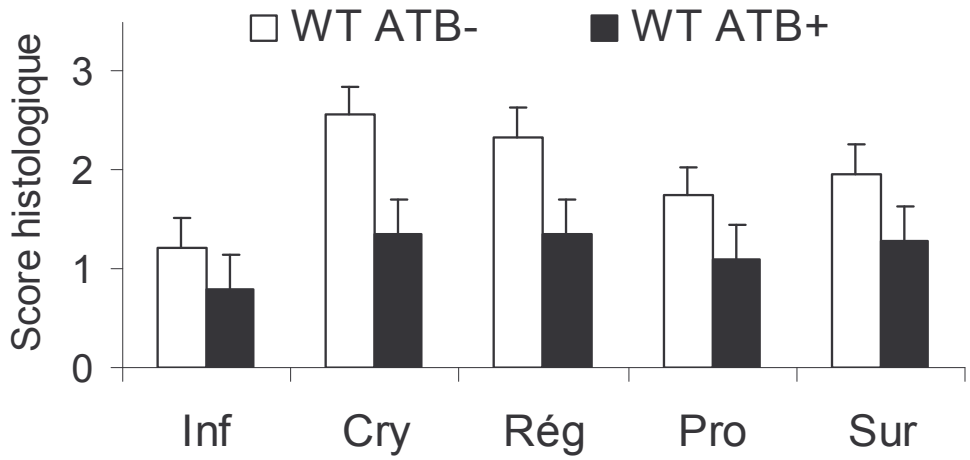
A


P=0.005
Score histologique
30
25
20
15
10
5
0
ATB -
ATB +
WT
KO

B


KO ATB-
KO ATB+
Score histologique
3
2
1
0
Inf
Cry
Rég
Pro
Sur

C


WT ATB-
WT ATB+
Score histologique
3
2
1
0
Inf
Cry
Rég
Pro
Sur

D

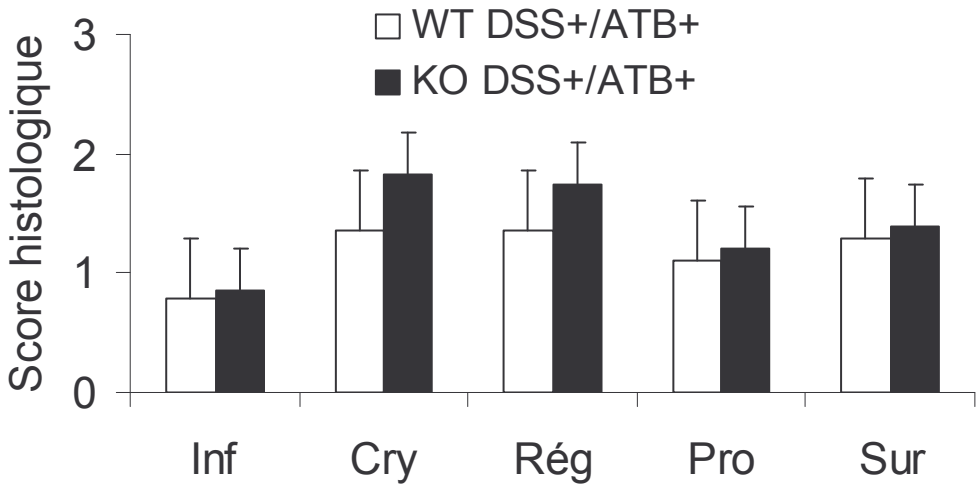

WT DSS+/ATB+
KO DSS+/ATB+
Score histologique
3
2
1
0
Inf
Cry
Rég
Pro
Sur

Figure 12 : Scores histologiques sur coupes transversales du colon transverse chez souris WT et déficientes pour NOX1 avec DSS, avec et sans antibiotiques (Imipénème et vancomycine) (4 à 6 coupes chez n=6/groupes). Pour les deux groupes, souris wild type (WT) et déficientes pour NOX1 (KO), la sévérité histologique de l'atteinte colique est significativement diminuée par les antibiotiques, mais elle est significativement plus diminuée chez les souris NOX1 KO (**A**). La diminution concerne à la fois l'inflammation, Les cryptes, la profondeur de l'atteinte et la surface de l'atteinte pour les NOX1 KO (**B**) et pour les WT (**C**). La diminution de la surface et de la profondeur atteinte est si importante qu'il n'existe plus de différence entre les NOX1 KO et les WT (**D**).
Inf = Inflammation, Cry =profondeur d'atteinte des Cryptes, Reg = Régénération épithéliale, Pro = Profondeur de l'atteinte de la paroi, Sur = Surface de l'atteinte ; *$p \leq 0.05$.

Bactériologie

En raison de l'effet de l'antibiothérapie dans ce modèle de colite, il semblait justifié de vérifier la bactériologie colique. L'analyse bactériologique classique semi-quantitative réalisée sur 2 expérimentations ne montre pas de différence significative (n=6/groupe). En l'absence de traitement par DSS, une flore plus abondante est présente dans le groupe WT mais aucun test statistique n'a pu être réalisé en raison du nombre trop peu important de prélèvements. *Lactobacillus*, *Escherichia coli* et *Bacteroides sp* sont les principales bactéries retrouvées. Sous DSS, la flore globale paraît plus importante chez les souris déficientes pour NOX1; *Lactobacillus*, *Escherichia coli* sont les germes retrouvés alors que *Bacteroides sp* n'est plus retrouvé dans aucun deux groupes de souris (n=4).

C. Les Neutropénies induites au 5 FU sont plus sévères chez les souris déficientes pour NOX1

La mortalité globale est de 3/26 chez les souris WT et 6/26 chez les souris déficientes pour NOX1 donc sans différence significative entre les groupes. Dans les conditions conventionnelles, la mortalité est de 6/14 chez les souris déficientes pour NOX1 et 2/14 chez les WT (p=0.09) (figure 14A). Dans les conditions SPF, la mortalité est de 0/12 chez les souris déficientes pour NOX1 et 1/12 chez les souris WT. La mortalité était supérieure en animalerie conventionnelle ; cependant cette mortalité supérieure ne concernait significativement que le groupe de souris déficientes pour NOX1 suggérant leur susceptibilité vis-à-vis de l'environnement bactérien.

Le 5-FU a eu une myélotoxicité équivalente dans les 2 groupes de souris quelque soit les conditions d'expérimentation (SPF et conventionnelle); les taux de polynucléaires

neutrophiles (PNN) sont respectivement de 284/mm^3 et 350/mm^3 pour les souris déficientes pour NOX1 et les WT. Les taux d'hémoglobine et les hématocrites sont équivalents avant le 5-FU et diminuent dans les deux groupes de manière comparable (figure 13A, 13B, 13C). La variation maximale de température sur 8 jours est équivalente dans les 2 groupes, 2.09°C +/- 1.3 pour les WT et de 2.2°C +/-1.2 chez les souris déficientes pour NOX1 (p=0.2); la perte de poids maximale pendant la phase de neutropénie est significativement supérieure chez les souris déficientes pour NOX1 (12.4 %) par rapport aux WT (6.4%) (p=0.02). Concernant les expérimentations dans le secteur d'animalerie conventionnelle la perte de poids est significativement supérieure dans le groupe de souris déficientes pour NOX1 (16.5% versus 8.1% p=0.05) mais les variations de température sont comparables (figure 14b et 14C). Les expérimentations dans le secteur SPF montrent une perte de poids supérieure chez les souris déficientes pour NOX1 (3.2% versus 8.1% p=0.04) et aucune différence concernant les variations de températures (figure 15A et 15B).
Pour des raisons de sécurité en zone conventionnelle, absence de hotte P2 dans l'animalerie, nous avons réalisé les expérimentations de quantification bactérienne dans les organes (foie, rate) uniquement dans des conditions SPF.

Sur le plan bactériologique, en zone conventionnelle, les liquides péritonéaux ont été retrouvés infectés chez 3/12 des souris déficientes pour NOX1 et chez aucune des WT (0/12) ; toutefois, la rate n'a été retrouvée positive que chez les souris WT (tableau n° 3).
En zone SPF, le nombre de souris positives en culture pour le foie et pour la rate est plus élevé chez les souris déficientes pour NOX1 que chez les souris contrôles (WT) mais de façon non significative (p=0.2) (tableau n°3). La quantification bactérienne retrouve des quantités de bactéries supérieures chez les souris déficientes pour NOX1 pour le foie (p= 0.02) mais aucune différence pour la rate (figure 15C).
Les types de bactérie identifiées sont des bactéries d'origine colique (*Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Lactobacillus, Aerococcus,, Staphylococcus sp*,) argumentant pour la réalité de la translocation bactérienne d'origine colique. Une plus grande diversité de bactérie est retrouvée dans les prélèvements souris WT : 1/12 prélèvements des souris déficientes pour NOX1 a retrouvé plus d'une espèce bactérienne alors que 6/11 a retrouvé au moins deux bactéries chez les WT. Ceci suggère l'existence de flores bactériennes différentes chez les souris déficientes pour NOX1 et les WT.

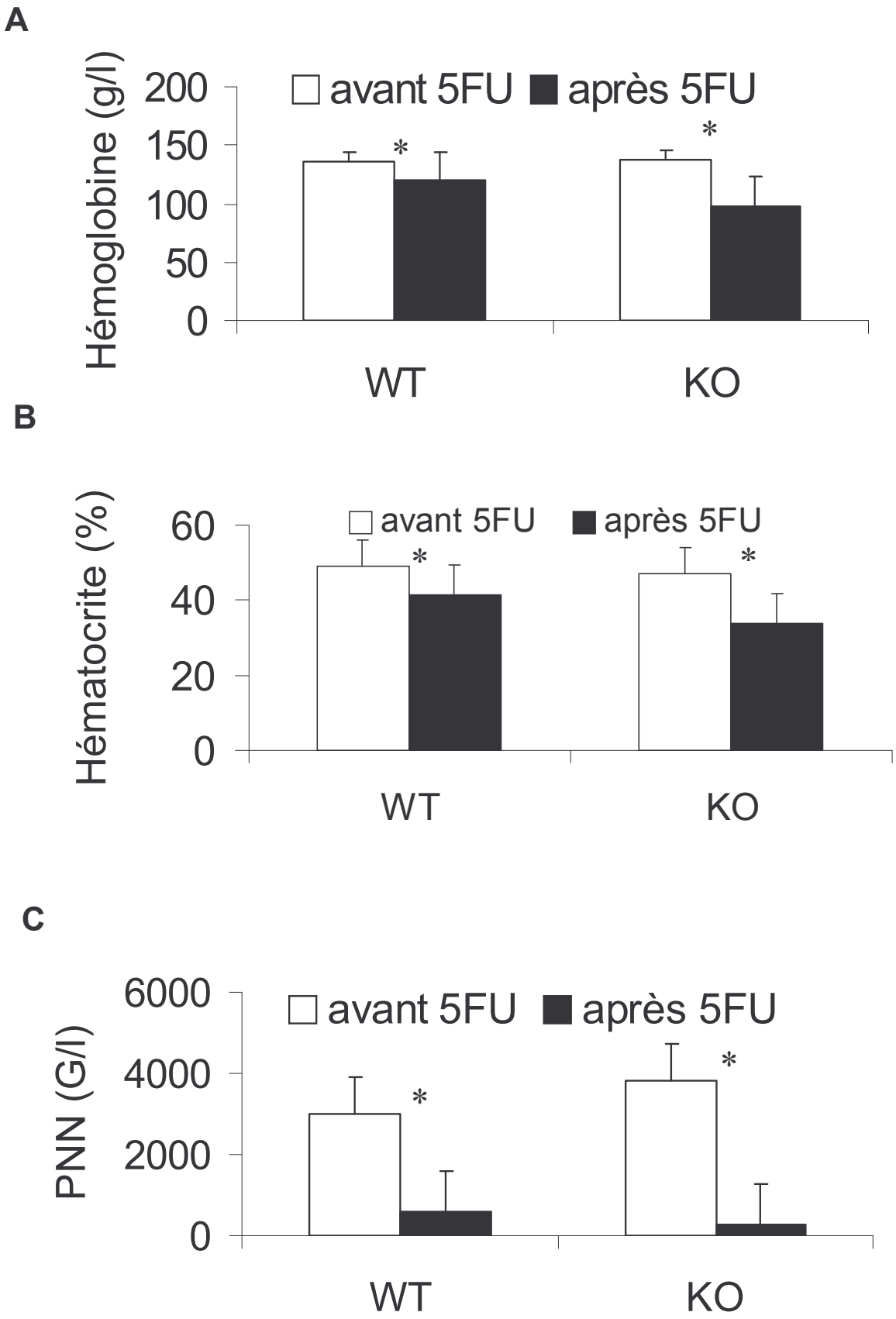


Figure 13 : Paramètres biologiques avant et après injection de 5 Fluoro-Uracile chez les souris WT et déficientes pour NOX1 (KO). Les taux d'hémoglobine (**A**), d'hématocrites (**B**), les taux de polynucléaires neutrophiles (**C**) de base sont comparables dans les deux groupes ; Les modifications sous 5FU notamment la profondeur de la neutropénie sont aussi comparables pour les deux groupes. *p<0.05

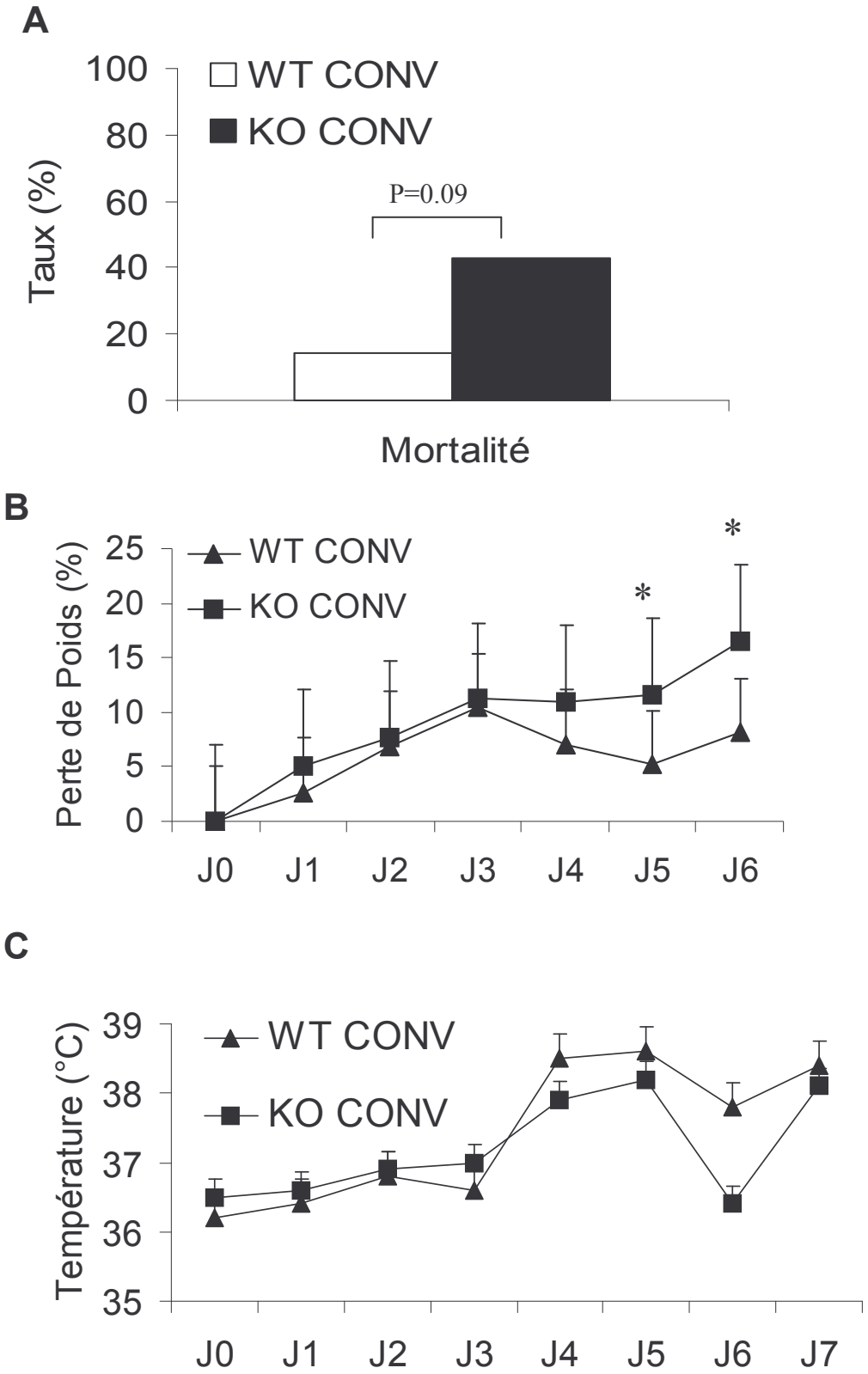


Figure 14 : Expérimentations de Neutropénies Induites en animalerie conventionnelle ; Paramètres cliniques (n=8/groupe). La mortalité tend à être supérieure chez les NOX1 KO (p=0.09) (**A**) La perte de poids est supérieure chez les souris déficientes pour NOX1 (16.5% versus 8.1% p=0.05) (**B**) mais aucune différence n'existe sur les variations de températures.(**C**) WT CONV , expérimentations sur souris contrôle en animalerie conventionnelle, KO CONV, expérimentations sur souris NOX1 KO en animalerie conventionnelle. *p<0.05

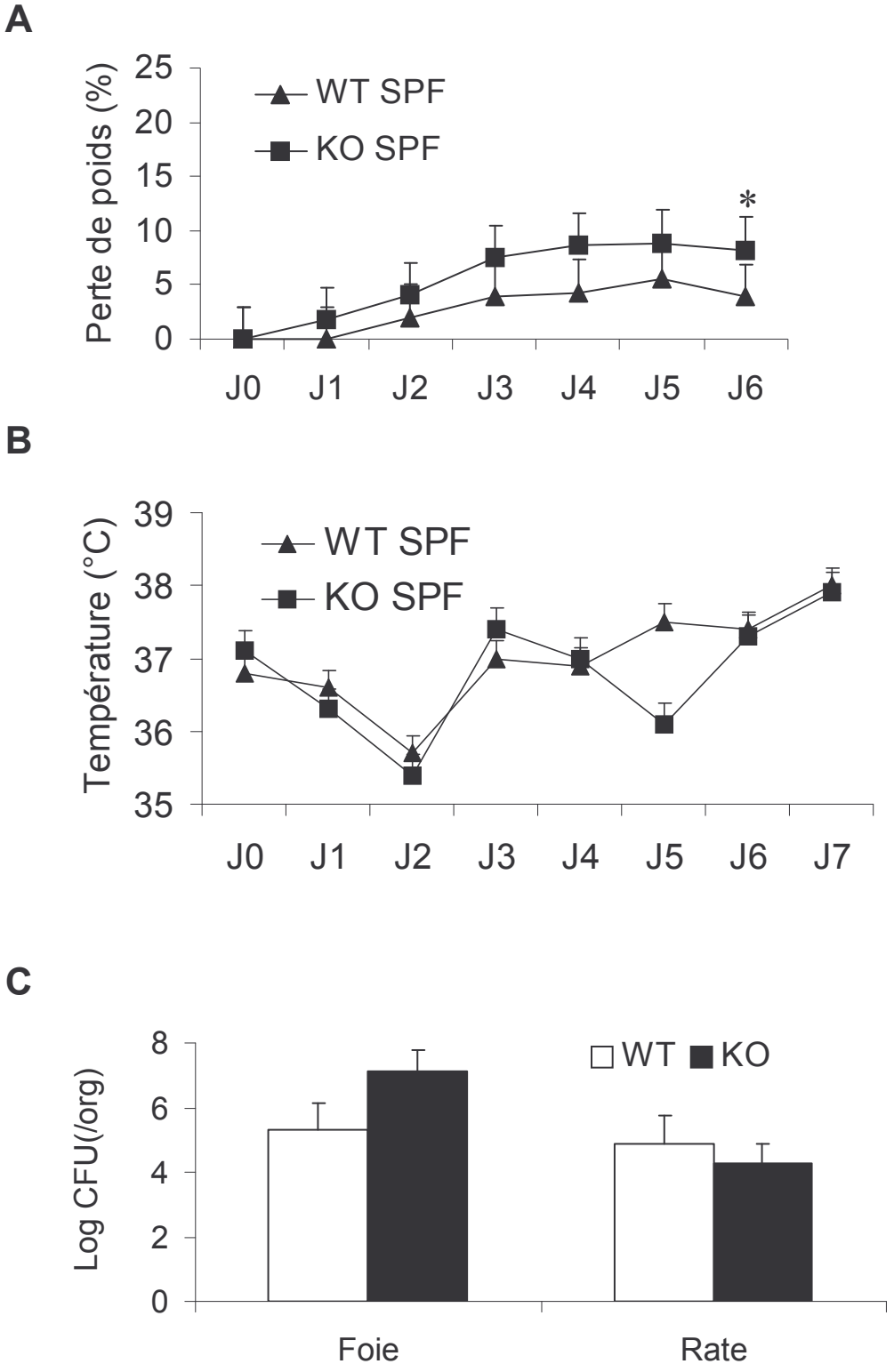


Figure 15 : Expérimentations de Neutropénies Induites en animalerie SPF ; Paramètres cliniques et bactériologiques quantitatifs (n=8/groupe). La perte de poids est supérieure chez les souris déficientes pour NOX1 (3.2% versus 8.1% p=0.04) (**A**) mais aucune différence n'existe sur les variations de températures (**B**) La quantité de bactérie retrouvée dans le foie est plus importante chez les souris déficientes pour NOX1. Il n'existe pas de différence dans la rate (**C**). *p<0.05

Tableau n° 3 : Identification bactérienne des prélèvements réalisés lors des expérimentations de neutropénies induites par le 5 Fluoro-Uracile. Les souris déficientes pour NOX1 ont une diversité bactérienne inférieure celle des souris Wild Type (WT) ; il n'existe pas de type bactérien différent entre les deux groupes. Parmi les souris en animalerie conventionnelle, 3/8 des souris déficientes pour NOX1 sont mortes et 1 parmi les souris WT.

		WT Conv. n=8	**NOX1 KO Conv. n=8**	**WT SPF n=11**	**NOX1 KO SPF n=12**
Foie	Positif (n/total)	2/7	1/5	8/11	11/12
	Germe	*Lactobacillus sp* Escherichia coli	*Enterococcus sp*	*Escherichia coli* *Lactobacillus sp* *Germella sp* *Enterococcus sp*	*Escherichia coli* *Aeroccocus sp*
	Nb de germe /prélèvement	2	1	4	1
Rate	Positif (n/total)	2/8	0/5	7/11	10/12
	Germe	*Streptoccocus sp*	-	*Escherichia coli* *Lactobacillus sp* *Gemella sp* *Enterococcus sp* *Aerococcus sp*	*Escherichia coli* *Aeroccocus sp*
	Nb de germe /prélèvement	1	-	3	2
Liquide péritonéal	Positif (n/total)	0/7	3/5	NR	NR
	Germe	-	*Escherichia coli* *Enterococcus sp* *Lactobacillus sp*	-	-
	Nb de germe /prélèvement	-	1	-	-
Hémoculture	Positif (n/total)	1/7	2/5	NR	NR
	Germe	*Streptococcus sp* *Escherichia coli*	*Escherichia coli* *Enterococcus sp*	-	-
	Nb de germe /prélèvement	2	1	-	-

Conv : Conventionnelle, SPF : Libre de pathogène spécifique ; NR : Non Réalisé;

3. Discussion

A. La colite au DSS est plus sévère chez les souris déficientes pour NOX1

Nos résultats peuvent se résumer ainsi : aucune différence de sévérité clinique de la colite au DSS n'est retrouvée avec les scores cliniques habituels mais la perte d'hémoglobine plus importante chez les souris déficientes pour NOX1 suggère un syndrome hémorragique plus sévère ; L'atteinte histologique est significativement plus importante chez les souris déficientes pour NOX1 avec des atteintes plus profondes et plus diffuses corroborant en partie les résultats sur l'hémoglobine.
L'antibiothérapie diminue la sévérité de l'atteinte colique dans les 2 groupes mais est plus efficace chez les souris déficientes pour NOX1. Les analyses bactériologiques montrent une différence qualitative avec une tendance à une diversité bactérienne inférieure chez les souris déficientes pour NOX1 quelque soit le type de prélèvement.

La possibilité d'un rôle de NOX1 dans un processus de défense antibactérienne est soulevée en raison de plusieurs arguments ; il existe une production d'espèces radicalaires au niveau du colon et celle-ci suit le gradient d'expression de NOX1 à savoir une production/expression plus faible au niveau du colon proximal et un haut niveau de production/expression au niveau du colon distal. NOX1 peut être surexprimée en présence de cytokine proinflammatoires d'interféron-γ (Geiszt, Lekstrom et al. 2003; Kuwano, Kawahara et al. 2005) ou d'éléments des parois bactériennes tels que les lipopolysaccharides (Kawahara, Kuwano et al. 2001; Kawahara, Kohjima et al. 2005) et les flagellines (Geiszt, Lekstrom et al. 2003). Une surproduction d'espèces radicalaires a aussi été récemment mise en évidence dans les cellules épithéliales coliques *ex vivo* en présence de Interferon γ (Kuwano, Kawahara et al. 2005).
L'existence d'une production d'espèces radicalaires dans des pathologies inflammatoires où les bactéries ont été impliquées (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) (Grisham 1994; Podolsky 2002), une homologie de structure proche de NOX1 et NOX2, ainsi que la restauration de la production de $O2^{\cdot}_{-}$ de cellules phagocytaires déficientes en NOX2 après transduction avec un plasmide contenant NOX1 (Geiszt, Lekstrom et al. 2003) sont par ailleurs des arguments indirects de l'implication potentielle de NOX1 dans la bactéricidie.

Les résultats rapportés ici démontrent un lien entre la sévérité d'une colite induite par le DSS et l'absence de NOX1. La colite au DSS est une colite inflammatoire impliquant de nombreux facteurs de l'inflammation dont la liste non exhaustive est répertoriée dans le tableau n°4 (Strober et al. 2002). Cependant plusieurs facteurs influencent la sévérité ou la survenue même de la colite. Il s'agit du fond génétique (Mahler et al. 1998; Krieglstein et al. 2001; Krieglstein et al. 2001; Vowinkel et al. 2004), du poids moléculaire du DSS (Vowinkel, Kalogeris et al. 2004), de la charge totale en DSS (calculée en mg/g de poids total de l'animal), et de la durée d'exposition au DSS (Vowinkel, Kalogeris et al. 2004). Il existe en effet des variations importantes de susceptibilité au DSS en fonction de la souche de souris tant au niveau de la réponse clinique que sur la localisation et la sévérité de l'atteinte histologique (Strober, Fuss et al. 2002) .

Les souches C57B6/J montrent une atteinte sur l'ensemble du colon prédominant dans le colon distal mais sont sont aussi la souche pour laquelle l'atteinte du colon intermédiaire est la plus importante (Mahler, Bristol et al. 1998). La souche sv/129 qui est la souche utilisée à la conception de la souris DÉFICIENTES POUR NOX1 montre habituellement un gradient de sévérité entre le colon proximal (absence d'atteinte) et le colon distal (atteinte maximale), comparable à celles des C57B6/J. Il est important de noter que dans ces deux souches le sexe mâle est un facteur de susceptibilité au DSS (Mahler, Bristol et al. 1998). L'ensemble de nos expérimentations ayant été effectué chez des souris mâles, aucune variation ne peut être en relation avec ce caractère. La charge en DSS est aussi un facteur déterminant dans la sévérité de la colite (Vowinkel, Kalogeris et al. 2004); cette charge totale n'a été réellement mesurée que quelques fois (Cooper et al. 1993; Vowinkel, Kalogeris et al. 2004); le plus récemment, chez des souris C57B/6J, Vowinkel et col ont montré qu'à un seuil inférieur à 30mg/g de poids total de la souris, la survenue d'une colite n'est ni systématique ni reproductible en terme de sévérité (Vowinkel, Kalogeris et al. 2004). L'ensemble de ces facteurs limite la comparaison des différents modèles entre eux lorsqu'ils ne sont pas répertoriés, voire rendent contestables l'implication même des gènes étudiés.

Tableau n°4 : Etudes concernant les colites au Dextran Sulfate Sodium (DSS) selon la thématique, les objectifs de recherche, la quantité de DSS, le poids moléculaire du DSS utilisé, la souche de la souris et la durée d'exposition au DSS. Il existe des différences de sévérité de colite en fonction de tous ces paramètres. (d'après Strober, Fuss et al. 2002)

Sujet de recherche	*Type de recherche*	*DSS (%)*	*PM (kDa)*	*souche de souris*	*Durée D'exposition (jours)*
Morphologie	Bactérie, histologie	3–10	54	Balb/c	6–10
	Histologie	5	30–40	Swiss W.	7
	Histologie	5	40	Balb/c	7
	Étude de mortalité	5	40	Balb/c	7
Immunologie	SCID	5	40	Balb/c, C3H	7
	Appendice, rate	2.5	40	C57	7
	ICAM-1, E-selectine	5	5	Balb/c	7
	Interleukin-18	2	40	C57	7
	P-Selectine	5	40	Balb/c	5
	Integrine ®1¯1	5	40	Balb/c	7
stress Oxidatif	Nitric oxide and superoxyde	3	40	C57	7
	Superoxyde	5, 10	40, 500	C57	8
	Phenylbutylnitrone	8	8	Balb/c	7
Traitements	TNF®	4	40	Swiss W.	5
	Peptide RDP58	2.5	40	C57	6
	Inosine	5	40	Balb/c	10
	Leptine	3.5	40	C57	5
	Pravastatine	3	44	C57	10
	Roquinimex	5	na	Balb/c	5–6
	Fibroblast growth factor	4	na	Balb/c	7
Génétique	DSS loci	3.5	36–46	C57	5
	P-Glycoprotéine	7	na	Balb/c	7

L'atteinte histologique est caractérisée par la survenue d'ulcérations de la surface épithéliale et des cryptes puis d'une inflammation muqueuse et sous-muqueuse pouvant détruire l'ensemble de l'architecture de la muqueuse (Vowinkel, Kalogeris et al. 2004); Les éléments de cette inflammation sont essentiellement des polynucléaires. Une réponse lymphocytaire secondaire est reconnue et serait en phase aiguë de type Th1 et de type mixte (Th1/Th2) dans les colites chronique (Strober, Fuss et al. 2002). L'atteinte mime la maladie de Crohn avec une atteinte profonde et segmentaire (Cooper, Murthy et al. 1993; Mahler, Bristol et al. 1998; Vowinkel, Kalogeris et al. 2004).

Les mécanismes physiopathologiques conduisant à la colite induite par le DSS et à sa sévérité sont incomplètement connus. Cependant, de nombreux arguments plaident en faveur d'une activation macrophagique initiale et donc, à une inflammation T indépendante ; des lésions ont été en effet retrouvées chez des souris SCID exposées au DSS ; secondairement seulement, une activation lymphocytaire (Th1 puis Th1/Th2) et des cellules NK (Strober, Fuss et al. 2002; Vowinkel, Kalogeris et al. 2004) joueraient un rôle dans la persistance de la colite (Krieglstein, Cerwinka et al. 2001; Krieglstein, Cerwinka et al. 2001). La réponse initiale macrophagique serait en lien avec une altération fonctionnelle des cellules épithéliales coliques précédant la survenue de la colite (modification des capacités de perméabilité et de sécrétion) (Strober, Fuss et al. 2002). Ces modifications fonctionnelles semblent aussi jouer un rôle dans l'initiation de l'inflammation par l'intermédiaire de cytokines proinflammatoires. En effet, un grand nombre de cytokines est impliqué dans la réponse initiale parmi lesquelles TNFα et IL6 seraient les plus importantes (Strober, Fuss et al. 2002). Toutefois, il a aussi été démontré que les bactéries de la flore colique jouent un rôle tant comme inducteurs que promoteurs de la colite au DSS (Rath, Schultz et al. 2001; Rakoff-Nahoum et al. 2004). L'agression directe par l'agent physico-chimique conduit à la destruction des cellules épithéliales coliques et secondairement à l'exposition de la muqueuse à la flore colique (Strober, Fuss et al. 2002).

Nous retrouvons ici des données comparables à quelques autres modèles de souris déficientes en certains gènes (IL10, TLR4, MyD88) ayant des fonds génétiques communs de type C57B6/J. Les scores cliniques et histologiques retrouvés chez nos souris contrôles correspondent aussi à ceux qui ont déjà été observés (Krieglstein, Cerwinka et al. 2001; Krieglstein, Cerwinka et al. 2001; Strober, Fuss et al. 2002; Vowinkel, Kalogeris et al. 2004); La mortalité, la perte de poids entre 5 et 10 % au jour 5 et le taux de souris présentant des saignements micro ou macroscopiquement détectables sont aussi comparables aux données déjà publiées (Strober, Fuss et al. 2002; Vowinkel, Kalogeris et al. 2004). Une dissociation entre l'aspect clinique et histologique existe aussi dans certains modèles notamment les C57B6/J. Ces variations sont aussi dépendantes des charges en DSS et des conditions d'élevage (conditions libres de pathogènes spécifiques ou conditions conventionnelles) (Mahler, Bristol et al. 1998; Vowinkel, Kalogeris et al. 2004).

Dans l'étude présente, les deux groupes de souris ont un fond génétique commun minimal de 87.5% (génération F3) ; les conditions d'élevage sont équivalentes de la naissance à la participation aux expérimentations. Les charges en DSS ont été vérifiées chez 8 animaux de chaque groupe et sont équivalentes ; elles correspondent à des doses d'exposition suffisantes pour obtenir des colites reproductibles (Vowinkel, Kalogeris et al. 2004). En conséquence,

l'augmentation de la sévérité des colites chez les souris DÉFICIENTES POUR NOX1 est liée à l'absence du gène de NOX1, suggérant un rôle protecteur de NOX1 permettant de limiter l'inflammation colique.

Ces résultats peuvent paraître contradictoires considérant une enzyme spécialisée dans la production d'espèces radicalaires initiant habituellement une réelle cascade inflammatoire. Des études ont en effet démontré un rôle des espèces radicalaires et de leurs dérivés dans la sévérité des pathologies inflammatoires coliques (McKenzie et al. 1996); plus récemment un haut niveau d'expression d'ARNm de NOX1 a été retrouvé au niveau de lésions de pathologies inflammatoires coliques (RCUH et Crohn) sans que puisse être déterminé s'il s'agissait d'une cause ou d'une conséquence des colites (Szanto, Rubbia-Brandt et al. 2005).

Ainsi, les implications physiologiques et physiopathologiques de NOX1 au niveau colique sont nombreuses.

Les constats observés à J5 du modèle de colite induit par le DSS, ne permettent pas une interprétation mécanistique fine du rôle de NOX1 au niveau de la muqueuse colique mais trois hypothèses au moins peuvent être néanmoins discutées.

L'implication de NOX1 dans la prolifération cellulaire colique, dans la régulation de la biodisponibilté du Nitrite Oxyde (NO) et dans les défenses antimicrobiennes.

a) NOX1 et proliféraion cellulaire colique

Les espèces radicalaires d'une part et NOX1 d'autre part ont été associées à une activité proliférative tant dans des modèles *ex vivo* qu'*in vivo* (Arnold, Shi et al. 2001; Geiszt, Lekstrom et al. 2003; Lambeth 2004) ; Un rôle d'induction de la prolifération cellulaire de NOX1 a été d'ailleurs l'une des premières fonctions envisagée et mise en évidence à la fois dans une culture cellulaire stable exprimant NOX1, NIH 3T3 et dans la survenue de tumeur chez des souris athymique (Lambeth 2004).

Depuis, des arguments contradictoires ont été publiés :

En faveur de l'hypothèse, i) présence d'une expression de NOX1 élevée dans des sites à haute prolifération cellulaire tel que le colon (Suh, Arnold et al. 1999; Lambeth 2004), ii) corrélation entre niveau d'expression de NOX1 et type d'adénocarcinome (Fukuyama, Rokutan et al. 2005); iii) Implication des Espèces Radicalaires notamment H_2O_2 dans la régulation génique de facteurs de prolifération tels que TGF (Tumor Growth Factor) (Arnold, Shi et al. 2001; Lambeth 2004; Laurent et al. 2005).

Mais a l'opposé, i) Implication de V12ras en tant que facteur proliferatif plutôt que NOX1 dans le modèle initial présenté par Suh et al (Suh, Arnold et al. 1999), ii) dans un système de

culture cellulaire issue de cellules de tumeur cancéreuse colique (HT29), l'augmentation de l'expression de NOX1 diminue la prolifération cellulaire (Geiszt, Lekstrom et al. 2003); iii) absence de NOX1 dans la survenue de pathologie cancéreuse (Szanto, Rubbia-Brandt et al. 2005) ou expression de NOX1 présente dans les tumeurs les plus différentiées (Geiszt, Lekstrom et al. 2003). Nos résultats n'excluent pas la possibilité d'un impact de NOX1 dans la colite au DSS par un effet positif sur les capacités de prolifération cellulaire et de reconstruction tissulaires des cellules épithéliales coliques. Il a en effet été rapporté que le DSS dans les modèles de colite aiguë diminuait la prolifération cellulaire (Tessner et al. 1998). Les résultats de notre modèle sont a priori compatibles avec l'hypothèse du rôle de NOX1 sur les capacités proliferatives; la sévérité de la colite serait en ce cas en lien avec une diminution de la prolifération plus importante chez les souris NOX1KO. Cependant, le rôle des antibiotiques dans la diminution de la sévérité pour les deux groupes de souris ne peut pas être expliqué de façon simple. Deux études récentes associant DSS et mesures de la prolifération cellulaire ont par ailleurs montré que les modifications de cette prolifération cellulaire induite par le DSS étaient moins en cause dans la sévérité de l'atteinte épithéliale que dans le délai de restitution de l'épithélium (Rakoff-Nahoum, Paglino et al. 2004; Fukata et al. 2005). Allant dans ce sens, dans notre étude, le score de sévérité concernant la régénération qui peut être considéré comme un marqueur indirect d'une capacité de prolifération, n'est pas différent entre les souris DÉFICIENTES POUR NOX1 et WT. La surface de l'atteinte ainsi que la profondeur de l'atteinte semble plus en cause dans les différences observées suggérant un lien plus étroit avec l'atteinte directe de l'épithélium ou une facilitation du caractère invasif du processus inflammatoire. Cette hypothèse ne devrait donc être recevable qu'en étudiant des modèles de colites chronique au DSS permettant d'évaluer dans le temps la régénération de l'épithélium colique. L'utilisation de marqueurs immunohistochimiques tels que le ¨PCNA (Proliferative cell Nuclear antigen) ou le Bdru sur les histologies des colites aiguës (Tessner, Cohn et al. 1998) serait un moyen alternatif de mesurer les capacités de prolifération dans les deux groupes.

b) NOX1 et NO

Une seconde hypothèse concerne les molécules impliquées dans les cascades inflammatoires telles que le **Le nitrite oxyde** (NO) ; le NO est une molécule issue de l'Arginine et de O_2- grâce à l'activité d'une NO Synthase (NOS) ; il existe 3 types de NOS, la NOS endothéliale (eNOS) exprimée constitutivement et essentiellement dans les cellules endothéliales mais aussi dans quelques autre types cellulaires (cellules épithéliales, plaquettes, lymphocytes T, cellules musculaires lisses), la NOS neuronale (nNOS) constitutivement

exprimée dans les cellules du système nerveux mais aussi dans quelques autre types cellulaires (cellules endothéliales, mastocystes) et la NOS inductible (iNOS) exprimée de façon inductible dans différents types cellulaires tels que cellules endothéliales, polynucléaires neutrophiles et macrophages, neurones (Beck et al. 2004); bien que deux d'entre elles soient exprimée constitutivement, leurs expressions sont régulées par plusieurs facteurs (TNFα, IFNγ, Lipolysaccharides, TGFβ, hypoxie, corticostéroïdes, derivés oestrogéniques) (Beck, Xavier et al. 2004) toutes les 3 impliquées dans plusieurs fonctions endothéliales par les différentes activités du NO : vasodilatation, modération de l'expression et l'activation de substance pro inflammatoires (ICAM, VCAM MAdCAM1, E-selectine et P-Selectine), effet antioxydant par neutralisation de O_2^-. (Kolios et al. 2004).

Un certain nombre d'arguments plaident en faveur d'un rôle particulier et proinflammatoire du NO dans les modèles de colite au DSS via des produits dérivé (Krieglstein, Cerwinka et al. 2001; Beck, Xavier et al. 2004) ; dans la majorité des modèles testés il existe une augmentation du NO circulant corrélée à la sévérité de la colite (Krieglstein, Cerwinka et al. 2001; Beck, Xavier et al. 2004). La colite au DSS chez les souris iNOS-/- est moins sévère, et les inhibiteurs de iNOS diminuent l'activité de la colite (Krieglstein, Cerwinka et al. 2001) ; cette diminution étant significativement plus importante lorsque les inhibiteurs sont utilisés chez des souris ne produisant génétiquement que très peu de $O_2^{\cdot-}$ (souris p47-/-) il est suggéré que la balance $NO/O_2^{\cdot-}$ est importante dans ce modèle de colites par le biais d'activités proinflamatoires pouvant se substituer (Grisham 1994; Krieglstein, Cerwinka et al. 2001). Ceci est attesté par le fait que les leucocytes des souris P47-/- montrent une surproduction de NO après stimulation. Ainsi, l'absence de sévérité particulière chez les souris P47-/- soumis à un régime DSS 3%, pourrait s'expliquer par le fait que la balance $NO/O_2^{\cdot-}$ reste équilibrée en terme de formation de NO. Cependant, cette balance n'est évoquée jusqu'à présent qu'en raison d'une production d'$O_2^{\cdot-}$ à priori exclusivement lié à NOX2 ($gp91^{Phox}$) et ses sous unités ; depuis l'individualisation de NOX1 au niveau des cellules coliques, il est certain que dans certaines conditions d'agressions et dans certaines souches génétiquement modifiées telles que les $P47^{phox}$-/-, l'expression et l'activité de NOX1 augmentent. NOX1 pourrait donc être la principale source d'anions superoxydes et expliquer l'absence de phénotypes des souris $P47^{phox}$-/-sous DSS (Krieglstein, Cerwinka et al. 2001) :la surproduction de NO serait compensée par une production d'$O_2^{\cdot-}$ par NOX1, alors que dans le modèle DSS chez des souris $P47^{phox}$-/- recevant un inhibiteur de NO, les anions superoxydes seraient en balance positive et exerceraient leur activité pro-inflammatoire (Krieglstein, Cerwinka et al. 2001). Le fait que nous trouvions une sévérité particulière chez les DÉFICIENTES POUR NOX1

pourrait corroborer cette hypothèse. Il y aurait dans ce cas un excès de NO qui exercerait ses activités pro-inflammatoires au niveau colique. Ceci ne peut être infirmé par nos résultats.

Par ailleurs, cet effet n'est rapporté que pour deux type de NOS, iNOS et eNOS. Il semble en effet que dans un modèle de souris déficientes en iNOS, eNOS, et nNOS, une sévérité supérieure au contrôle est rapporté pour les souris nNOS -/-, alors qu'il est rapporté une moindre sévérité pour les iNOS-/- et eNOS-/- (Krieglstein, Cerwinka et al. 2001; Beck, Xavier et al. 2004). Il n'existe donc pas seulement un effet de balance $NO/O_2^{\cdot-}$, mais aussi un rôle de la localisation de la production de NO au moins aussi important. Savoir s'il en est de même pour le superoxyde est encore une question. Dans cette hypothèse, il n'existe pas, dans notre étude, d'explication simple quant au rôle de l'antibiothérapie dans la diminution de la sévérité de la colite. Il peut être supposé qu'une diminution de la charge bactérienne induise une modification d'activation, de production, de certains récepteurs, cytokines et du NO qui produiraient un effet globalement positif. Aussi, si NOX1 et les différentes NOS jouent un rôle interactif via leur production respective de $O_2^{\cdot-}$ et de NO, aucun mécanisme simple ne peut être retenu ; puisqu'il existe des fonctions différentes des espèces radicalaires en fonction de leurs lieux de productions (Beck, Xavier et al. 2004), des mesures spécifiques des différents acteurs (NO, H_2O_2, $O_2^{\cdot-}$, NOS et NOX) au cours de la colite seraient nécessaires pour déterminer leurs rôles propres.

Enfin, un des rôles connus du NO est son effet sur le lit vasculaire ; une diminution, et du flux sanguin artériolaire colique et de la réponse aux bradykinines est rapporté dans un modèle de colite DSS comparable au notre ; cette diminution du flux sanguin artériolaire local est indépendant de l'hémodynamique global de l'animal ou de vasoconstricteur locaux (Mori et al. 2005). L'implication globale de NOX1 dans la régulation de facteurs angiogéniques est potentiellement en faveur de cette hypothèse (Arbiser, Petros et al. 2002).

c) NOX1 participe aux défenses antimicrobiennes coliques

La dernière hypothèse alterne est donc l'implication de NOX 1 en tant qu'enzyme productrice de radicaux libres bactéricides ; il s'agirait d'un mécanisme direct relativement simple et il existe déjà plusieurs arguments en faveur de ce rôle ; aucune preuve directe *in vivo* n'a cependant été avancée jusqu'à présent ; le gradient d'expression de NOX1 entre colon proximal et distal corrélé à celui de la charge bactérienne, la forte homologie génomique entre NOX1 et NOX2, la localisation principale d'expression de NOX1 au niveau des cellules épithéliales luminales, La production à la fois constitutive et inductible d'espèces radicalaires par les cellules épithéliales coliques, la production d'espèces radicalaires dépendant de NOX1 dans des modèles reconstitués (Geiszt, Lekstrom et al. 2003) ou des

cultures primaires de cellules épithéliales coliques (Perner, Andresen et al. 2003) sont autant d'arguments indirects.

Le rôle de la flore colique dans la survenue des colites aiguës et chroniques est largement admis qu'il s'agisse des pathologies inflammatoires humaines ou de certains modèles animaux (DSS, TNBS, IL 10 KO STAT1) (Axelsson et al. 1996; Rath, Schultz et al. 2001; Hendrickson et al. 2002; Strober, Fuss et al. 2002; Elrod et al. 2005). Dans les modèles animaux, son rôle est généralement admis grâce à l'évaluation de la modification quantitative et qualitative de la flore colique dans des conditions spécifiques, par l'effet favorable ou défavorable de l'introduction d'une souche bactérienne notamment chez les souris dite « germ free » ou par l'efficacité de certains antibiotiques dans la prévention ou l'atténuation des colites (Axelsson, Landstrom et al. 1996; Strober, Fuss et al. 2002). Il est néanmoins important de savoir qu'il n'existe pas un seul modèle physiopathologique et que chaque modèle ne donne des éléments directement informatifs que pour ce même modèle; il existe des échanges certains entre l'organe « muqueuse colique » et les bactéries commensales qui pour une part permettent la préservation de la muqueuse mais pour une autre part peuvent être délétères dans certaines conditions de l'hôte (Axelsson, Landstrom et al. 1996; Strober, Fuss et al. 2002). Ces constatations identiques dans des modèles différents ne présupposent non plus en rien la communauté des mécanismes physiopathologiques qui les sous-tend. Ainsi, pour ce qui concerne le modèle de colite induite par le DSS, La flore bactérienne a été impliquée dans la sévérité de colite chez plusieurs souches telles que Balb C et C57B6/J (Tlaskalova et al. 1970; Axelsson, Landstrom et al. 1996; Rath, Schultz et al. 2001); des antibiothérapies utilisées chez ces mêmes souris ont démontré un effet protecteur sur la muqueuse colique soumise au DSS (Tlaskalova, Rejnek et al. 1970; Axelsson, Landstrom et al. 1996; Dieleman, Palmen et al. 1998; Rath, Schultz et al. 2001) ; le mécanisme physiopathologique en cause n'est cependant pas unique puisque d'une part, des souris « germ free » et des souris résistantes au lipopolysaccharides (LPS) ont présenté une colite sous DSS (Kitajima et al. 2001) et que d'autre part, des souris déficientes en Toll Like Recepteur (TLR2 ou TLR 4) sont plus susceptibles au DSS (Rakoff-Nahoum, Paglino et al. 2004; Fukata, Michelsen et al. 2005). Il ne s'agit pas non plus d'un mécanisme exclusivement immunologique puisque des souris SCID (ayant une réponse Lymphocytaire B et T nulle) développent aussi une colite aiguë (Dieleman et al. 1994). Au regard de ces données, la sévérité de la colite induite par le DSS chez les souris DÉFICIENTES POUR NOX1 et plus encore l'efficacité particulière du traitement antibiotique à large spectre sur cette sévérité plaident en faveur du rôle de NOX1 dans les défenses antibactériennes. Les résultats de la colite au DDS peuvent être interprétés comme suit : la phase initiatrice de la colite aiguë au

DSS serait liée à un effet direct du DSS sans que l'on connaisse exactement le mécanisme en cause (Strober, Fuss et al. 2002) et la phase secondaire, lorsque l'épithélium colique a été agressé, serait, au moins en partie, dépendante de la flore bactérienne. Une telle hypothèse concernant la phase initiale de la colite au DSS est suggérée parce qu'il persiste une colite malgré l'antibiothérapie dans les deux groupes alors qu'elle n'existe pas dans les groupes ne recevant pas de DSS ; plusieurs auteurs ont mis en évidence une atteinte initiale épithéliale puis des cryptes en même temps qu'une inflammation muqueuse et sous muqueuse (Cooper, Murthy et al. 1993; Ohtsuka et al. 2003) suggérant l'existence d'une modification de la perméabilité membranaire. La phase secondaire liée à la flore bactérienne est, elle, suggérée par l'efficacité des antibiotiques dans les groupes WT. L'hypothèse alterne à cette efficacité serait le résultat d'une détoxification directe du DSS par les antibiotiques mais elle n'a jamais été rapportée ; de même, les deux antibiotiques utilisés pourraient avoir aussi un effet anti-inflammatoire mais là encore, il n'a jamais été rapporté pour ces antibiotiques. Aussi, la sévérité significativement supérieure de la colite chez les souris déficientes pour NOX1 sans antibiotique associé à l'absence de différence de sévérité de la colite au DSS entre les WT et les souris déficientes pour NOX1 recevant les antibiotiques objective un rôle protecteur de NOX1 sur la muqueuse colique via un effet antibactérien. Au cours des colites au DSS chez la souris, le rôle de la flore colique est plus important dans la phase aiguë de l'atteinte muqueuse (Beck, Xavier et al. 2004); l'effet attendu de l'antibiothérapie serait donc plus important dans les colites aiguës que dans les modèles de colites chronique au DSS (Beck, Xavier et al. 2004), comme dans notre modèle. Aucune donnée ne permet par contre de déterminer par quel mécanisme NOX1 agit sur les bactéries : (i) Bactéricidie via les espèces radicalaires ; (ii) modification de la flore bactérienne favorisant des bactéries moins pathogènes. Il a ainsi été évoqué que les bactéries ou certaines bactéries pouvaient dégrader le DSS et par là atténuer la sévérité de la colite (Kitajima et al. 2002). Cependant, aucune étude ne l'a complètement confirmé. La modification de la flore bactérienne intraluminale pourrait avoir un rôle puisque certaines bactéries ont été plus impliquées que d'autres dans les colites aux DSS ; parmi elles, les *Bacteroides sp* et particulièrement *Bacteroides vulgatus* ont été identifiés (Rath, Schultz et al. 2001); Nos résultats préliminaires uniquement qualitatif sur 4 souris par groupe ont montré qu'il existe une modification de la flore colique endoluminale avec une diminution quantitative globale chez les WT et une majoration chez les souris déficientes pour NOX1. Il existe aussi une diminution de la diversité de cette flore. Toutefois l'effet particulier des antibiotiques chez les souris déficientes pour NOX1 pourrait aussi être expliqué par une flore différente et plus sensible à ces antibiotiques (imipénème et

vancomycine) comme cela a été déjà rapporté dans d'autres modèles (Videla et al. 1994; Mourelle et al. 1998; Rath, Schultz et al. 2001).

B. NOX1 limite-t-elle la translocation bactérienne ?

Si NOX1 exerce un rôle antibactérien direct au niveau des cellules épithéliales coliques il pourrait participer au contrôle de la translocation bactérienne à travers la muqueuse. Le choix de neutropénie induite comme modèle d'étude de la translocation bactérienne est en lien avec l'inhibition de la fonction de seconde barrière protectrice que représentent les polynucléaires neutrophiles (PNN) circulants (immunité non spécifique des PNN en cas de translocation bactérienne) ; Cela permet d'augmenter la densité bactérienne migrant à travers les tissus relais et d'en faciliter la multiplication sur site (Rate, Foie et réseaux lymphatiques mésentériques) (Wallace et al. 1997; Miyazaki et al. 2001). Selon les différents modèles utilisés, les translocations bactériennes sont dépendantes de nombreux paramètres pour chacun des acteurs que sont les bactéries (virulence, facteurs d'adhérence, de colonisation), le film muqueux (immunoglobulines, polysaccharides, mucines et bactéries), les entérocytes (stress oxydatif, balance ATP, jonction intercellulaire), la lamina propria (réponse inflammatoire cellulaire locale et systémique) (Wiest et al. 2003). Dans nos expérimentations, le foie des souris déficientes pour NOX1 ont des charges bactériennes supérieures aux WT, suggérant une translocation bactérienne supérieure chez les souris déficientes pour NOX1 ; La diversité bactérienne est plus importante chez les souris WT que chez souris déficientes pour NOX1; enfin, chez les souris déficientes pour NOX1 uniquement, la mortalité en zone conventionnelle est significativement supérieure à la mortalité en zone SPF suggérant une pathogénécité supérieure dans les animaleries conventionnelles. Ces différences entre animaleries conventionnelles et SPF ont déjà été mises en avant comme un argument en faveur du rôle des bactéries dans des pathologies inflammatoires notamment pour des modèles de colites (Sadlack et al. 1993; Sellon et al. 1998). D'autre part, bien que les origines exactes des décès n'aient pu être attribuées directement à une cause microbienne, le taux de mortalité dans les différents modèles de neutropénies est un des arguments en faveur d'une surmortalité d'origine microbienne (Miyazaki, Fujikawa et al. 2001; Koh et al. 2005).

Ces résultats sont en accord avec ceux de la colite au DSS ; ensemble, ils suggèrent un rôle direct de NOX1 dans les mécanismes de défense antibactérien au niveau colique et potentiellement un impact global sur la flore bactérienne en condition normale et pathologique. Dans ce cas, il peut paraître surprenant que chez les souris déficientes pour NOX1 aucun phénotype spontané tel que, colites spontanées, déficit de croissance, survenue

de décès inexpliqués, n'ait été mis en évidence. Compte tenu de la présence d'une autre enzyme de la famille NOX au niveau des cellules épithéliales coliques, DUOX2 (Ameziane-El-Hassani, Morand et al. 2005) et de NOX2 dans les polynucléaires neutrophiles de ces souris, il est possible que des mécanismes de compensation se mettent en place dès qu'il y a insuffisance d'un des mécanismes de protection tel que NOX1. Ces deux enzymes sont toutes deux capables de jouer un rôle antibactérien soit direct pour NOX2 soit par l'intermédiaire de H_2O_2 et une lactoperoxydase pour DUOX2 (Geiszt and Leto 2004). En outre, les NOX ne sont pas les seules enzymes productrices d'ERO au niveau colique (Geiszt and Leto 2004). Quoiqu'il en soit, dans nos modèles, aucun résultat au niveau moléculaire ne nous permet d'infirmer ou confirmer cette hypothèse.

Il paraît donc nécessaire de tester ces nouvelles hypothèses : les mécanismes compensateurs liés à une infiltration supérieure ou une suractivité des PNN recrutés pourraient être évalués sur des coupes histologiques et l'activité radicalaire sur de nouveaux échantillons lors de prochaines expérimentations. L'étude de l'expression de DUOX2 et de NOX2 mais aussi d'autres molécules telles que le NO, dans le modèle de colite au DSS ou de neutropénies chez les souris déficientes pour NOX1 devraient donner des réponses quant à l'existence de mécanismes compensateurs entre les NOX elles mêmes ou par d'autres mécanismes. Enfin, *ex vivo*, des cultures cellulaires primaires de colonocytes des 2 groupes de souris devraient permettre de mieux appréhender les mécanismes moléculaires qui expliquent les différences observées.

C. Conclusions concernant la fonction Colique de NOX1

Au total, nos résultats préliminaires confirment l'hypothèse du rôle antimicrobien de NOX1 ; Ils nécessitent néanmoins une interprétation précautionneuse en raison des limitations déjà rapportées à savoir : (i) une différence de fond génétique potentiellement importante dans la survenue de la colite (utilisation de souris déficientes pour NOX1 de génération F3); (ii) manque de données explicatives quant aux mécanismes d'action de NOX1 dans la survenue de la colite et aux potentiels mécanismes compensateurs (DUOX2, NOX2, NO) ; (iii) le nombre élevé de paramètres potentiellement impliqué dans le modèle de colite au DSS ; (iv) les différences variables (foie/rate) obtenues dans le modèle de neutropénie.

Compte tenu de la complexité des relations entre la muqueuse colique et la flore bactérienne, il est probable que NOX1 n'intervienne que selon un mode de protection muqueuse et que de

nombreux mécanismes compensateurs existent. L'absence de phénotype spontané des souris déficientes pour NOX1 est un argument fort en faveur de cette affirmation. De nouvelles expérimentations utilisant des souris à fond génétique plus homogènes (génération F7 actuellement disponibles), explorant le rôle des différents acteurs enzymatiques et de la production radicalaire sont nécessaires avant de retenir le rôle majeur de NOX1 dans les défenses antibactériennes de la muqueuse colique.

CHAPITRE IV

Evaluation de la Fonction de NOX1 dans le Système Vasculaire

Fonction vasculaire de NOX1

1. Introduction

En raison de l'importance des espèces radicalaires dérivés de l'oxygène (ERO) dans la survenue et l'évolution des pathologies cardio-vasculaires (Heistad 2006), la découverte d'une nouvelle famille d'enzymes capables de produire ces ERO ouvrait il y a peu un champ d'investigation immense sur les mécanismes physiopathologiques en cause (Griendling, Sorescu et al. 2000). Depuis, cet enthousiasme ne peut que se confirmer puisqu'une majorité de ces enzymes, à savoir NOX1, NOX2, NOX4, $P22^{phox}$, $P47^{phox}$, $P67^{phox}$ sont exprimées dans les différentes cellules du système vasculaire et produisent des ERO dans les différents compartiments des artères élastiques et résistantes (endothélium, média et adventice).

L'angiotensine II est un des acteurs clés des pathologies cardio-vasculaires. Les conséquences de l'angiotensine II sur le système vasculaire peuvent se résumer par les faits suivants (Griendling, Sorescu et al. 2000; Ruiz-Ortega et al. 2001; Daugherty et al. 2004; Lassegue and Griendling 2004) : i) induction d'une hyperpression artérielle sytolique et systolo-diastolique ii) formation d'une hypertrophie médiale dépendante à la fois de la prolifération et l'hypertrophie des cellules musculaires lisse mais aussi de l'accumulation de la matrice extracellulaire ; iii) activation de cytokines et médiateurs proinflammatoires et de Metalloprotéases iv) Production d'ERO ; v) infiltration mono-macrophagique de la média ; vi) induction d'athérosclérose chez les souris ApoE deficiente ; vii) formation d'anévrysmes et de dissections aortiques ; viii) enfin, l'angiotensine II active et induit une surexpression de NOX1, NOX2 et de certaines sous unités (Lassegue, Sorescu et al. 2001; Lassegue and Clempus 2003). Par ailleurs, l'angiotensine II exerce son rôle de transduction du signal de façon complexe, utilisant deux types de récepteurs pouvant avoir des actions opposées et des voies de transductions variables (Dinh et al. 2001; Saito et al. 2002).

De nombreux travaux sur des modèles cellulaires et *in vivo* montrent que la majorité des ERO est essentiellement produite par les NOX (Lassegue and Griendling 2004). Quelques modèles animaux de souris déficientes en NOX2 et $P47^{phox}$, ou surexprimant $P22^{phox}$ montrent que les NOX jouent un rôle dans l'hypertension artérielle (Wang, Xu et al. 2001; Landmesser, Cai et

al. 2002; Lassegue and Clempus 2003; Laude, Cai et al. 2005; Touyz, Mercure et al. 2005); variations de NOX1 dans ces modèles sont en faveur de son rôle dans la régulation de la pression artérielle mais sans pouvoir l'évaluer directement.

Dans le présent travail nous proposons donc de déterminer l'impact de NOX1 dans la régulation de la pression artérielle de base et sous la stimulation de l'angiotensine II en utilisant le modèle animal déficient en NOX1.
Une partie de ces résultat a été publié (article en annexe), une autre partie est l'objet d'un second article en préparation.

2. Methodes

A. Les animaux

Les animaux utilisés dans ces expérimentations sont issues de génération F6. (Homologie génomique entre la lignée KO NOX1 et C57/B6J >98%). les souris contrôles dites Wild-type étaient des C57/B6J issues de la même parenté ou des C57/B6J issues d'un autre élevage. Seuls les mâles ont été utilisés ; leur âge variait de 12 à 30 semaines et le poids de 25 à 35g. ils étaient tous issus d'une animalerie SPF et étaient transférés en animalerie conventionnelle quelques semaines avant le début de l'expérimentation.

Les génotypes ont été réalisés pour tous les animaux selon la méthode décrite dans le chapitre « modèle animal ». Toutes les souris étaient gardées dans des conditions sanitaires et de confort équivalents (accès libres à l'eau et à la nourriture, dans une salle silencieuse stabilisée à 25°C avec des cycles luminosité/obscurité de 12heures). La procédure animale a été soumise et acceptée par le comité d'éthique de l'université de Genève et l'office vétérinaire cantonal de Genève (Suisse).

B. Mesures des Pressions artérielle et paramètres cliniques

Les mesures de pression artérielle ont utilisé un appareillage de type pléthysmographe ne permettant de recueillir que la Pression artérielle Systolique (PAS) (RTBP 200, Kent Scientific, ADI Instrument, USA). Les mesures se faisant en conditions restreintes une grande variabilité existe lors des premières mesures. Les animaux étaient donc entrainés jusqu'à ce que la PAS sur une série de mesure ne variait pas de plus de 40 mmHg i.e +/-20mmHg. Toutes les valeurs retenues représentaient une série de mesure de PAS d'un minimum de 10 mesures répétées ;.les PAS étaient mesurées entre 9 h le matin et 16 h le soir chez des animaux éveillés (Johns et al. 1996). Les mesures de base correspondent à trois séries de mesures différentes.

Pendant les phases de délivrance de l'angiotensine les séries de mesure de PAS ont été réalisées aux Jours 1, 3 et 6.

Les poids des animaux ont été vérifiés avant et à la fin de l'expérimentation sous angiotensine II en raison du risque d'une modification de la PAS liée à des variations différentes de volume

intra-vasculaire ; ce risque est potentiel compte tenu de la localisation de récepteurs à l'angiotensine II au niveau rénal et colique (Hirasawa et al 2002).
La surveillance clinique des animaux était quotidienne pendant toute la durée de l'expérimentation.

C. Préparation et Implantation des minipompes

Les minipompes sont des dispositifs sous cutanés d'une durée d'utilisation de 7 jours AZLET model; Co, Palo Alto, CA, USA) ; elles permettent la délivrance régulière sur 7 jours d'un liquide choisi non lipophile. Chaque minipompe doit être remplie d'une quantité égale de liquide (90ul) pour une durée de délivrance équivalente. Ceci était vérifié par la mesure du poids à vide, puis remplie, de chaque minipompe avant implantation. Angiotensin II (SIGMA, CA, SW) était dissout dans 90ul de 0.154 M NaCl pour une délivrance à 3mg/kg/jour (Wang, Xu et al. 2001). Les animaux ne recevant pas d'angiotensine subissaient la même procédure chirurgicale avec une minipompe remplie de 90ul de 0.154 M NaCl.
La procédure chirurgicale incluait une anesthésie par inhalation d'isoflurane (Induction à 5% suivie d'une à 2-3%). Et une implantation sous cutanée dans des conditions aseptiques au niveau de la région sous scapulaire la procédure chirurgicale ne dure que quelques minutes.

D. Préparations des tissus

Les souris étaient sacrifiées le 7ème jour de l'expérimentation par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane (5%). L'aorte thoracique était prélevée et la graisse périaortique ôtée mécaniquement ; l'aorte était alors divisée en deux partie égales; une partie était fixée dans du formol pendant 48 h pour une analyse histologique et l'autre partie était utilisée pour les analyse d'ARNm.
Pour les analyses histologiques et immunohistochimiques les prélèvements ont été paraffinés puis des sections transversales de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées. Les marquages suivant ont été fait selon les méthodes classiques : hématoxyline éosine, aldéhyde/fuchsine et trichrome Masson. Le marquage à l'hématoxyline et éosine marquant cytoplasme et noyaux permet de bien différencier les limites entre couche endothéliale, média et adventice des segments aortiques ; ils ont été utilisés pour réaliser les mesures quantitatives de la surface de la section médiale (Aire de la Média). L'aldéhyde/fuchsine et le trichrome Masson permettent

de différencier le conjonctif et les lames élastiques. Ces marquages ont été utilisés pour la quantification des surfaces du conjonctif et des lames élastiques.

Pour les expérimentations d'immunohistochimie, les sections ont été déparaffinées et incubées sur la nuit avec les différents anticorps aux concentrations indiquées dans les légendes des figures s'y rapportant. Chaque section était ensuite incubée pendant 2 heures avec un anticorps secondaire biotinylé de l'espèce correspondante; La détection a utilisé un système peroxydase classique. Pour chaque expérience un controle négatif (sans anticorps secondaire) était réalisé pour éliminer un marquage aspécifique. Un contrôle positif variable selon l'anticorps concerné a été réalisé selon les instructions des fabricants.

Les anticorps utilisés pour l'immunohistochimie ont été les suivants: les anticorps polyclonaux anti-8 hydroxyguanosine (Alexis Biochemical); les anticorps polyclonaux anti-DDAH I nous a été gracieusement fourni par le Dr. S Keito (Kurume, Japan); les anticorps antiPCNA monoclonal (DAKO, Suisse); Les Anticorps secondaire biotynilé de l'espèce appropriée ont été obtenus chez des fournisseurs habituels.

E. Analyses d'imagerie quantitative

Les mesures d'aires de la Média (AM) ont été réalisées sur 2 sections par animal sur des marquages d'hématoxyline/éosine; Chaque section était espacée 20 µm ; Chacune d'elle a été photographiée et numérisée à un grossissement de 100X; l'analyse quantitative a utilisé le logiciel Metamorph (version 6.2r2; Universal Imaging). Pour délimiter la média aortique le périmètre interne et externe ont été calibre sur les limitantes élastiques Interne et Externe. L'aire ainsi délimitée à été numérisée et le calcul de l'aire s'est fait en se rapportant au grossissement utilisé. Les mesures sont rapportées en μm^2. Les 2 mesures de chaque animal ont été moyennées et ensuite utilisées comme une valeur unique pour les calculs statistiques.

Les mesures du nombre de noyau par aire de la média ont été réalisées à partir des images numérisées pour les mesures de l'aire de la média. Elles ont été réalisées sur 2 sections par animal marquée à l'hématoxyline/éosine L'hématoxyline colorant en violet les nuclei, des limites de seuil bas et haut dans les gammes violets ont été déterminées sur un échantillon de sections ; les mêmes seuils ont été ensuite utilisés pour toutes les mesures.

Pour quantifier l'aire occupée par les fibres élastiques et la matrice extracellulaire (conjonctif de soutien) nous avons utilisé les lames marquées à l'aldéhyde fuchsine. Des limites hautes et basses ont été déterminées sur la gamme pourpre colorant les fibres élastiques et dans la gamme bleue pour la matrice extracellulaire. Elles ont été réalisées sur 2 sections par animal et la moyenne des deux mesures a été utilisée pour les calculs statistiques

Les nombres de noyau Pcna positifs ont été comptabilisés sous microscope optique (400x) directement sur chaque lame à deux reprises. Trois sections par animal étaient analysées et la valeur retenue par animal correspondait à la moyenne des 3 mesures. Pour différencier les vrais marquages PCNA des marquages aspécifiques, nous faisions varier l'objectif sur l'axe z et considérions comme un vrai marquage les seuls marquages qui avaient des contours nets dans tous les axes.

F. Microarray à partir du tissu aortique

L'aorte thoracique entière a été prélevée chez 3 souris WT et 3 souris déficientes pour NOX1 après 7 jours d'infusion d'angiotensine II ; la procédure expérimentale pour ces 6 animaux a été la même que pour les études précédentes. Après homogénéisation du tissu au « Polytron homogenize » (Kinematica, Luzern,. Switzerland) pendant 3 mn, L'ARN total a été isolé puis extrait à partir de 10 à 15 mg de tissus aortique en utilisant le mini kit RNeasy Protect (Quiagen, Bales, Suisse). 0.2 µg de cet ARN a été converti en un cADN double branche en utilisant le kit cDNA synthesis (Superscript Choice; Invitrogen) ; avec primer oligo(dT) spécial (oligo(dT)24) contenant un site promoteur ARN T7 adjoint au 3' poly-T.
Le GeneChip IVT labelling kit (Affymetrix) a permis d'obtenir des ARNc biotinylés à partir des ADNc ; ils ont été ensuite purifiés selon le protocole du kit RNeasy (Quiagen).
Une détermination des gènes références a permis d'établir que dans les échantillons les gènes EEF1A1 (eukaryotic elongation factor 1A1) et TBP (Tata box binding protein) étaient les plus stables quantitativement.
Toutes les amplifications ont débutées avec 100ng d'ARN total pour chaque échantillon. Deux amplifications successives ont été réalisées pour chaque réplicat afin d'arriver à synthétiser des ARNc biotinylés selon le protocole Affymetrix. 17.5 µg des ARNc biotinylés ont été hybridés sur la sonde Affymetrix 430 2.0 chips de souris ; cette puce contient des sondes pour 45101 transcrits. La puce est ensuite lavée et scannée, pour permettre une détection des signaux fluorescents. Les signaux ont été analysés grâce au logiciel d'analyse Affymetrix software GCOS (Hubbell et al. 2002; Liu et al. 2002). Cette méthode est appliquée en triplicat. Une comparaison paire à paire des résultats de chaque sonde permet d'établir les niveaux de concordances des changements entre les deux groupes à comparer. Ainsi pour les 3 échantillons des souris déficientes pour NOX1 et WT 9 comparaisons paires à paires ont été faites.

G. PCR temps réel

Les prélèvements correspondent aux prélèvements des souris déficientes pour NOX1 et WT ayant été utilisée pour les mesures histomorphométriques. Ce pendant pour des raisons techniques un certain nombre d'échantillons n'a pu être utilisé (manque d'ARN, Reverse Transcriptase qui ne fonctionne pas). Les mesures ont été effectuées sur n=9 échantillons pour les souris déficientes pour NOX1 sous angiotensine II, n= 8 pour les WT sous angiotensine II, n= 5 pour les souris déficientes pour NOX1 et WT n'ayant pas reçu d'angiotensine II. Au moment des prélèvements la partie d'aorte thoracique prélevée était placée dans 0.5 ml de RNA later (Quiagen). Après 3 mn d'homogénéisation du tissu aortique au « Polytron homogenizer » (Kinematica, Luzern,. Switzerland) l'extraction ARN a été réalisée grâce au mini kit RNeasy Protect (Quiagen, Bâles, Suisse) et la transcription inverse en utilisant la superscript reverse transcriptase (Superscript Choice; Invitrogen). 200 ng de chaque échantillon ont été ensuite utilisés. Sur la base de la détermination des expériences du Microarray, les deux gènes de références suivant ont été choisis : EEF1A1 (eukaryotic elongation factor 1A1) et TBP (Tata box binding protein).

Les PCR temps réel à partir du tissu aortique ont été réalisées pour les gènes suivant : NOX1, NOX2, NOX4, DDAH1, Thrombospondine 4.

Pour la PCR temps réel, les amorces suivantes ont été utilisées : pour Nox1-Forward 5'-CCC AGC AGA AGG TCG TGA TT-3' et Nox1-Reverse5'-GCT AAA GCC TCG CTT CCT CAT-3'; Nox2-Forward , 5'-CAG GAA CCT CAC TTT CCA TAA GAT G-3',Nox2-Reverse, 5'-AAC GTT GAA GAG ATG TGC AAT TGT-3'; Nox4-Forward, 5'-CCG GAC AGT CCT GGC TTA TCT-3' et Nox4-Reverse, 5'-TGC TTT TAT CCA ACA ATC TTC TTG TT-3'; Ddah1-Forward, 5'-TGC AAT AGG GTC CAG CGA AT-3'and Ddah1-Reverse, 5'-GAG CTT GTC ATA ACG ATG GTC ACT-3';Thbs4-Forward5'-ACC GTT CCG TGC AGT AGC A-3' et Thbs4-Reverse 5'-TGT GCC ACA GGG AGT TTC G-3';
EEF1A1-Forward, 5'-TCC ACT TGG TCG CTT TGC T-3' et EEF1A1-Reverse, 5'-CTT CTT GTC CAC AGC TTT GAT GA-3'; TBP-Forward, 5'-TTG ACC TAA AGA CCA TTG CAC TTC-3', et TBP-Reverse, 5'-TTC TCA TGA TGA CTG CAG CAA A-3'

H. Mesures des concentrations plasmatiques de NOx (nitrate/nitrite)

La production de Nitrite Oxyde est estimée à partir de la somme des Nitrates et Nitrites mesurés dans un produit biologique. Une quantité de 200µl de sang total était prélevé

à la fin d'une série de 2 expérimentations sur un tube sodium/citrate. La mesure des nitrites et nitrates a été réalisée grâce à un test colorimétrique (780001, Chemie Brunschwig, Bâles). Les prélèvements sanguins étaient centrifugés et le plasma séparé des éléments cellulaires. Le plasma récolté était stocké à -20ºC. Les échantillons étaient mesurés sur une seule expérimentation en triplicata lors de la procédure suivante : ultrafiltration du plasma à travers un filtre (seuil de PM à 10kD), incubation pendant 3 heures avec une nitrate réductase et ses cofacteurs permettant la transformation des nitrate en nitrite. la mise en présence de N-(1-Naphtlyl) éthylènediamine dans les échantillons permet la conversion des nitrites en Azo de couleur pourpre. La lecture colorimétrique à 540 nm de longueur d'onde permet la mesure quantitative des nitrites convertis. Nous utiliserons par simplification le terme « mesure du NO » mais il faut garder à l'esprit qu'il s'agit d'une mesure indirecte.

I. Analyses Statistiques

La comparaison des pressions artérielles a utilisé le test d'analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées. La comparaison des moyennes des PCR quantitatives a utilise des test non paramétriques en raison du faible nombre d'échantillon et de la distribution anormale des échantillon. Les quantifications des analyses histomorphométriques à savoir l'AM, le nombre nuclei, l'aire des Fibres élastique et de la Matrice extracellulaire ont été comparées en utilisant un test ANOVA avec mesures d'interactions. Toutes les données sont rapportées en moyenne ± SD (déviation standard). L'hypothèse était rejetée si $p < 0.05$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Stata 8.2, (statistical package, Stata Corporation, College Station, Texas 77845 USA).

3. Résultats

A. La Production d'ERO au niveau de la média aortique est dépendante de NOX1

Afin de démontrer l'absence de NOX1 du système vasculaire nos avons réalisé des RT PCR à partir des Aortes de souris WT et de souris déficientes pour NOX1.

Comme montré dans la figure, l'ARNm de NOX1 était absent des aortes des souris déficientes pour NOX1 et présent dans les aortes des souris WT (figure 16a). Puisqu'*in vitro* et *in vivo* dans certains modèles animaux, il a été démontré une surexpression des ARNm de NOX1 dans les CMLV, nous avons réalisés des PCR quantitatives (PCR temps réel) de NOX1 à partir des aortes de 3 souris WT ne recevant que du NaCl 0.9% pendant une semaine et 3 souris WT recevant de l'angiotensine II. L'augmentation retrouvée n'était au mieux que modeste mais retrouvée chez la majorité des souris (0.75±0.03 chez les souris NaCl versus 0.97±0.1 chez les souris traitées par l'angiotensine II ; p=0.15). L'angiotensine II peut augmenter l'expression ARN messager de NOX1, mais celle-ci est au mieux modeste dans un modèle évaluant l'ensemble de l'aorte. Ceci suggère que les effets de l'angiotensine II sur NOX1 pourraient inclure non seulement son expression génique mais aussi une activation de l'enzyme comme déjà suggéré (Griendling et al. 2003; Lassegue and Clempus 2003). La possibilité de mécanismes compensateurs entre les différentes NOX au niveau du tissu vasculaire a aussi été suggéré (Griendling and FitzGerald 2003; Lassegue and Clempus 2003); en conséquence, nous avons réalisé des PCR quantitatives (temps réel) de NOX2 et NOX4 à partir du tissu aortique total (Figure 16B et 16C). Il n'y aucun changement de niveaux d'expression de NOX4 sous angiotensine II pour les deux groupes et il n'y pas de différence d'expression entre les 2 groupes ; Par contre, s'il n'existe pas de différence entre les deux groupes WT et KO en l'absence d'angiotensine II, il y a une tendance forte à une augmentation de NOX2 chez les souris déficientes pour NOX1 alors qu'elle n'existe pas chez les WT.

Pour nous permettre d'avoir un indicateur de l'activité oxydante nous avons utilisé des anticorps anti-8-hydroxy-guanosine (figure 16D) (Tanito et al. 2004). Les souris n'ayant reçu que du NaCl ne montraient au niveau de leurs aortes qu'un marquage modéré au niveau des cellules endothéliales et l'adventice et un marquage très faible au niveau de la média (Figure 16D) ; il n'existait pas de différence évidente entre les souris déficientes pour NOX1 et les WT. Chez les souris ayant reçu de l'angiotensine II, le marquage de 8-hydroxyguanosine était fortement majoré au niveau de la média des souris WT ; on ne constatait a l'inverse qu'une majoration modérée de ce marquage chez les souris déficientes pour NOX1. Ces résultats suggèrent qu'au niveau de la média de l'Aorte, l'angiotensine II accroît la production d'ERO des souris et que cette production d'ERO est dépendante de NOX1.

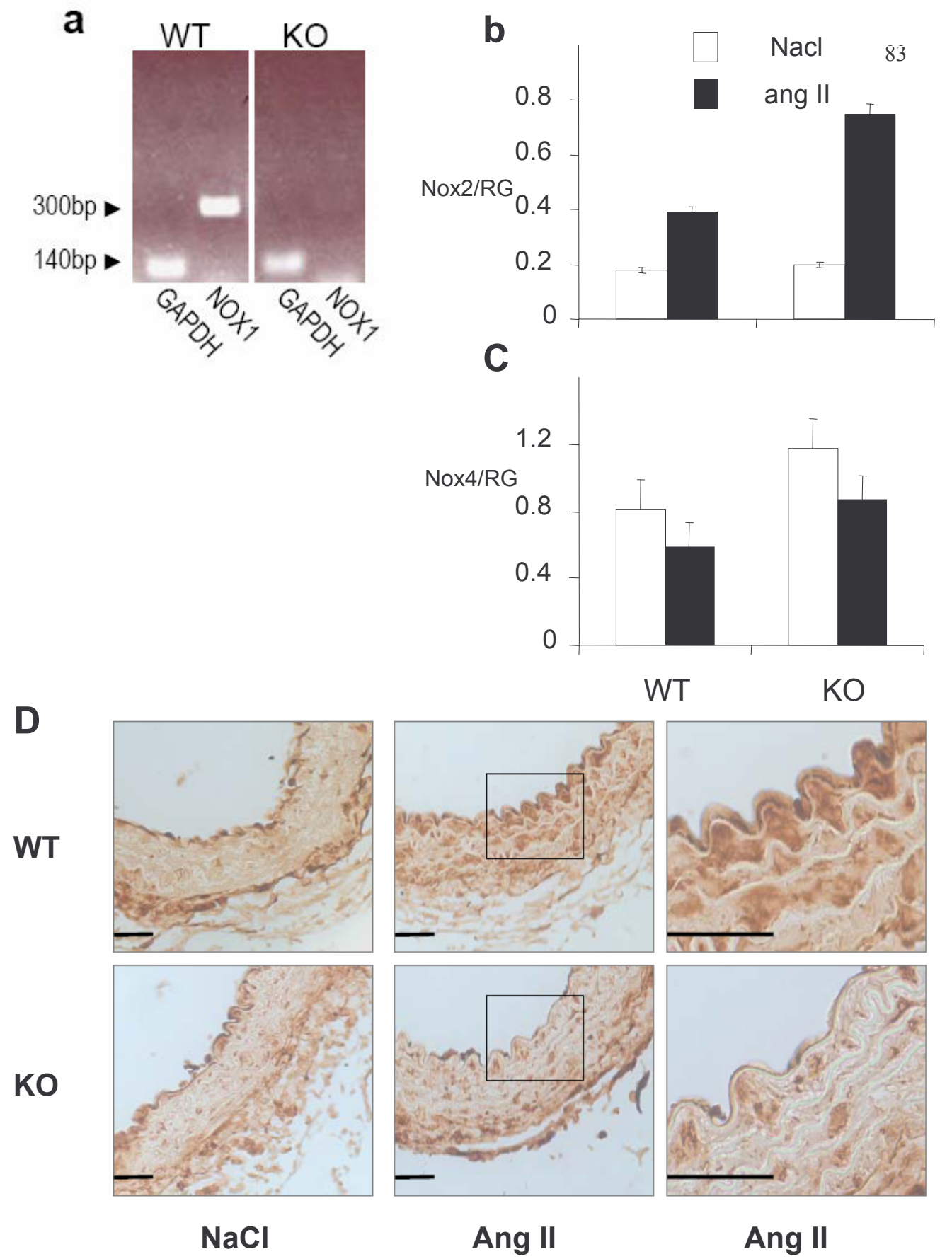


Figure 16 : **Expression des NOX et d'un marqueur du stress oxydant**. Les souris ont reçus une dose de 3mg/kg/day angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9%(NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animmaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. (a) RT-PCR montrant la présence de l'ARNm de NOX1 dans l'aorte des souris wild type (WT) et son absence dans l'aorte des souris déficientes pour NOX1 (KO) ; des résultats similaires ont été obtenus sur 3 expérience indépendantes. (b, c) Les PCR quantitative (temps réel) ont permis de déterminer les quantities d'ARNm de NOX2 et NOX4 (pas de difference significative); les valeurs ont été normalisées selon 2 gènes de réferences comme indiqué dans la partie méthode (n=3) (d) Marquage Immunohistochimique avec un anticorps anti -8-hydroxy guanosine (marqueur *in vivo* du stress oxydant ; dilution 1/200); des résultats similaires ont été obtenus sur 4 animaux différents par groupe. Scale barre = 50 µm.

B. Les souris déficientes pour NOX1 présentent une diminution de la pression artérielle systolique.

La PAS de base a été mesurée chez 25 souris WT et 25 souris déficientes pour NOX1 par 4 séries de mesures. Les WT présentaient une PAS moyenne significativement supérieure à celles déficientes pour NOX1 (p= 0.03). La PAS moyenne des souris WT était de 116 +/-12 mmHg et celle des souris NOX1-KO de 108 +/-15 mmHg; Ceci suggère une implication de NOX1 dans la régulation de base.

Nous avons donc recherché les conséquences de la stimulation du système vasculaire par l'angiotensine II, acteur clé de la régulation de la pression artérielle. Les souris déficientes pour NOX1 et WT ont donc reçu par voie sous cutanée une délivrance sur une durée de 7 jours de l'angiotensine II à la posologie de 3 mg/kg/j (figure n°17 A,B,C). Durant les 3 premiers jours, l'angiotensine II a entraîné une augmentation de la PAS équivalente dans les deux groupes de souris alors que les PAS des 2 groupes de souris ne recevant qu'une infusion de Nacl ne montraient que des variations non significatives (figure n°17A et B). Cependant, au jour 6, alors que se poursuivait une augmentation de la pression artérielle chez les souris WT, il existait chez les souris déficientes pour NOX1, une diminution de la pression artérielle telle que la PAS moyenne était proche des valeurs de base. La différence de PAS entre WT et souris déficientes pour NOX1 en fin d'expérimentation était donc très significativement différente (figure n°17C).

Ces résultats suggèrent donc que NOX1 est nécessaire pour le maintien d'une pression artérielle élevé sous angiotensine II mais qu'il existe aussi un mécanisme d'hypertension artérielle aiguë induit par l'angiotensine II indépendant de NOX1.

Du fait du risque de modifications volumiques liées à l'angiotensine II (Volume sanguine circulant) la perte d'un volume supérieure chez la souris déficiente pour NOX1 pourrait être un mécanisme explicatif indépendant de son action au niveau du système vasculaire. Cependant, cette hypothèse peut être exclue puisque la perte de poids sous angiotensine II i.e (poids à J7-poids à J0/ poids à J0)*100, était significative pour les deux groupes mais comparable entre les deux groupes (figure n°17D).

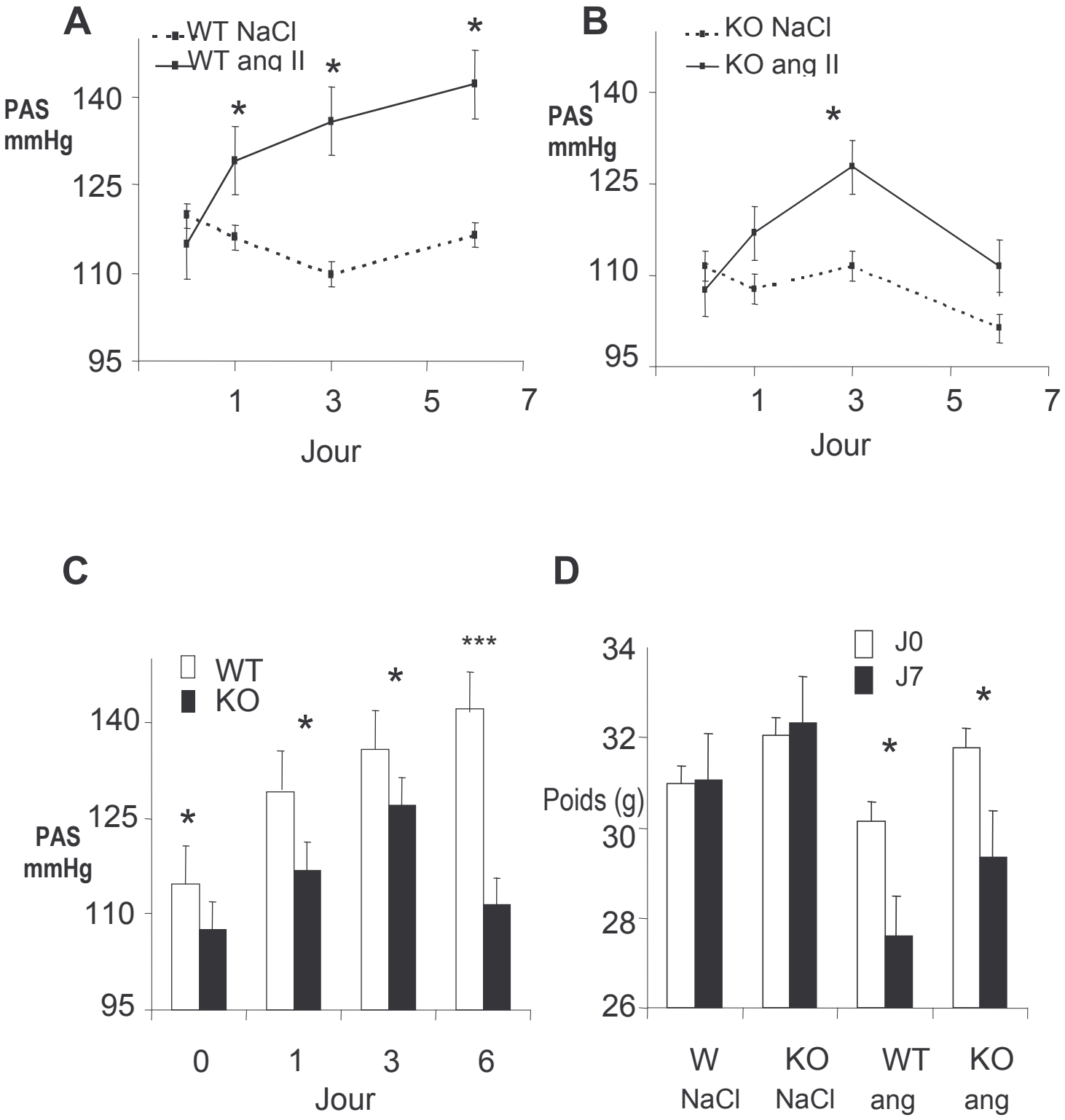


Figure n° 17 : NOX1 est nécessaire à la persistance de l'augmentation de la pression artérielle en réponse à l'angiotensine II.(ang II). Les souris ont reçu une dose de 3mg/kg/jour angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9%(NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. Les pression artérielles systoliques (PAS), ont été mesurées par méthode plethysmographique à la queue de souris. Le nombre de jours correspond au nombre de jours depuis l'implantation de la minipompe ; le Jour J=0 correspond à l'ensemble des résultats des pressions de base. (a, b) Modifications des PAS chez les souris wild type (WT) et déficientes pour NOX1 (KO) avec angiotensine II (ang II) et sans angiotensine II (NaCl). (c) Comparaison des PAS entre les souris WT et déficientes pour NOX1 ayant reçu de l'angiotensine II. (d) Poids avant (J0) et 7 jours après (J7) l'angiotensine II ou le NaCl chez les souris WT et les souris déficientes pour NOX1. n=26 et n=25, respectivement pour les WT et les souris déficientes pour NOX1. *P<0.05; ***P<0.0001.

C. NOX1 participe à la survenue de dissection aortique.

Sur l'ensemble des expérimentations d'infusion d'angiotensine II, 2 souris WT(~7%) et aucune déficientes pour NOX1 sont mortes. Puisque l'angiotensine a été associé à la survenue de dissections et d'anévrysme aortiques (Deng et al. 2003; Daugherty and Cassis 2004; Daugherty et al. 2004) nous avons systématiquement recherché ces anévrysmes et dissections sur les coupes histologiques (figures n° 18A et B). Six ont été trouvés chez les WT (24%) et un seul (4%) chez les souris déficientes pour NOX1 (figures n° 18C) ($p<0.05$)). Le nombre de WT présentant un anévrysme ou une dissection était moins élevé que celui retrouvé dans des études précédentes (39%,) (Deng, Martin-McNulty et al. 2003; Daugherty and Cassis 2004; Daugherty and Cassis 2004); ceci peut s'expliquer par le fait que nos souris étaient plus jeunes, que la durée de perfusion sous cutanée d'angiotensine II était courte ou par le fait que le décès des deux souris WT était lié à une rupture d'anévrysme ou à une dissection aortique (Daugherty and Cassis 2004; Daugherty and Cassis 2004). il est à ce stade possible de conclure que NOX1 est impliquée dans la survenue de dissection aortique et d'anévrysme dans un modèle de perfusion d'angiotensine II.

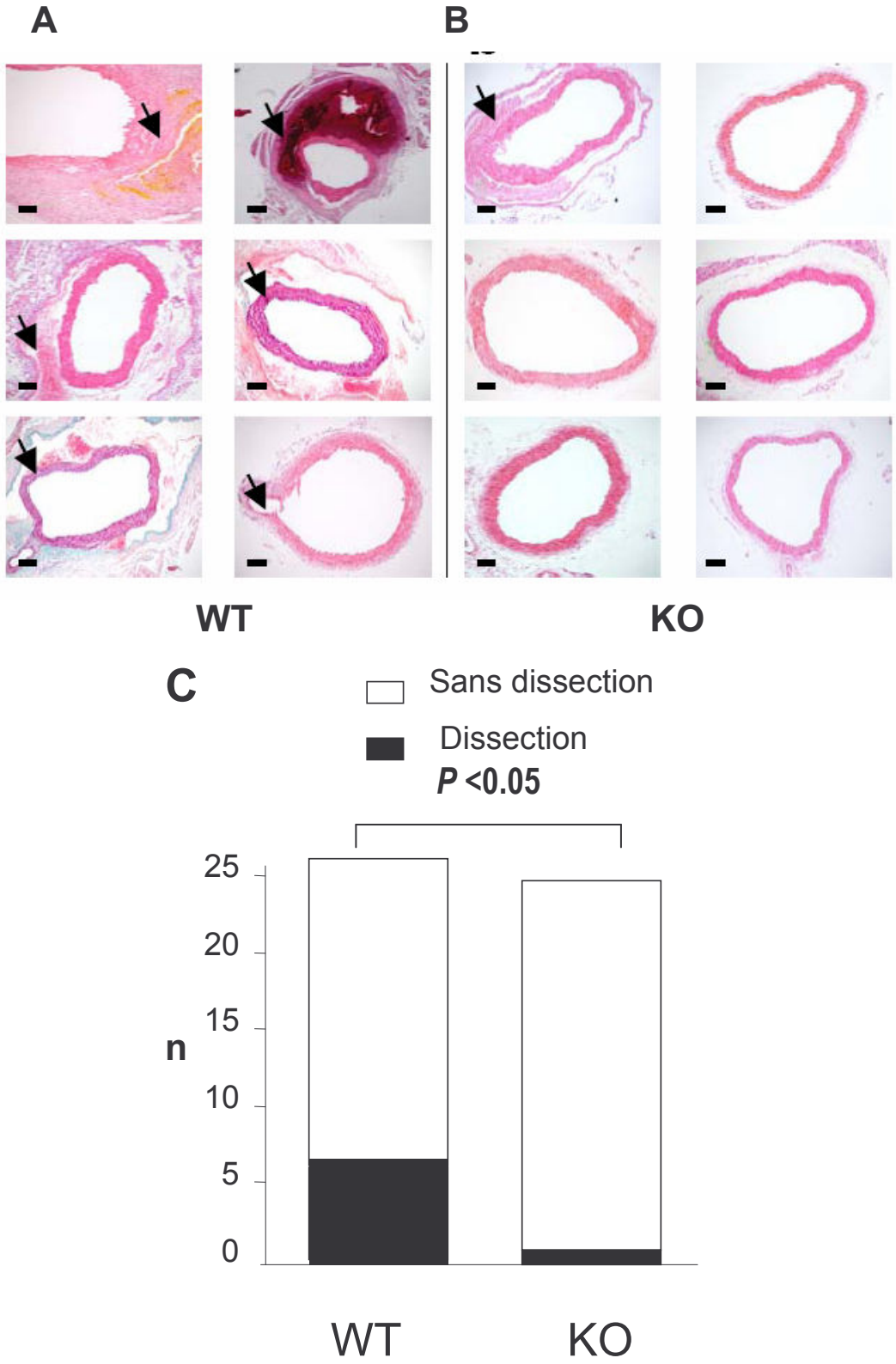


Figure n°18 : Les souris déficientes pour NOX1 sont partiellement protégées des dissections aortiques induites par l'angiotensine II. Les souris ont reçus une dose de 3mg/kg/jour angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9% (NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. La coloration à l'Hématoxyline/éosine ont permis de documenter les dissections aortiques chez les souris wild type (WT) et déficientes pour NOX1 (**A, B**). Une dissection aortique a été détectée chez 6 (sur 26 WT), et seulement chez 1 (sur 25) souris déficientes pour NOX1 (**C**). Scale barre= 50 µm. les flèches pointent les localisations des dissections et anévrysmes.

D. NOX1 participe à la survenue de l'hypertrophie médiale mais pas à la prolifération cellulaire

L'hypertrophie médiale de l'aorte est un des marqueurs des modèles murins d'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II (Griffin et al. 1991; Daugherty and Cassis 2004; Simon 2004). Nous avons donc mesuré la surface de la média aortique, aire médiale (AM) dans les groupes de souris ayant reçu de l'angiotensine (WT et souris déficientes pour NOX1) et dans les groupes n'ayant reçu que du NaCl (WT et souris déficientes pour NOX1) (figure n°19 A). Chez les animaux non traités (n=9/ groupe), l'AM était similaire dans les deux groupes distincts génétiquement. La réponse à l'angiotensine était marquée par la survenue d'une hypertrophie médiale chez les deux groupes de souris (n=14/groupe) (figure n°19B). Cependant, l'augmentation chez les souris déficientes pour NOX1 (14%) était significativement moins élevée que chez les WT (26%) ($p<0.05$).

La perte du gène NOX1 diminuant l'hypertrophie médiale secondaire à l'injection continue d'angiotensine II, on peut conclure que NOX1 participe à la survenue de l'hypertrophie médiale.

Des données *in vitro* sont en faveur du rôle de NOX1 dans la prolifération cellulaire en particulier de celles des Cellules Musculaires Lisses Vasculaires (CMLV) (Suh, Arnold et al. 1999; Lassegue, Sorescu et al. 2001; Lambeth 2004). Nous avons donc évalué la possibilité d'une prolifération cellulaire de deux façons : i) en comptabilisant la densité nucléaire au sein des surfaces vasculaires déjà mesurées (nb de noyau par AM). Cette mesure a été réalisée en utilisant des seuils de définition couleur sur des images numérisées à partir des colorations Hématoxyline/éosine. ii) en marquage immunohistochimiques par un anticorps anti-PCNA (Proliferative Cell nuclear Antgene) (Tulis et al. 2003).

La mesure du nombre de noyau montre que le nombre de cellules dans la media est significativement augmenté sous l'effet de l'angiotensine II dans les deux groupes de souris wild-type (+62%) et déficientes pour NOX1 (+51%), (figure n°20A). Malgré un nombre de cellules moins important chez les souris déficientes pour NOX1, cette augmentation était comparable statistiquement ($p=0.49$). La prolifération cellulaire est donc en partie cause de l'augmentation de l'épaisseur de la média mais elle n'explique pas la différence d'épaisseur de média observée entre nos deux groupes de souris sous angiotensine II. NOX1 n'a pas de rôle dans la prolifération cellulaire dans ce modèle.

Le marquage par les anticorps anti-PCNA sont montrés figure 21. En l'absence d'angiotensine, le marquage est très faible dans toutes les couches de l'Aorte (figure 21A) Endothélium, Média et Adventice). Après angiotensine, le nombre de cellules anti-PCNA positif est significativement augmenté dans les deux groupes de souris.

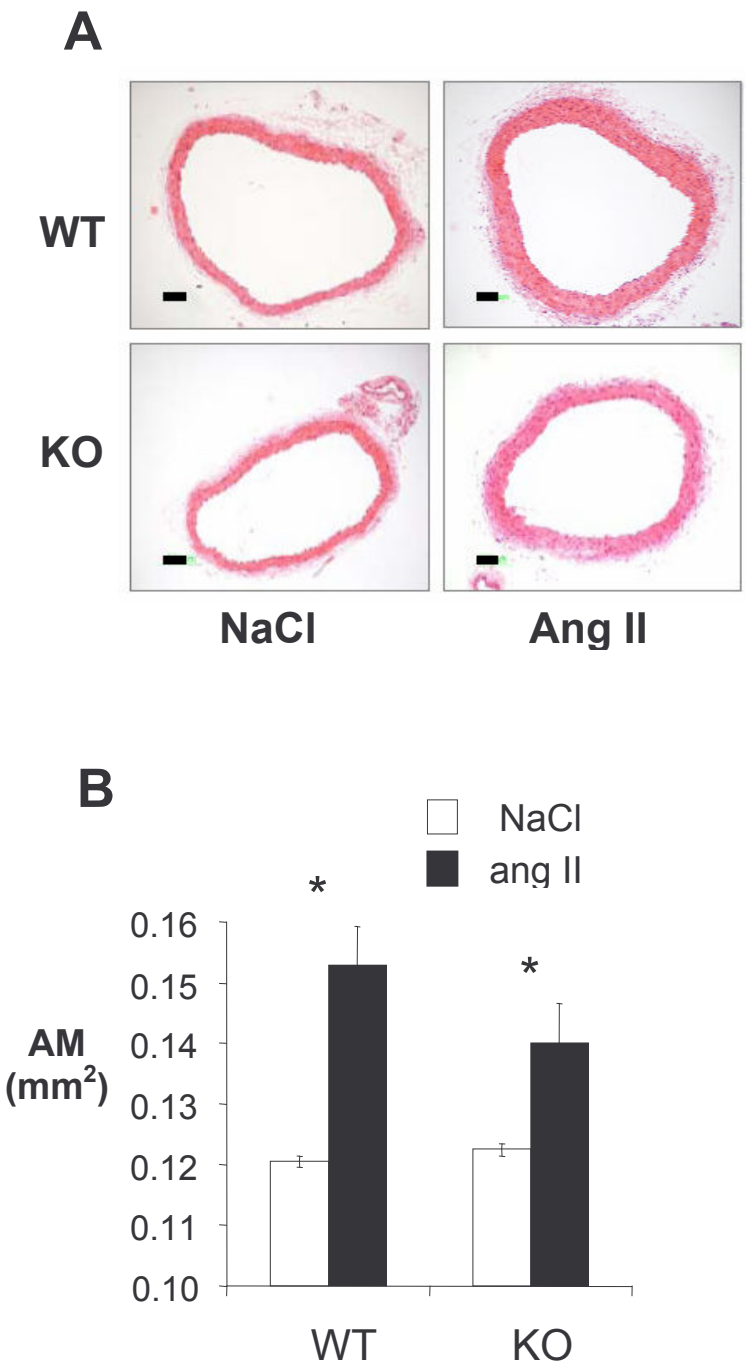


Figure n° 19 : NOX1 participe à l'hypertrophie de la média induite par l'angiotensine II. Les souris ont reçu une dose de 3mg/kg/jour angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9% (NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. (a) les coupes histologiques des sections aortiques ont été colorées à l'Hématoxyline/éosine; aspect typique de chacun des groupes, (b) l'aire de la média (AM) a été déterminée sur des sections histologiques d'aortes colorées à l'Hématoxyline/éosine. Les mesures quantitatives ont été réalisées par histomorphométrie quantitative comme décrit dans le chapitre « Méthode » (Moyenne +/- S.E, n=14 pourl es souris sous ang II , et n= 9 pour les souris sous NaCl). *P<0.05. Scale barre = 50 µm

L'analyse quantitative confirme cependant l'absence de différence entre les deux groupes même après angiotensine (figure 21B). Ces résultats confirment donc, que si l'angiotensine entraîne une prolifération cellulaire dans la média elle est indépendante de NOX1. Par conséquent, ce n'est pas la diminution d'une prolifération cellulaire qui explique la plus faible hypertrophie médiale chez les souris déficientes pour NOX1 recevant de l'angiotensine.

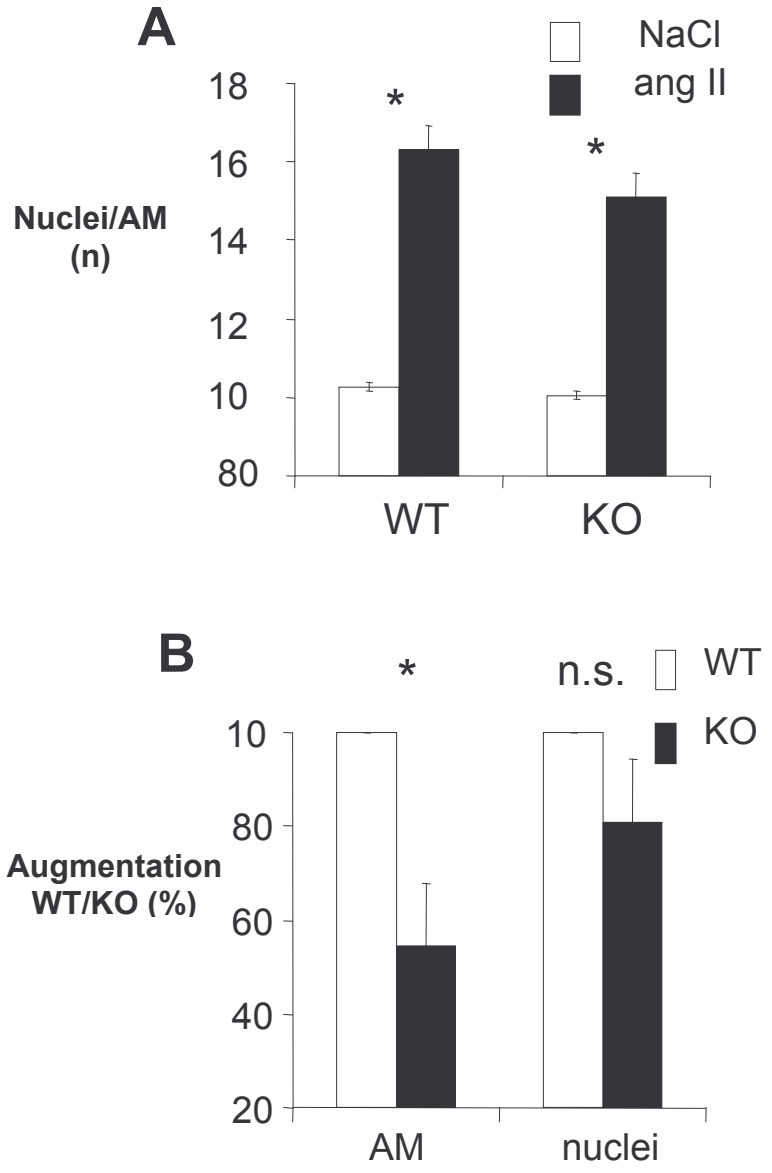


Figure n°20 : Variation du nombre de nuclei et comparaison des augmentations entre les souris wild type (WT) et déficientes pour NOX1 (KO) : les souris ont reçus une dose de 3mg/kg/jour angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9% (NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée (**A**) Nombre de nuclei dans la média des sections aortiques (Moyenne +/- S.E,n=14 pour les souris sous ang II , et n= 9 pour les souris sous NaCl), (**B**) comparaison de l'augmentation de l'AM induite par l'angiotensine II et de l'augmentation du nombre de noyaux dans la média des sections aortiques chez les souris wild-type (WT) et NOX1-KO (KO) (augmentation chez les wild type = 100%). *P<0.05.

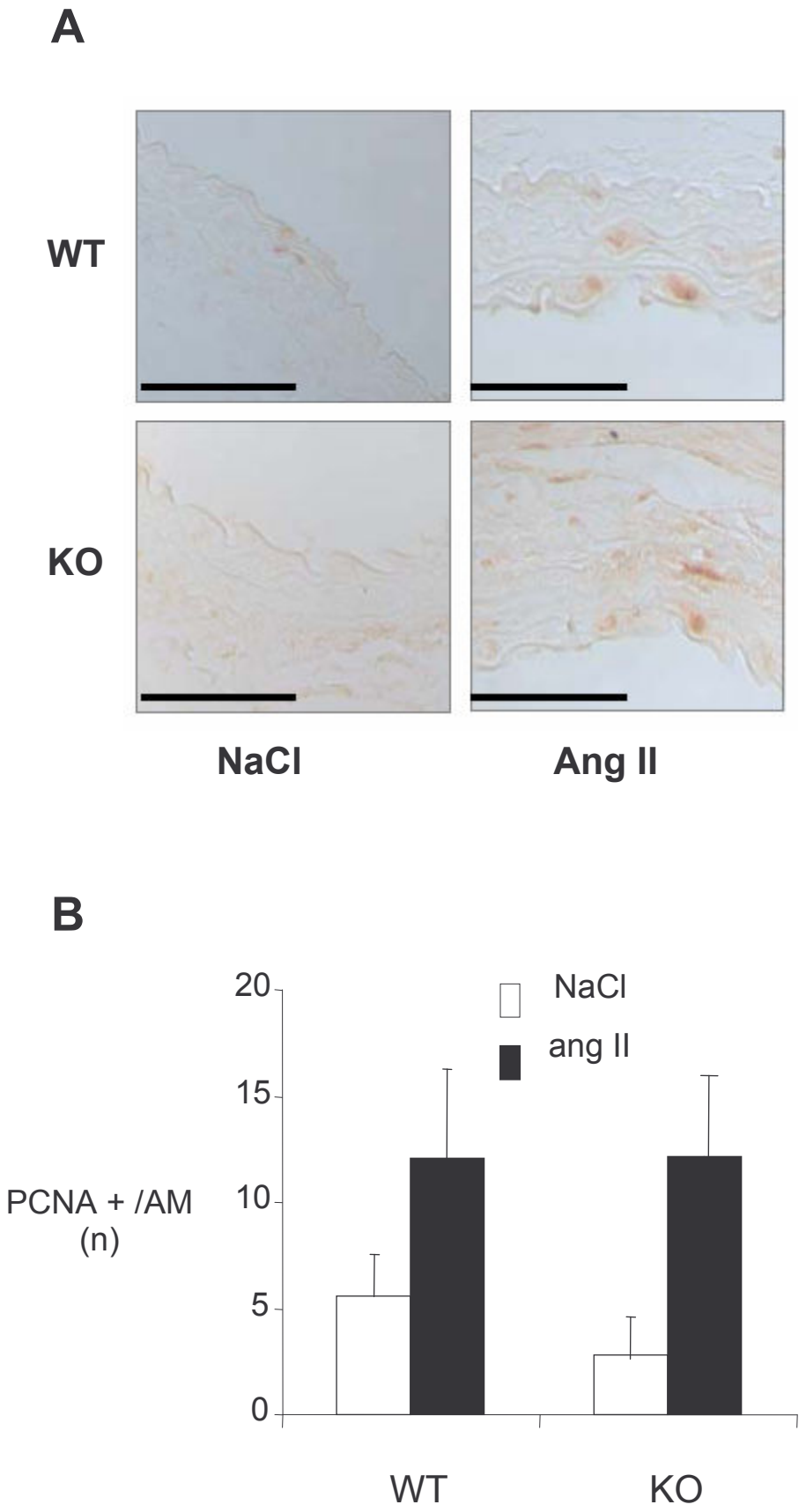


Figure n°21 : NOX1 n'est pas nécessaire pour l'induction de la prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux (CMLV) induite par l'angiotensine II. Les souris ont reçus une dose de 3mg/kg/jour angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9% (NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. (A) Marquages Immunohistochimiques des sections aortiques en utilisant un anticorps anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (dilution de l'anticorps 1/100); expérience typique et résultats similaires obtenus sur 4 animaux différents par groupe. (B) Analyse quantitative du marquage des noyaux positifs pour l'anticorps antiPCNA (Moyenne ± S.E., 12 déterminations de 4 souris différentes). Scale barre = 50 µm

E. NOX1 participe à l'accumulation de la Matrice Extracellulaire.

Compte tenu des effets de l'angiotensine sur la matrice extracellulaire (MEC) à savoir une accumulation de la MEC et l'absence d'impact de la prolifération cellulaire dans notre modèle, nous avons fait l'hypothèse que les différences observées pouvaient être liées à une diminution de l'accumulation de la matrice extracellulaire (Intengan et al. 2001). Des colorations par aldéhyde-fuchsine et au trichrome Masson ont été réalisées (n=9 pour les souris sous angiotensine et n=9 pour les souris avec NaCl (figure 22A). L'aldehyde-fuchsine (AF) colore les fibres élastiques en pourpre et la MEC en bleue mais différencie mal le cytoplasme des cellules; Le Trichrome Masson (TM) colore la MEC en bleue et le cytoplasme cellulaire en rouge. Ces deux colorations permettent de mesurer les surfaces respectives des fibres élastiques (AF) et de la MEC (TM). L'observation directe en microscopie optique des colorations AF et TM montre qu'il n'existe pas de différence évidente entre les souris WT et les souris déficientes pour NOX1 (figure 22). Par contre, sous angiotensine II, les colorations AF montrent une augmentation de l'espace entre les fibres élastiques dans les deux groupes suggérant, ou une réduction de leur surface ou une augmentation de la surface de la MEC (figure 22A). Cette augmentation est cependant beaucoup plus importante chez les WT que chez les souris déficientes pour NOX1. Comme visualisée sur la figure 22B, la MEC colorée bleue apparaît comme de fine structure entre les fibres élastiques chez les souris déficientes pour NOX1 alors qu'elle apparaît en amas entre les fibres élastiques chez les WT. Les quantifications par histomorphométrie numérisée permettent d'objectiver ces données. Elles montrent que la surf souris déficientes pour NOX1 (figure 23A); il n'existe donc pas de différence quantitative entre les 2 groupes concernant les fibres élastiques. Par contre, elles ne permettent pas d'objectiver la qualité et les ruptures potentielles de ces fibres. Les résultats de quantification de la MEC confirment l'impression de la microscopie optique puisque chez les WT l'augmentation de la surface de la MEC est de 270% alors que celles des souris déficientes pour NOX1 est de 50% (figure 23B).

NOX 1 participe donc à l'accumulation de la matrice extracellulaire induite par l'angiotensine II.

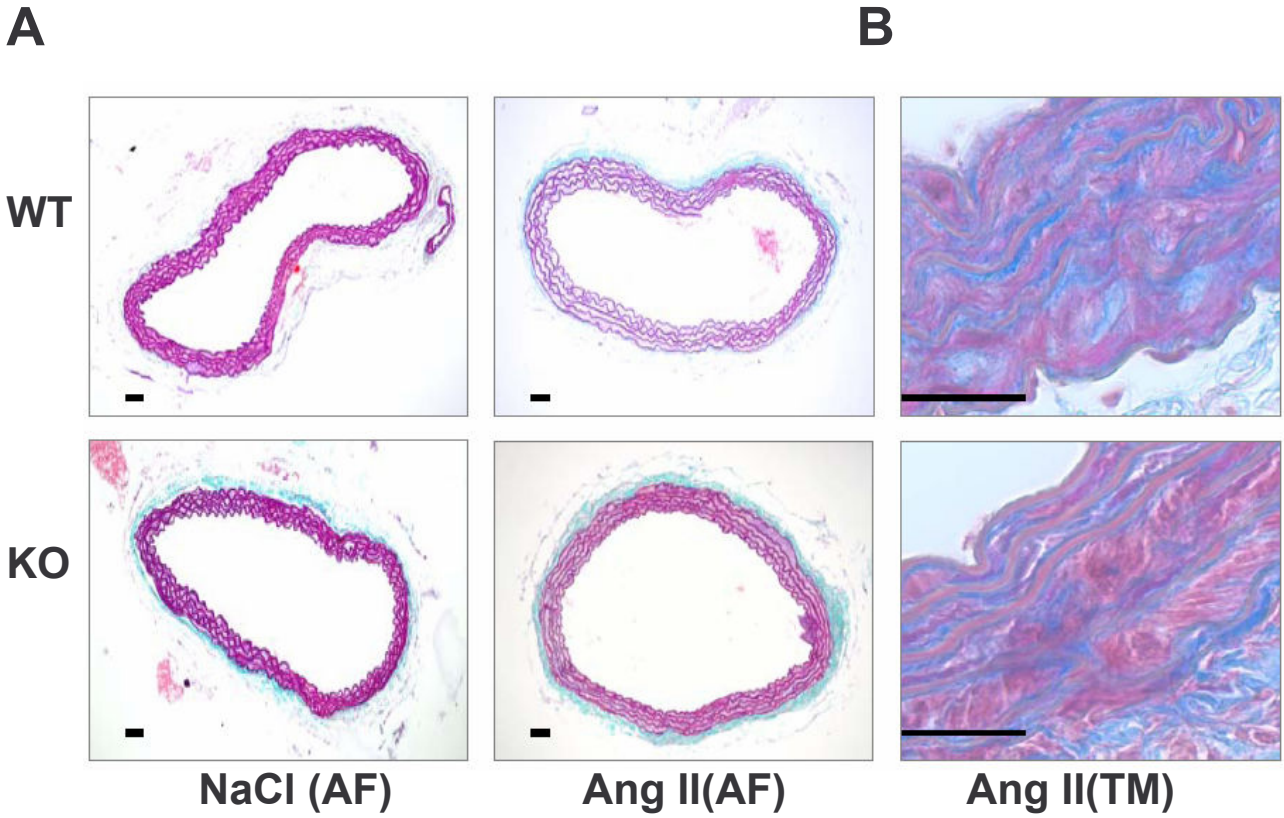


Figure n° 22 : L'accumulation de la Matrice Extracellulaire (MEC) induite par l'angiotensine II est diminuée chez les souris déficientes pour NOX1 (KO). Les souris ont reçus une dose de 3mg/kg/jourangiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9% (NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. (**A**) Les sections aortiques ont été colorées par l'aldehyde/fuchsine (AF, colore en pourpre les fibres élastiques et en bleue clair La MEC) et par le trichrome Masson (TCM, les cytoplasmes cellulaires sont colorés en rouge et la MEC en bleue) (**B**); expérience typique et résultat des résultats similaires ont été obtenus sur 4 animaux différents par groupe.

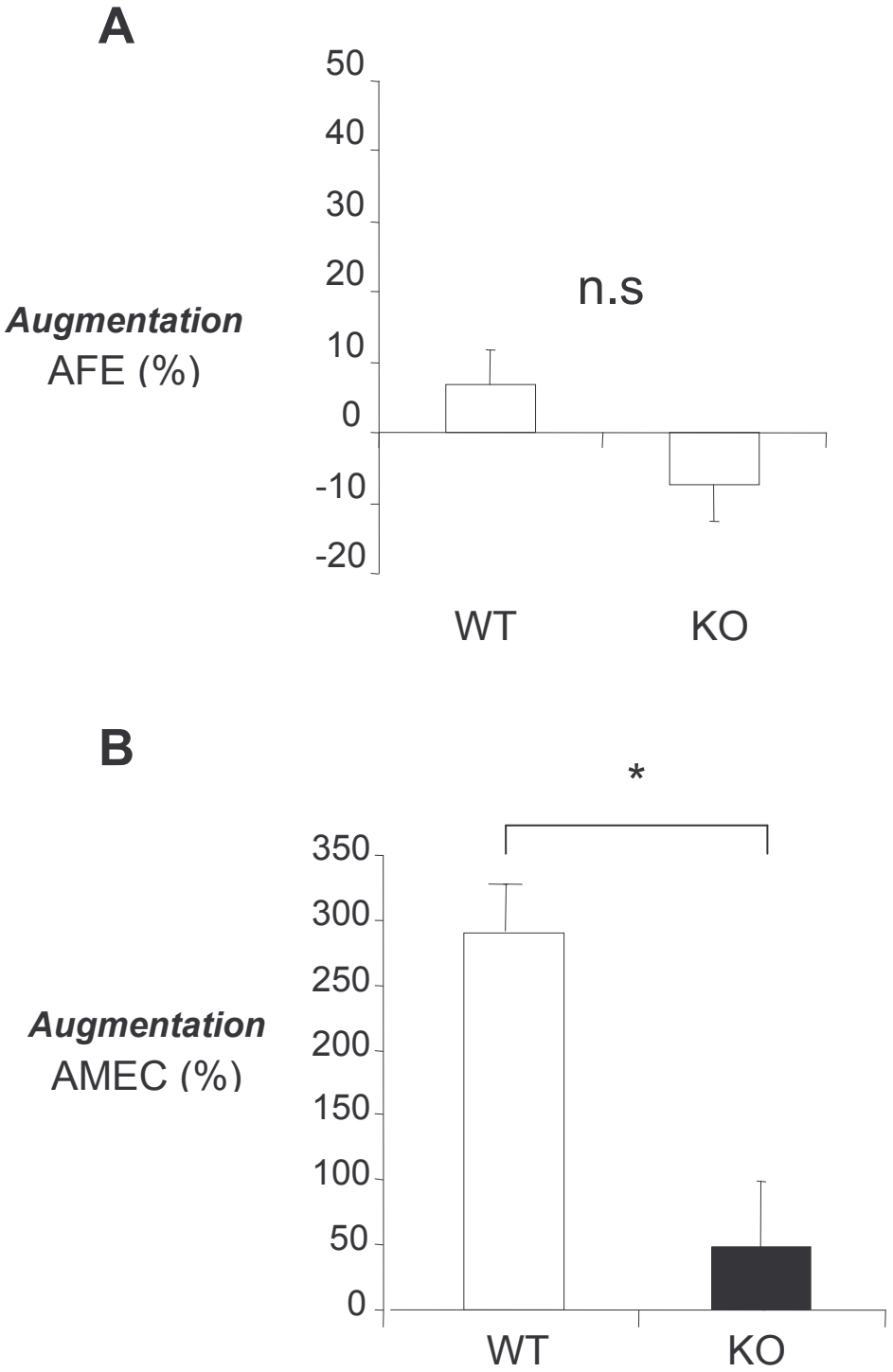


Figure n°23 : **Variations quantitatives de l'aire des fibres élastiques (AFE) et de la Matrice Extracellulaire (AMEC) induite par l'angiotensine II est diminuée chez les souris déficientes pour NOX1 (KO)**. Les souris ont reçus une dose de 3mg/kg/day angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9% (NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. (**A, B**) Analyse quantitative par histomorphométrie de la surface des fibres élastiques de la média et de la surface de la MEC comme décrit dans le chapitre « Méthode » (Moyenne +/- S.E, n=14 pour les souris sous ang II, et n= 9 pour les souris sous NaCl).*P<0.05. Scale barre = 50 µm.

F. NOX1 et l'angiotensine II entrainent une modification d'expression génique dans l'aorte.

NOX1 a un rôle potentiel dans la régulation de l'expression génique via la production des ERO. Sous l'effet de l'angiotensine II cette régulation pourrait être aussi modifiée.

Une analyse comparative sur puce ADN à partir de prélèvements d'aortes de souris WT et déficientes pour NOX1 ayant reçu de l'angiotensine II a été réalisé en ce sens.

De nombreux gènes ont été retrouvés ou surexprimés ou sous exprimés de façon significative chez la souris déficiente pour NOX1 par rapport à la souris WT. Le tableau n°5 montre les 50 gènes quantitativement les plus importants. L'ensemble de cette analyse sur puce ADN devrait être publiée prochainement. Il apparaît donc clairement que NOX1 est impliquée dans la régulation génique.

Numéro de la sonde Affimetrix	Gène	Symbole	X de modification KO / WT
Structure Cellulaire			
1449388_at	***thrombospondin 4***	***Thbs4***	***36.20***
1451203_at	myoglobin	Mb	48.13
417290_at	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	Lrg1	5.08
1418769_at	myozenin 2	Myoz2	4.00
1452968_at	collagen triple helix repeat containing 1	Cthrc1	3.97
1435115_at	fibronectin type III domain containing 5	Fndc5	21.44
1449204_at	gap junction membrane channel protein beta 5	Gjb5	5.16
1424599_at	fibrinogen-like protein 1	Fgl1	4.03
1423049_a_at	tropomyosin 1, alpha	Tpm1	3.94
1439300_at	cysteine-rich hydrophobic domain 1	Chic1	-6.02
1421429_a_at	nephronectin	Npnt	-6.30
1442569_at	Chaperonin subunit 4 (delta)	Cct4	-5.70
1444765_at	RNA binding protein gene with multiple splicing	Rbpms	-6.06
Metabolisme			
1454995_at	***dimethylarginine dimethylaminohydrolase* 1**	**Ddah1**	**5.74**
1450033_a_at	signal transducer and activator of transcription 1	Stat1	3.03
1427747_a_at	lipocalin 2	Lcn2	20.31
1417951_at	enolase 3, beta muscle	Eno3	6.81
1422206_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 1	B3galt1	-13.00
1425339_at	phospholipase C, beta 4	Plcb4	-5.74
1425338_at	phospholipase C, beta 4	Plcb4	-5.20
1422671_s_at	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2	Naalad2	-10.56
1421403_at	protease inhibitor 15	Pi15	-7.70
1445723_at	Aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)	Akr1b3	-4.74
1455361_at	diacylglycerol kinase, beta	Dgkb	-4.63
Fonction ADN			
1429947_a_at	Z-DNA binding protein 1	Zbp1	7.58
1451426_at	DNA segment, Chr 11, Lothar Hennighausen 2, expressed	D11Lgp2e	3.94
1417595_at	mesenchyme homeobox 1	Meox1	3.88
1418191_at	ubiquitin specific protease 18	Usp18	3.79
1458512_at	Transducin-like enhancer of split 3, homolog of Drosophila E(spl)	Tle3	-6.70
1438482_at	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	Wwp2	-4.85
Defenses Cel./organisme			
1450783_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Ifit1	5.04
1419569_a_at	interferon-stimulated protein	Isg20	4.29
1449401_at	complement component 1,q subcomponent, gamma	C1qg	3.88
1451651_at	V-set and immunoglobulin domain containing 4	Vsig4	3.79
1417851_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	Cxcl13	9.19
1417244_a_at	interferon regulatory factor 7	Irf7	4.13
1423555_a_at	interferon-induced protein 44	Ifi44	4.13
1453196_a_at	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	Oasl2	3.94
1427351_s_at	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	Igh-6	6.91

Numéro de la sonde Affimetrix	Gène	symbole	X de modification KO / WT
Unclassified			
1438575_a_at	EST	---	-8.77
1420517_at	EST	---	-6.50
1456214_at	protocadherin 7	Pcdh7	-5.36
1438989_s_at	EST	---	-4.70
1459316_at	EST	---	-8.98
1430436_at	EST	---	-8.71
1457169_at	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	Ppp1r12b	-5.79
1434951_at	armadillo repeat containing 8	Armc8	-5.49
1457692_at	EST	---	-8.84
1442077_at	EST	---	-5.66
1457092_at	EST	---	-5.57
1441779_at	EST	---	-4.70

Tableau n°5 : **Analyse de la puce ADN-** ***Liste des 50 gènes présentant les variations quantitatives les plus importantes entre les aortes de souris Wild type et celles des souris déficientes pour NOX1 (n=3/groupe) ayant reçu de l'angiotensine II***. Les nombres positifs indiquent une augmentation d'expression et les nombres négatifs une diminution d'expression chez les souris déficientes pour NOX1. Les gènes sont classés selon leur fonction principale d'après leur classification dans les librairies Gene bank. On remarque une augmentation d'expression de tnombreux gènes impliqués dans des fonctions de défense de l'organisme mais ceux qui ont retenus notre attention dans le cadre du système vasculaire sont surlignés en gras. Le Procollagène III, sous exprimé n'apparaît pas ici car il ne fait pas partie des 50 variations les plus importantes.

Nous avons ensuite recherché parmi les gènes ayant des modifications importantes, lesquels étaient impliqués dans le système vasculaire ou ayant un intérêt potentiel relatif à l'angiotensine II ou aux ERO. Toutes les modifications retenues ont été celles qui ont été confirmées par PCR quantitatives (temps réel) sur un nombre d'échantillons indépendants. Les comparaisons réalisées secondairement en PCR quantitative ont inclus des groupes de souris WT et déficientes pour NOX1 n'ayant pas reçu d'angiotensine pour déterminer s'il existait une différence d'expression basale ou s'il s'agissait d'une sous expression différente liée à un message différent de l'angiotensine II chez les souris déficientes pour NOX1.

Compte tenu des résultats concernant la MEC, nous avons cherché les gènes codant pour des protéines de la MEC. Le Collagène I et III sont des composant de la MEC de l'aorte mais il n'y avait aucune modification pour l'ARN messager du procollagene I ; à l'opposé, le Procollagène III montrait une sous expression modérée (-2.3, p=0.1). Ces résultats ont été confirmés sur de nouveaux échantillons d'aortes (Figure 24A). On remarque qu'il existe une tendance à une sous expression de base du procollagène III chez les souris déficientes pour NOX1 bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative (p=0.08). L'effet de

l'angiotensine II parait équivalent chez les deux groupes de souris. NOX1 semble donc impliqué dans la régulation de l'expression du procollagene III.

Une des modifications majeures retrouvées dans la puce ADN concernait la thrombospondine-4. Sachant que des études épidémiologiques ont retrouvés une forte implication d'un variant de la thrombospondine-4, d'une part (McCarthy et al. 2004; Stenina et al. 2004) qu'elle semble impliquée dans la MEC d'autre part, une vérification par PCR quantitative a été réalisée. La forte surexpression retrouvée dans le microarray a été confirmée en PCR quantitative (figure 24B). On ne retrouve pas de différence d'expression basale entre les deux groupes de souris mais par contre, sous la stimulation de l'angiotensine on voit une surexpression significativement supérieure chez les souris déficientes pour NOX1. On peut donc conclure que NOX1 diminue l'induction de la surexpression génique induite par l'angiotensine II.

Il semble au total qu'au moins deux protéines impliquées dans la MEC ont des expressions géniques dépendantes de NOX1.

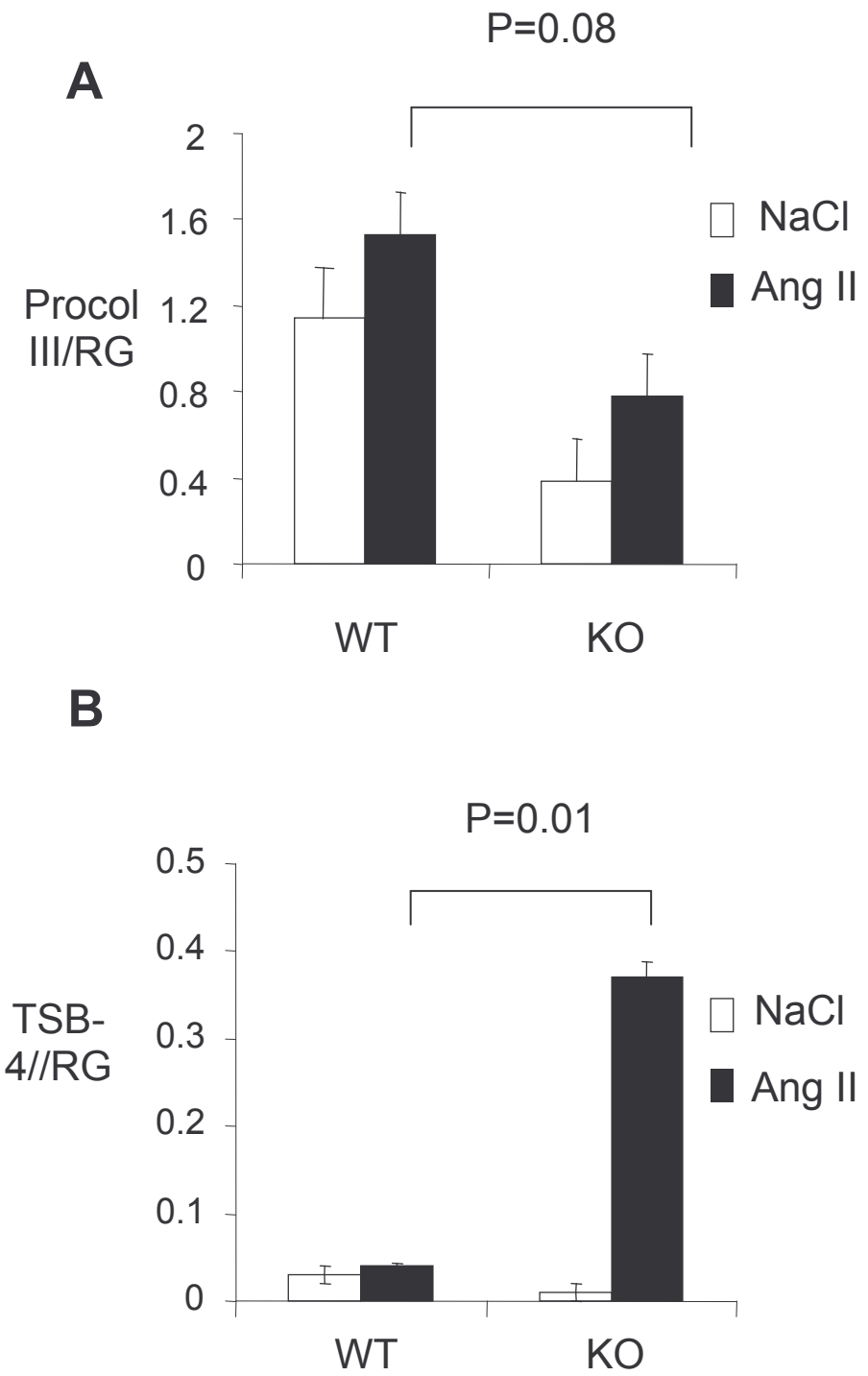
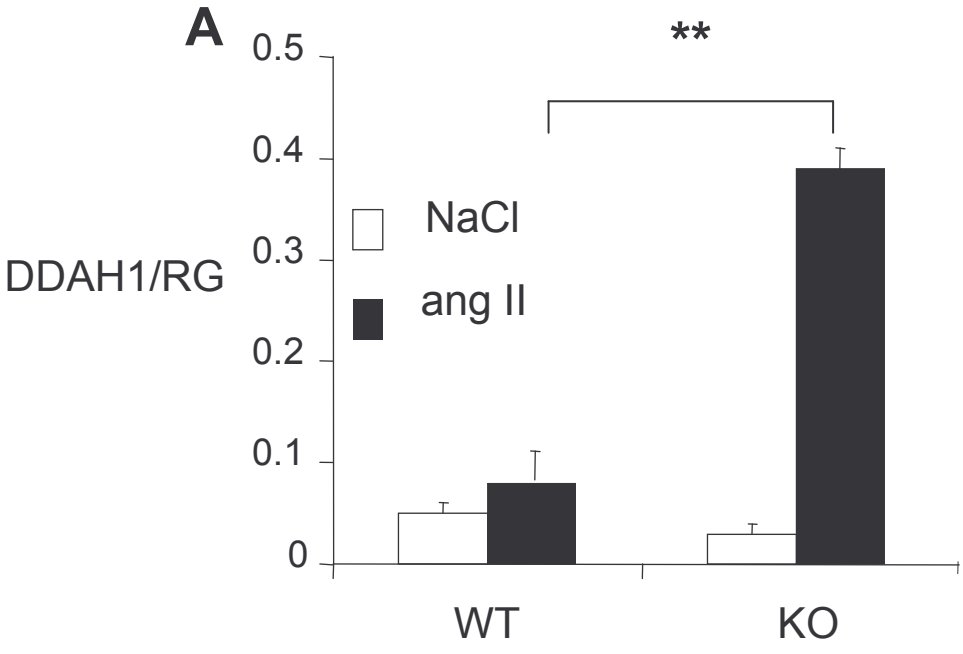


Figure n° 24 : Variation d'expression ARNm du procollagene III et de la thrombospondine-4 sous l'effet de l'angiotensine II et de NOX1. Les souris ont reçus une dose de 3mg/kg/jour angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9% (NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. Les PCR quantitatives ont été déterminées par PCR temps réel pour les deux gènes procollagene III (**A**) et thrombospondin-4 (**B**) chez des souris wild-type (WT) et NOX1-KO (KO); avec angII et avec NaCl. Les valeurs rapportées sont les valeurs normalisées à deux gènes références déterminés dans des expériences préliminaires et vérifiés lors de ces mesures (RG); (n=4/groupe).

G. DDAH1 et nitrite oxyde

L'analyse de la puce ADN a aussi montré une modification majeure (surexpression) de la dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1) après angiotensine II chez les souris déficientes pour NOX1. La fonction de DDAH1 est la dégradation des « asymmetric dimethylarginine (ADMA) » qui sont eux mêmes des inhibiteurs endogènes de la NO synthase (NOS) (32). Compte tenu de la fonction vasodilatatrice physiologique du NO, la diminution de la pression artérielle chez les souris déficientes pour NOX1 pourrait, au moins en partie, être expliquée par l'augmentation de l'expression de la DDAH1. Nous avons donc vérifié ces résultats par PCR quantitatives temps réel à partir de nouveaux échantillons d'aortes (figure 25A). On retrouve une expression de base (sans angiotensine) faible dans les deux groupes et sans différence significative. Par contre, on confirme l'augmentation d'expression de DDAH1 chez les souris déficientes pour NOX1 et l'absence d'augmentation chez les WT. Nous avons ensuite vérifié par technique immunohistochimique si cette différence pouvait se confirmer au niveau protéique et s'il était possible de localiser la DDAH1 dans l'aorte. Le marquage a été réalisé grâce à un anticorps anti-DDAH1 (Kayto gracieusement) et une révélation peroxydase classique (figure 25B) Le marquage par l'anticorps anti-DDAH1 était faiblement réparti sur les couches endothéliales et adventicielles et quasi absent sur la média; ceci était retrouvé de façon répétée chez les souris n'ayant pas reçu d'angiotensine, sans aucune différence entre souris WT et souris déficientes pour NOX1. Après angiotensine II, seules les souris déficientes pour NOX1 ont montré une augmentation du marquage au niveau de la média.

Il apparaît donc que NOX1 diminue l'expression d'une enzyme, DDAH1, qui dégrade un inhibiteur endogène de la NOS. Cela suggère que l'augmentation d'expression de cette enzyme est un des voies de signalement qui aboutit à la diminution de l'hypertension artérielle chez la souris déficientea pour NOX1.



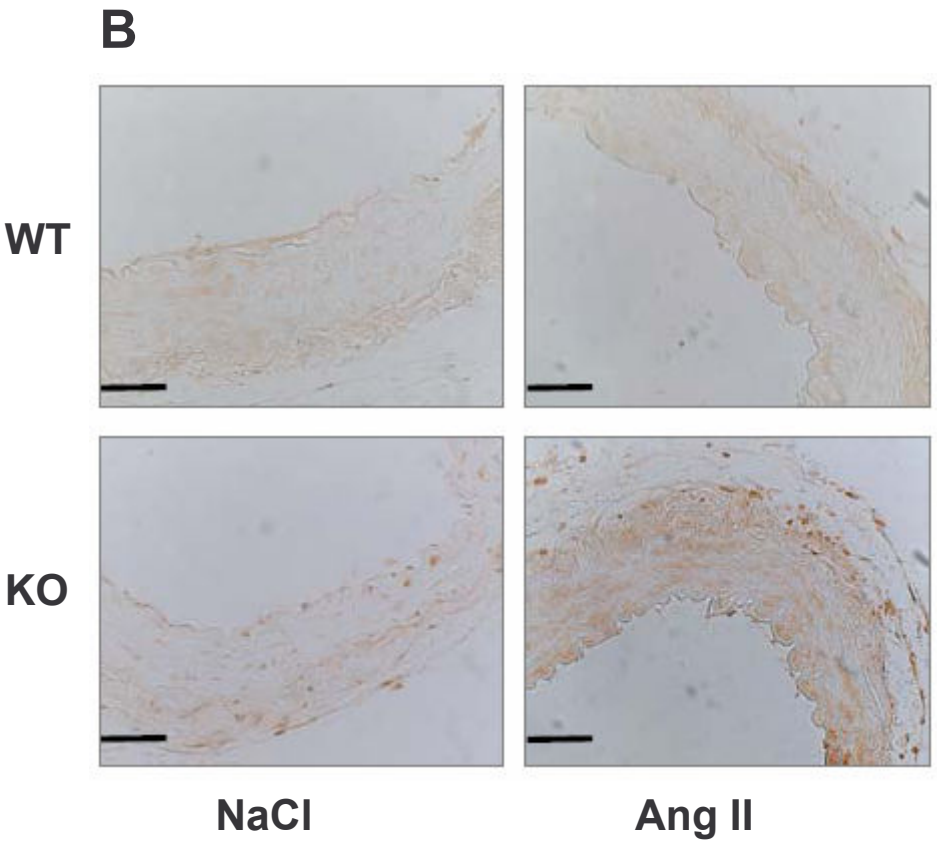


Figure n°25 : L'absence du gene NOX1 permet l'induction d'une surexpression de la dimethylarginine dimethylamino-hydrolase 1 (DDAH-1) par l'angiotensine II. Les souris ont reçus une dose de 3mg/kg/jour angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9% (NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. (**A**) PCR quantitatives de DDAH-1 dans l'aorte (PCR temps réel) de souris wild-type (WT) et souris déficientes pour NOX1 (KO) avec angII et avec NaCl. Les valeurs rapportées sont les valeurs normalisées à deux gènes références déterminée dans des expériences préliminaires et vérifiée lors de ces mesures RG) (n=4/groupes). (**B**) Marquage Immunohistochimique de la DDHA-1 dans les sections aortiques (dilution anticorps 1/200; expérience typique et résultats similaires obtenus sur 4 animaux différents par groupe.). *$P<0.05$, **$P<0.01$. Scale barre = 50 µm.

Nous avons donc mesuré les concentrations de dérivés du NO, i.e. les nitrates et les nitrites dans le plasma des souris au cours de 2 expérimentations successives chez les 4 groupes de souris (n=6 à 8/groupes).(figure 26). Chez les souris non traitées par l'angiotensine II, les niveaux de NO étaient comparables (p=0.4). Comme déjà rapporté, (Tarpey et al. 2001) nous observons une diminution du NO chez les souris WT. A l'inverse, nous observons non plus une diminution mais une légère augmentation de la concentration de NO chez les souris déficientes pour NOX1. La différence de concentration de NO chez les souris WT et souris déficientes pour NOX1 sous angiotensine est statistiquement significative (p=0.03).

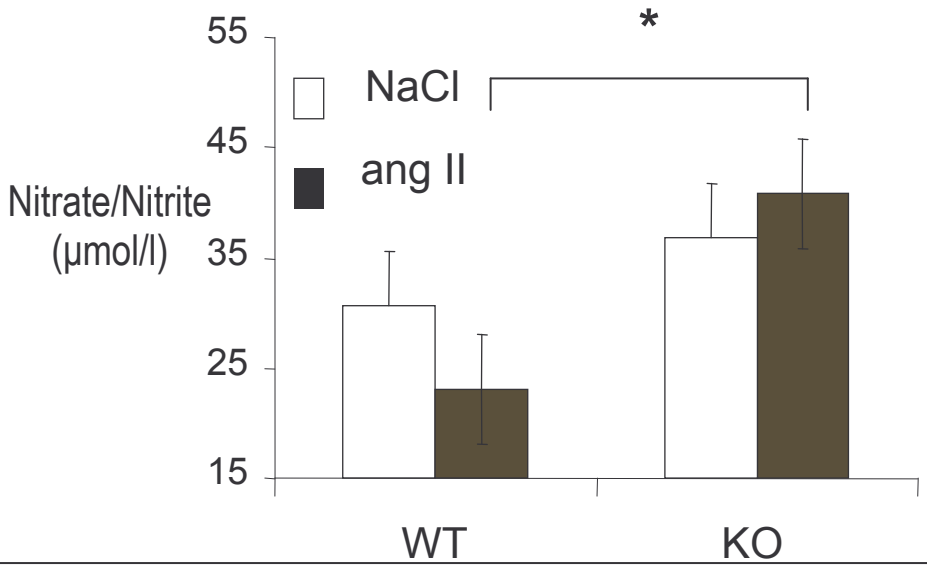


Figure n°26 : L'absence du gène NOX1 prévient la diminution de la biodisponibilité du NO induit par l'angiotensine II. Les souris ont reçus une dose de 3mg/kg/jour angiotensine II (ang II) ou du NaCl 0.9% (NaCl) pendant une période de 7 jours grâce à l'implantation d'une minipompe sous cutanée. Les animaux ont été sacrifiés au 7ème jour et l'aorte thoracique prélevée. Mesures plasmatiques des dérivés du Nitrite Oxyde (NO) à savoir, nitrite et nitrate) (n=8/ groupe) sous angiotensine II les souris déficientes pour NOX1 ont une concentration de Nitrate/Nitrite significativement supérieure aux souris WT. *P<0.05. Scale barre = 50 µm.

Il est donc possible de conclure de ces dernières expérimentations :

- que NOX1 inhibe physiologiquement la surexpression de DDAH1 induite par l'angiotensine II.
- que NOX1 est responsable de la diminution des Nitrites Oxydes plasmatiques induites par l'angiotensine II.

NOX1 participe donc d'une autre façon (régulation génique de DDAH1) à la balance Nitrite Oxyde/super oxyde (NO/O2.) dans le système vasculaire.

Le schéma ci dessous résume les nouvelles données issues de nos expérimentations en soulignant les différences de l'effet de l'angiotensine II chez les souris Wild Type et les souris déficientes pour NOX1 (figure n° 27).

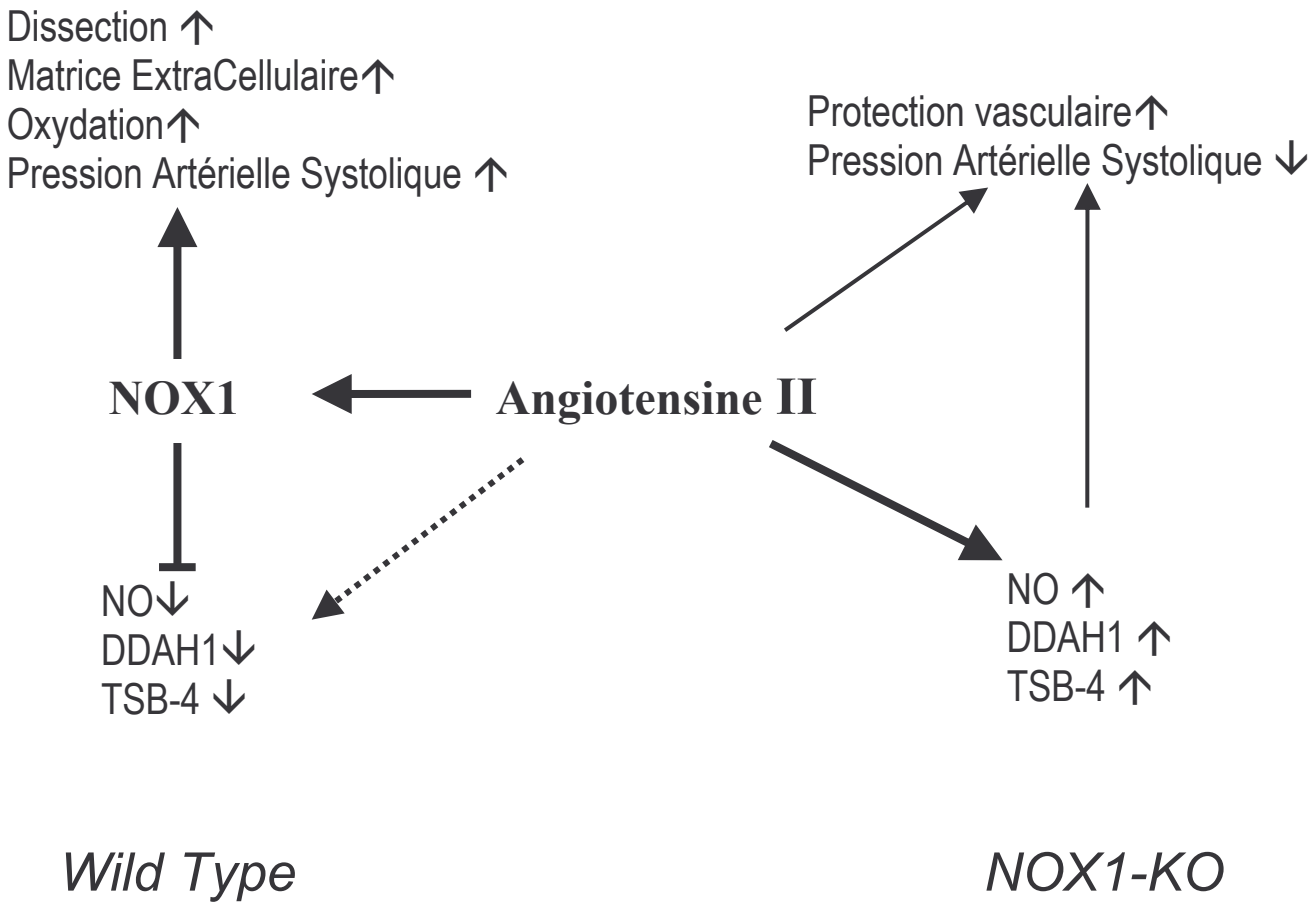


Figure N°27 : Comparaisons des différents effets de l'angiotensine II sur les souris Wild Type et les souris déficientes pour NOX1 (NOX-KO). NOX1 Inhiberait l'expression génique induite par l'angiotensine II de DDAH1 et thrombospondine –4 (TSB-4) et diminuerait la production de NO. Elle augmenterait l'oxydation, la pression artérielle systolique, et l'accumulation de la matrice extracellulaire.
En l'absence de NOX1, l'angiotensine II augmente l'expression génique de DDAH1 et de la thrombospondine –4 mais aussi la production protéique de DDAH1 et la production de nitrite oxyde (NO). Ils auraient un rôle contre régulateur de l'augmentation de la pression artérielle systolique induite par l'angiotensine II et protégerait les vaisseaux.

4. Discussion

Notre travail apporte de nouvelles données sur le rôle de NOX1 dans le système vasculaire. NOX1 contribuerait non seulement à la régulation de la pression artérielle mais aussi à la formation des dissections aortiques. Pour expliquer ces 2 observations, nos résultats nous permettent de discuter 3 types de mécanismes au travers desquels NOX1 modifie les effets de l'angiotensine II à savoir : la participation de NOX1 à l'accumulation de la matrice extracellulaire, à la régulation de l'expression génique et son implication dans le système de régulation du nitrite oxyde.

A. NOX1 et pression artérielle

L'implication de différentes NOX dans la régulation de la pression artérielle est actuellement largement admise. Cependant la question du rôle de chacun des participants potentiels, à savoir NOX1, NOX2, NOX4 et certaines sous unités est restée jusqu'alors très ouverte.
En effet si le rôle de $p47^{phox}$ est vraisemblable au vu des données les plus récentes (Lavigne et al. 2001; Landmesser, Cai et al. 2002), la manière dont elle intervient et les modifications des autres NOX dans ces modèles restent mal établies. Il existerait une diminution de production d'ERO *in situ* au niveau des cellules endothéliales (lignées et cultures cellulaires primitives) mais cela apparaît moins nettement au niveau de la média pour les CMLV. On sait par contre par Lavigne et col que $p47^{phox}$ est nécessaire à la production d'ERO par les CMLV stimulées par l'angiotensine II (Lavigne, Malech et al. 2001). Aucune autre donnée explicative n'a été apportée depuis ces 2 publications. Le rôle de NOX2 est plus controversé ; en effet, NOX2 est exprimée dans les CMLV des artères résistantes (Touyz, Chen et al. 2002), mais non ou très faiblement dans les artères élastiques de gros calibre (telle que l'aorte) (Sorescu, Weiss et al. 2002; Ushio-Fukai et al. 2002). Dans les souris déficientes pour NOX2 des résultats contradictoires ont été publiés : pour les uns, il existe une différence dans les pressions artérielles de base et un rôle dans l'hypertrophie induite par l'angiotensine II ; son rôle s'exercerait depuis l'adventice et l'endothélium par effet paracrine via le NO sur la média aortique dont elle a été montré absente ; pour les autres, des données plus récentes montrent que NOX2 n'est pas impliquée dans l'hypertension artérielle chronique dépendante de l'angiotensine II (Touyz, Mercure et al. 2005). Dans ce dernier modèle d'hypertension chronique, il faut noter que les expressions d'ARNm de NOX1 et NOX4 sont inchangées dans

le groupe de souris déficientes pour NOX2 suggérant l'absence de mécanisme de compensation entre les NOX (Touyz, Mercure et al. 2005).

De fait, peu de modèles animaux ont contribué à la compréhension des différents rôles des NOX dans le système vasculaire. Comme nous l'avons vu, NOX3 et NOX5 ne sont pas étudiées car la première n'a pas de localisation vasculaire et la seconde n'est pas exprimée chez le rongeur. NOX4 est exprimée dans multiples secteurs et cellules du système vasculaire (tableau n°1) et est notamment capable de produire des ERO dans les CMLV (Ellmark et al. 2005). Pourtant, plusieurs arguments plaident en défaveur d'un rôle direct et prépondérant sur le système vasculaire : i) elle est capable de produire des ERO en l'absence de $p47^{phox}$ (Martyn, Frederick et al. 2005); ii) elle est très variablement modifiée par l'angiotensine II *in vitro* (Wingler, Wunsch et al. 2001; Higashi, Shimokawa et al. 2003; Lassegue and Clempus 2003; Matsuno, Yamada et al. 2005), iii) comme *in vivo* (Dikalova et al. 2005; Matsuno, Yamada et al. 2005) mais aussi avec différents autres stimulants (Suliman, Ali et al. 2004; Sturrock, Cahill et al. 2005; Vallet, Charnay et al. 2005).

L'attention se focalise donc logiquement sur NOX1. Jusqu'à l'obtention de modèles animaux génétiquement modifié pour NOX1, plusieurs arguments plaidaient en faveur de son rôle dans la régulation de la pression artérielle ; NOX1 est exprimée dans les CMLV des artères élastiques et surexprimée sous l'effet de l'angiotensine II (Wingler, Wunsch et al. 2001; Mollnau, Wendt et al. 2002; Lassegue and Clempus 2003) ; la production d'ERO par les CMLV est inhibée par l'inhibition de l'expression de NOX1 (utilisation d'un anti-sens) (Lassegue, Sorescu et al. 2001) et elle peut interagir avec la sous unité $p47^{phox}$ (Banfi, Clark et al. 2003).

Depuis ont été publiés deux récents travaux sur des animaux génétiquement modifiés pour le gène NOX1. Le premier travail a permis, par une manipulation génétique élégante, une surexpression continue de NOX1 chez une souris C57B6/J (Dikalova, Clempus et al. 2005) tandis que le second travail a utilisé un modèle animal de même nature que le notre i.e. une souris délétée pour le gène d'intérêt (NOX1 KO) (Matsuno, Yamada et al. 2005).

Nos résultats montrent de façon directe l'implication de NOX1 dans la régulation de la pression artérielle de base et aussi sous l'action de l'angiotensine II. Cependant, la phase aigue des 3 premiers jours d'infusion d'angiotensine II est indépendante de NOX1.

Le profil de pression artérielle rapporté par Matsuno et al, retrouve aussi une augmentation équivalente entre les souris WT (C57B6/J) et les souris déficientes pour NOX1 les 3 premiers jours d'infusion d'angiotensine II puis, un infléchissement des le 5ème jour pour une différence très nette entre les deux groupes le 7ème jour. Aucune donnée dans ces travaux ou dans les nôtres ne nous permet d'expliquer cette première phase d'hypertension indépendante de

NOX1. Il a toutefois été démontré qu'il existe une phase aiguë, établie à une douzaine d'heures, pendant laquelle l'angiotensine II exerce un effet vasopresseur indépendant des ERO (Kimura et al. 2004); Ce mécanisme indépendant des ERO serait permanent et présent même en cas d'infusion chronique d'angiotensine II (Kimura, Zhang et al. 2004).

Utilisant en résonance un modèle animal inverse, les résultats de Dikalova et al confirment le rôle clé de NOX1 dans la régulation de la pression artérielle puisque la surexpression de NOX1 dans la média entraîne une hypertension artérielle supérieure à celle des contrôles (souris C57B6/J) ; aucune donnée n'existe quant à la phase initiale de cette augmentation ne permettant pas de donner d'image en miroir à une phase d'hypertension artérielle indépendante de NOX1.

Une différence entre ces travaux et le notre concerne l'existence d'une différence de PAS de base entre les souris WT et déficientes pour NOX1 non retrouvée par Matsuno et col. Ce point peut être débattu mais au moins deux éléments de réponses expliquent ces résultats apparemment contradictoires : i) nous avons évalué la PAS de base chez 25 souris alors que l'équipe de Matsuno ne l'a réalisé que chez 8 à 9 souris ; compte tenu de la faible différence entre les deux groupes il est certain que par manque de puissance statistique il était impossible pour Matsuno et col de mettre en évidence une telle différence ; ii) l'âge des souris est très différent entre les deux études ; la pression artérielle variant en fonction de l'âge, les chiffres d'une étude réalisée chez des animaux de 8 à 12 semaines ne peuvent être comparés ceux d'une études réalisée chez des animaux de 12 à 30 semaines (médiane 20s). Argumentant cette hypothèse, les pressions artérielles de base de nos souris étaient nettement plus élevées que celles de l'étude de Matsuno et col (Matsuno, Yamada et al. 2005) ; il n'est pas non plus précisé s'ils avaient utilisé seulement des souris mâles comme dans notre travail.

En raison des méthodes de mesures des PA, toutes les données publiées ne concernent que la Pression artérielle systolique (PAS). Le concept récent qui se dégage concernant la pression artérielle est que la pression artérielle diastolique est une fonction des artères résistantes et que la pression artérielle systolique dépend des artères élastiques et donc de leur rigidité (principalement l'aorte) (Izzo 2004). Au vu de nos résultats et puisque NOX2 s'exprime plus au niveau des artères résistantes et NOX1 dans l'aorte et les artères élastiques, il reste important à déterminer en quoi NOX2 peut participer à la régulation de la PAD.

Enfin, il faut noter que ces 2 travaux apportent une réponse à deux questions que nous n'avons pas abordé concernant le rôle de NOX1 dans la régulation la pression artérielle: i) la chronicité de la différence est retrouvée dans les deux études :Matsuno et al et Dikalova et al montrent chacun dans leur modèle que la différence entre les contrôles et les souris génétiquement modifiées perdurent au moins 14 jours (Dikalova, Clempus et al. 2005;

Matsuno, Yamada et al. 2005); ii) La possibilité d'une hypertrophie de la média directement dépendante du stress mécanique induit par l'hyperpression artérielle est abordé par Dikalova et al ; ils montrent que le médiateur de l'hypertrophie est bien la production d'ERO puisque le Tempol diminue cette hypertrophie. La question n'est pas complètement élucidée car le stress mécanique lui même est susceptible d'activer une production d'ERO (Zalba, San Jose et al. 2001; Griendling 2004). En conséquence des modèles d'hypertension artérielle indépendante d'une activation des NOX sont nécessaires.

B. NOX1 et dissection aortique

Montrer que NOX1 est impliqué dans la survenue de dissections aortiques est nouveau et inattendu; Des études récentes ont en effet montré que l'angiotensine II peut induire des anévrysmes et des dissections aortiques non seulement chez les souris sensibilisées telles que les souris Apoe-/- mais aussi chez les C57B6/J (Deng, Martin-McNulty et al. 2003; Daugherty and Cassis 2004). Ces modèles ont aussi montré que les dissections aortiques a minima précédent les anévrysmes (Saraff et al. 2003).

Les mécanismes conduisant à la formation d'anévrysmes et de dissection sous angiotensine II incluent (Daugherty and Cassis 2004): i) une infiltration mono-macrophagique précoce de la média (J2) se co-localisant à des ruptures des fibres élastiques , ii) activation de protéases, en particulier l'équilibre métalloproteases (MMP) et inhibiteurs des métalloprotéases (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) (Luchtefeld, Grote et al. 2005), iii) une réponse de type fibrotique (Daugherty and Cassis 2004). Puisque la production et l'expression de la protéine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 (Marumo et al. 1997) et la réponse fibrotique vasculaire (Touyz et al. 2003) sont médiées par des ERO, il existe une base mécanistique soutenant l'hypothèse que NOX1 participe à la pathogénie des dissections aortiques. Les ERO ont en outre été récemment mis directement en cause dans la survenue d'anévrysmes (Miller et al. 2002; Gavrila et al. 2005) et de dissections aortiques (Ejiri et al. 2003) rendant potentiel le rôle des NOX dans cette pathologie. En effet, Gavrila et col ont démontré l'effet protecteur de la vitamine E vis à vis des anévrysmes et de leurs ruptures (Gavrila, Li et al. 2005). En parallèle, dans des anévrysmes humains, les sous unités $P22^{phox}$ et $P47^{phox}$ apparaissent surexprimées de façon corollaire à l'augmentation de la production d'ERO au niveau de la média (Miller, Sharp et al. 2002). Dans une autre étude du même type Ejeri et al confirme l'association entre surexpression de $P22^{phox}$, présence de l'anévrysme

thoracique et production d'ERO (Ejiri, Inoue et al. 2003). Aucun mécanisme initial n'est cependant dégagé.

Les analyses de la puce ADN et des PCR quantitatives faisant apparaître que le gène procollagène III a tendance à être moins exprimé chez les souris déficientes pour NOX1 entraîne une complexité supplémentaire ; en effet, l'absence de collagène III dans la média est habituellement associée à une augmentation du risque de dissection aortique (Rahhkonen et al. 2004).

Aucune de nos données exploitées ne permet de définir par quel mécanisme NOX1 peut intervenir mais compte tenu du rôle de NOX1 dans les modifications de la matrice extracellulaire, il serait intéressant de rechercher son implication dans l'activation des MMP et des TIMPs. Des données concernant les fibres élastiques telles que tailles, structures, liens avec les autres structures (CMLV) devraient être obtenues par microscopie électronique.

C. Rôle de NOX1 dans le remodelage vasculaire induit par l'angiotensine II

Nos résultats montrent que, sous angiotensine II, des mécanismes dépendants et indépendants de NOX1 conduisent à l'augmentation de l épaisseur de la média puisque, d'une part, nous retrouvons une hypertrophie de la média significative chez les souris déficientes pour NOX1 et que d'autre part elle est significativement moins importante que chez les souris contrôles. Les mécanismes indépendants de NOX1 peuvent être aussi dépendant des ERO via d'autres enzymes productrices d'ERO ou indépendant des ERO. Il faut noter ici, que nous n'avons pas trouvé de surexpression de NOX2 et NOX4 pour expliquer une production d'ERO indépendant de NOX1.

L'angiotensine II entraîne une augmentation de l'épaisseur de la media par 3 mécanismes bien déterminés: la prolifération cellulaire, l'hypertrophie des CMLV et l'accumulation de la MEC (Ruiz-Ortega, Lorenzo et al. 2001). Des données *in vitro* ont suggéré l'implication de NOX1 dans la prolifération cellulaire des CMLV (Suh, Arnold et al. 1999; Lassegue, Sorescu et al. 2001). Nos résultats, à l'opposée, suggèrent que NOX1 n'intervient pas dans la prolifération cellulaire tout au moins dans le système vasculaire. Nous montrons par contre que NOX1 est impliqué dans l'hypertrophie media via l'accumulation de MEC mais cette observation n'est pas confirmée par celle de Matsuno et col sur leur souris déficientes pour

NOX1 (Matsuno, Yamada et al. 2005). Plusieurs arguments plaident pourtant en faveur de nos résultats :

i) les quelques différences de protocole entre Matsuno et col et nous peuvent expliquer ces résultats contradictoires. Les 2 arguments déjà avancés plus haut peuvent expliquer cette différence : l'âge jeune des souris (à peine adulte) d'une part et le faible nombre de souris d'autre part peuvent avoir empêché de montrer une différence de l'ordre de quelques dizaines de μm^2 entre les deux groupes. Les surfaces des média mesurées sont d'ailleurs très petites comparativement à celles retrouvées chez nos souris. Enfin, la dose quotidienne d'angiotensine II délivrée était un peu plus de trois fois inférieure dans le protocole de Matsuno et col. L'angiotensine II ayant un effet dose dépendant (Daugherty and Cassis 2004).

ii) il existe une discordance entre l'absence d'hypertrophie et les résultats *in vitro* dont ceux de l'équipe de Matsuno et col, iii) Dikalova et al montrent que les souris surexprimant NOX1 ont une hypertrophie de la média supérieure à celle de leurs souris contrôles. L'ensemble de ces données suggèrent donc un effet réel de NOX1 sur le remodelage vasculaire (Dikalova, Clempus et al. 2005).

Les mécanismes explicatifs sont multiples : l'accumulation de MEC et l'absence de régulation génique évidente des gènes codant pour les protéines impliquées dans la régulation de la MEC suggèrent plus un mécanisme avec postraductionnel qu'une régulation génique. Une étude *in vitro* a d'ailleurs montré la nécessité des ERO dépendants des NOX pour obtenir une synthèse protéique sous angiotensine II et une autre la possibilité du rôle d'un crosslinking dépendant d'une NOX homologue (Edens et al. 2001).

L'interaction entre les fibres élastiques, la matrice extracellulaire et les cellules musculaires lisses vasculaires serait un déterminant de la rigidité artérielle (Laurent et al. 2005). Le fait que NOX1 participe à l'accumulation de la MEC dans un modèle d'hypertension systolique est un nouvel élément de compréhension des mécanismes de la rigidité artérielle La surexpression de la Thrombospondine-4 chez les souris déficientes pour NOX1, est dans le même ordre d'idée puisqu'il a été montré que la Thrombospondine-4 interagit entre le collagène et des protéines matricielles non collagène (Narouz-Ott et al. 2000) et qu'elle pourrait agir comme un adaptateur de l'assemblage de la matrice extracellulaire (Hamsten et al. 2003). Si un tel mécanisme se vérifie, la Thrombospondine-4 pourrait, chez les souris déficientes pour NOX1, être impliquée dans la prévention du remodelage de la MEC induit par l'angiotensine II. A un niveau épidémiologique, la Thrombospondine-4 a par ailleurs été associée à un bon état de santé cardio-vasculaire par opposition à certains de ses polymorphismes (McCarthy, Parker et al. 2004; Stenina, Byzova et al. 2004; Wessel et al. 2004).

D. NOX1, DDAH-1 et la voie du NO

La surexpression de la DDAH1 chez les souris déficientes pour NOX1 sous angiotensine II est un résultat inattendu apporté par l'analyse de la puce ADN et vérifié par la PCR quantitative. Nous ne retrouvons pas de régulation de DDAH1 chez les souris WT avec et sans angiotensine II alors qu'il existe une surexpression très nette chez les souris déficientes pour NOX1 recevant de l'angiotensine II. L'augmentation de DDAH1 au niveau protéique est vérifiée en méthode immunohistochimique démontrant qu'au niveau de la média, la DDAH1 est beaucoup plus présente chez les souris déficientes pour NOX1 sous angiotensine II. Ces résultats s'expliquent seulement par un mode de régulation particulier, identique à celui de la Thrombospondine-4. En effet, l'angiotensine II génère un signal qui augmente l'expression de DDAH1 mais qui doit être inhibé par l'activation concomitante de NOX1. La DDAH1 est la seule enzyme dégradant l'Asymetrical Dimethylarginine (ADMA) (Cooke 2004; Vallance et al. 2004) ; l'ADMA est un inhibiteur compétitif de la nitrite oxide synthase (NOS). NOS est l'enzyme qui permet la formation de NO à partir de L-arginine. La DDAH1 est donc un activateur indirect de la production de NO. En effet, chez les souris WT recevant de l'angiotensine II, le NO plasmatique chute (Mervaala et al. 2001) alors qu'il augmente chez les souris déficientes pour NOX1 soumises aux mêmes conditions (Fig. 27). Bien qu'il soit probable que l'augmentation de la biodisponibilité du NO soit dépendante de plusieurs autres mécanismes chez les souris déficientes pour NOX1, en particulier une diminution de la transformation de NO en NO3 par diminution de production de superoxydes (si absence de NOX1), nos résultats plaident pour une augmentation de la biodisponibilité du NO à travers un mécanisme régulateur plus complexe, la régulation de la DDAH1. Ainsi, dans certaines conditions d'oxydation faible (telle que dans la media de nos souris déficientes pour NOX1 (figure 16), la surexpression de DDAH1 par l'angiotensine II activerait un mécanisme antihypertenseur. Cette nouvelle voie entre NOX et NO s'ajoute au dialogue déjà complexe du NO et des ERO.

Conclusions et Perspectives

La construction d'un modèle animal transgénique déficient pour NOX1 nous a permis d'évaluer la fonction de NOX1 dans deux organes, le colon et le tissu vasculaire ; les deux hypothèses qui ont conduit ce travail se sont confirmées.

Les 3 expérimentations réalisées pour tester la fonction antimicrobienne de NOX1 montrent que NOX1 participe à cette fonction ; cependant, notre modèle à des limites qui nous empêche d'affirmer radicalement cette fonction. Il s'agit par contre d'un argument supplémentaire en faveur de cette fonction utilisant un modèle de travail original. Il semble évident que des méthodes différentes peuvent être utilisées pour confirmer cette fonction : nouvelles expérimentations animales avec des souris de fond génétique fortement homologue ; utilisation de modèle de quantification plus précis (utilisation de bactéries possédant des propriétés fluorecentes) ; *ex vivo,* l'étude de la perméabilité muqueuse telle qu'est peut être réalisée avec des chambre de Ussing ; recherche mécanistique sur des cultures primaires de colonocytes de souris déficientes pour NOX1 comparés à des souris WT.

NOX1 participe à la régulation de la pression artérielle et à la survenue de dissections aortiques induites par l'angiotensine II. NOX1 agit en favorisant l'accumulation de matrice extracellulaire, en régulant l'expression génique et en diminuant la biodisponibilité du NO.

De nombreux axes de recherche sont actuellement possible. Sur le plan moléculaire : i) la caractérisation de la qualité des fibres élastiques largement impliquées dans l'hytertension artérielle systoloique et dans la physiopathologie anévrysmale semble un des axes les plus importants, ii) Les liens entre les différentes molécules de la matrice extracellulaires, les CMLV et ces mêmes fibres en sont d'autres ;iii) la poursuite de l'analyse des voies de dialogue entre NO et ERO pousse à doser les dérivés nitrite/nitrate, les ADMA et mesurer l'activité de la DDAH1 dans notre modèle. Concernant la régulation génique de nombreux gènes interessants issus de la puce ADN restent à exploiter. Enfin, l'explicaton mécanistique du rôle d'une enzyme productrice d'ERO comme NOX1 dans les dissections aortiques reste à définir ; l'implication des MMP et des TIMPS semble potentiellement importante.

Sur le plan animal, des expérimentations *ex vivo* de mesure de la rigidité artérielle des gros vaisseaux affineraient la caractérisation physiopathologique de notre modèle ; De même, des experimentations utilisant des vasopresseurs indépendants des NOX pourraient permettre d'éliminer le rôle du stress mécanique dans l'hypertrophie de la média aortique.

Références

Abid, M. R., Z. Kachra, K. C. Spokes, et al. (2000). "NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration." *FEBS Lett* **486**(3): 252-6.

Agarwal, A., R. A. Saleh and M. A. Bedaiwy (2003). "Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction." *Fertil Steril* **79**(4): 829-43.

Ago, T., T. Kitazono, J. Kuroda, et al. (2005). "NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells." *Stroke* **36**(5): 1040-6.

Ambasta, R. K., P. Kumar, K. K. Griendling, et al. (2004). "Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase." *J Biol Chem* **279**(44): 45935-41.

Ameziane-El-Hassani, R., S. Morand, J. L. Boucher, et al. (2005). "Dual Oxidase-2 Has an Intrinsic Ca2+-dependent H2O2-generating Activity." *J Biol Chem* **280**(34): 30046-54.

Arbiser, J. L., J. Petros, R. Klafter, et al. (2002). "Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch." *Proceedings of the National Academy of Science USA* **99**(2): 715-720.

Arnold, R. S., J. Shi, E. Murad, et al. (2001). "Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Mox1." *Proceedings of the National Academy of Science USA* **98**(10): 5550-5555.

Axelsson, L. G., E. Landstrom, T. J. Goldschmidt, et al. (1996). "Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice." *Inflamm Res* **45**(4): 181-91.

Babior, B. M. (2000). "The NADPH oxidase of endothelial cells." *IUBMB Life* **50**(4-5): 267-9.

Babior, B. M., R. S. Kipnes and J. T. Curnutte (1973). "Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent." *J Clin Invest* **52**(3): 741-4.

Banfi, B., R. A. Clark, K. Steger, et al. (2003). "Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1." *Journal of Biological Chemistry* **278**(6): 3510-3513.

Banfi, B., B. Malgrange, J. Knisz, et al. (2004). "NOX3: A superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear." *J Biol Chem* **279**: 46065-46072.

Banfi, B., A. Maturana, S. Jaconi, et al. (2000). "A mammalian H+ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1." *Science* **287**(5450): 138-142.

Banfi, B., G. Molnar, A. Maturana, et al. (2001). "A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes." *Journal of Biological Chemistry* **276**(40): 37594-37601.

Beck, P. L., R. Xavier, J. Wong, et al. (2004). "Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**(1): G137-47.

Bengtsson, S. H., L. M. Gulluyan, G. J. Dusting, et al. (2003). "Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**(11): 849-54.

Berendes, H., R. A. Bridges and R. A. Good (1957). "A fatal granulomatosus of childhood: the clinical study of a new syndrome." *Minn Med* **40**(5): 309-12.

Brandes, R. P. and J. Kreuzer (2005). "Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation." *Cardiovasc Res* **65**(1): 16-27.

Brar, S. S., Z. Corbin, T. P. Kennedy, et al. (2003). "NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells." *American Journal of Physiology* **285**(2): C353-369.

Byrne, J. A., D. J. Grieve, J. K. Bendall, et al. (2003). "Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy." *Circ Res* **93**(9): 802-5.

Cai, H., K. K. Griendling and D. G. Harrison (2003). "The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases." *Trends Pharmacol Sci* **24**(9): 471-8.

Chamulitrat, W., R. Schmidt, P. Tomakidi, et al. (2003). "Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes." *Oncogene* **22**(38): 6045-53.

Chamulitrat, W., W. Stremmel, T. Kawahara, et al. (2004). "A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **122**(4): 1000-9.

Cheng, G., Z. Cao, X. Xu, et al. (2001). "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." *Gene* **269**(1-2): 131-140.

Chiarugi, P. (2005). "PTPs versus PTKs: the redox side of the coin." *Free Radic Res* **39**(4): 353-64.

Clark, R. A., T. K. Epperson and A. J. Valente (2004). "Mechanisms of activation of NADPH oxidases." *Jpn J Infect Dis* **57**(5): S22-3.

Cooke, J. P. (2004). "Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker?" *Circulation* **109**(15): 1813-8.

Cooper, H. S., S. N. Murthy, R. S. Shah, et al. (1993). "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis." *Lab Invest* **69**(2): 238-49.

Cross, A. R. and A. W. Segal (2004). "The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems." *Biochim Biophys Acta* **1657**(1): 1-22.

Daugherty, A. and L. Cassis (2004). "Angiotensin II-mediated development of vascular diseases." *Trends Cardiovasc Med* **14**(3): 117-20.

Daugherty, A. and L. A. Cassis (2004). "Mouse models of abdominal aortic aneurysms." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(3): 429-34. Epub 2004 Jan 22.

de Champlain, J., R. Wu, H. Girouard, et al. (2004). "Oxidative stress in hypertension." *Clin Exp Hypertens* **26**(7-8): 593-601.

De Deken, X., D. Wang, J. E. Dumont, et al. (2002). "Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H(2)O(2)-generating system." *Exp Cell Res* **273**(2): 187-96.

De Deken, X., D. Wang, M. C. Many, et al. (2000). "Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family." *Journal of Biological Chemistry* **275**(30): 23227-23233.

Deng, G. G., B. Martin-McNulty, D. A. Sukovich, et al. (2003). "Urokinase-type plasminogen activator plays a critical role in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm." *Circ Res* **92**(5): 510-7. Epub 2003 Feb 13.

Dieleman, L. A., M. J. Palmen, H. Akol, et al. (1998). "Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines." *Clin. Exp. Immunol.* **114**(3): 385-391.

Dieleman, L. A., B. U. Ridwan, G. S. Tennyson, et al. (1994). "Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice." *Gastroenterology* **107**(6): 1643-52.

Dikalova, A., R. Clempus, B. Lassegue, et al. (2005). "Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice." *Circulation* **112**(17): 2668-76.

Dikalova, A., R. Clempus, B. Lassègue, et al. (2005). "Nox1 Overexpression Potentiates Angiotensin II–Induced Hypertension and Vascular Smooth Muscle Hypertrophy in Transgenic Mice." *Circ Res* **112**: 2668-2672.

Dinauer, M. C. and S. H. Orkin (1992). "Chronic granulomatous disease." *Annu. Rev. Med.* **43**: 117-124.

Dinh, D. T., A. G. Frauman, C. I. Johnston, et al. (2001). "Angiotensin receptors: distribution, signalling and function." *Clin Sci (Lond)* **100**(5): 481-92.

Dupuy, C., R. Ohayon, A. Valent, et al. (1999). "Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas." *J Biol Chem* **274**(52): 37265-9.

Dupuy, C., R. Ohayon, A. Valent, et al. (1999). "Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas." *Journal of Biological Chemistry* **274**(52): 37265-37269.

Dupuy, C., M. Pomerance, R. Ohayon, et al. (2000). "Thyroid oxidase (THOX2) gene expression in the rat thyroid cell line FRTL-5." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **277**(2): 287-292.

Dupuy, C., A. Virion, R. Ohayon, et al. (1991). "Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane." *Journal of Biological Chemistry* **266**(6): 3739-3743.

Edens, W. A., L. Sharling, G. Cheng, et al. (2001). "Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox." *J Cell Biol* **154**(879-889.).

Ejiri, J., N. Inoue, T. Tsukube, et al. (2003). "Oxidative stress in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm: protective role of statin and angiotensin II type 1 receptor blocker." *Cardiovasc Res* **59**(4): 988-96.

Ellmark, S. H., G. J. Dusting, M. N. Fui, et al. (2005). "The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle." *Cardiovasc Res* **65**(2): 495-504.

Elrod, J. W., F. S. Laroux, J. Houghton, et al. (2005). "DSS-induced colitis is exacerbated in STAT-6 knockout mice." *Inflamm Bowel Dis* **11**(10): 883-9.

Fan, C., M. Katsuyama, T. Nishinaka, et al. (2005). "Transactivation of the EGF receptor and a PI3 kinase-ATF-1 pathway is involved in the upregulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase." *FEBS Lett* **579**(5): 1301-5.

Forman, H. J. and M. Torres (2002). "Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling." *Am J Respir Crit Care Med* **166**(12 Pt 2): S4-8.

Fortemaison, N., F. Miot, J. E. Dumont, et al. (2005). "Regulation of H2O2 generation in thyroid cells does not involve Rac1 activation." *Eur J Endocrinol* **152**(1): 127-33.

Fortuno, A., G. S. Jose, M. U. Moreno, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular remodelling." *Exp Physiol* **90**(4): 457-62.

Fukata, M., K. S. Michelsen, R. Eri, et al. (2005). "Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**(5): G1055-65.

Fukui, T., M. Yoshiyama, A. Hanatani, et al. (2001). "Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction." *Biochem Biophys Res Commun* **281**(5): 1200-6.

Fukuyama, M., K. Rokutan, T. Sano, et al. (2005). "Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon." *Cancer Lett* **221**(1): 97-104.

Gavazzi, G., B. Banfi, C. Deffert, et al. (2006). "Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice." *FEBS Lett* **580**(2): 497-504.

Gavrila, D., W. G. Li, M. L. McCormick, et al. (2005). "Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**(8): 1671-7. Epub 2005 Jun 2.

Geiszt, M., J. B. Kopp, P. Varnai, et al. (2000). "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney." *Proceedings of the National Academy of Science USA* **97**(14): 8010-8014.

Geiszt, M., K. Lekstrom, S. Brenner, et al. (2003). "NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes." *J Immunol* **171**(1): 299-306.

Geiszt, M., K. Lekstrom and T. L. Leto (2004). "Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant." *J Biol Chem* **279**(49): 51661-8.

Geiszt, M., K. Lekstrom, J. Witta, et al. (2003). "Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells." *Journal of Biological Chemistry* **278**(22): 20006-20012.

Geiszt, M. and T. L. Leto (2004). "The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond." *J Biol Chem* **279**(50): 51715-8.

Geiszt, M., J. Witta, J. Baffi, et al. (2003). "Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense." *Faseb J* **17**(11): 1502-4.

Glebov, O. K., L. M. Rodriguez, K. Nakahara, et al. (2003). "Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**(8): 755-62.

Gorin, Y., K. Block, J. Hernandez, et al. (2005). "Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney." *J Biol Chem*.

Griendling, K. K. (2004). "Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system." *Heart* **90**(5): 491-3.

Griendling, K. K. and G. A. FitzGerald (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies." *Circulation* **108**(17): 2034-40.

Griendling, K. K., D. Sorescu and M. Ushio-Fukai (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." *Circ Res* **86**(5): 494-501.

Griffin, S. A., W. C. Brown, F. MacPherson, et al. (1991). "Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism." *Hypertension* **17**(5): 626-35.

Grisham, M. B. (1994). "Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease." *Lancet* **344**(8926): 859-61.

Hamsten, A. and P. Eriksson (2003). "Thrombospondins and premature coronary artery disease: time to go beyond genotype-phenotype association studies." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(1): 6-7.

Hancock, J. T., R. Desikan and S. J. Neill (2001). "Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 2): 345-50.

Hattori, Y., K. Akimoto, S. S. Gross, et al. (2005). "Angiotensin-II-induced oxidative stress elicits hypoadiponectinaemia in rats." *Diabetologia* **48**(6): 1066-74.

Heistad, D. D. (2006). "Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**(4): 689-95. Epub 2006 Jan 12.

Hendrickson, B. A., R. Gokhale and J. H. Cho (2002). "Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease." *Clin Microbiol Rev* **15**(1): 79-94.

Higashi, M., H. Shimokawa, T. Hattori, et al. (2003). "Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system." *Circ Res* **93**(8): 767-75.

Hilenski, L. L., R. E. Clempus, M. T. Quinn, et al. (2004). "Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(4): 677-83.

Holmes, B., A. R. Page and R. A. Good (1967). "Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function." *Journal of Clinical Investigation* **46**(9): 1422-1432.

Hubbell, E., W. M. Liu and R. Mei (2002). "Robust estimators for expression analysis." *Bioinformatics* **18**(12): 1585-92.

Hwang, J., M. H. Ing, A. Salazar, et al. (2003). "Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation." *Circ Res* **93**(12): 1225-32.

Intengan, H. D. and E. L. Schiffrin (2001). "Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis." *Hypertension* **38**(3 Pt 2): 581-7.

Irani, K. (2000). "Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling." *Circ Res* **87**(3): 179-83.

Izzo, J. L., Jr. (2004). "Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome." *Curr Opin Cardiol* **19**(4): 341-52.

Janiszewski, M., L. R. Lopes, A. O. Carmo, et al. (2005). "Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem*.

Johns, C., I. Gavras, D. E. Handy, et al. (1996). "Models of experimental hypertension in mice." *Hypertension* **28**(6): 1064-9.

Katsuyama, M., C. Fan and C. Yabe-Nishimura (2002). "NADPH oxidase is involved in prostaglandin F2alpha -induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: Induction of NOX1 by PGF2alpha." *J Biol Chem* **277**(16): 13438-42.

Kawahara, T., M. Kohjima, Y. Kuwano, et al. (2005). "Helicobacter pylori lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer NOXO1 in guinea pig gastric mucosal cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(2): C450-7.

Kawahara, T., Y. Kuwano, S. Teshima-Kondo, et al. (2001). "Toll-like receptor 4 regulates gastric pit cell responses to Helicobacter pylori infection." *J Med Invest* **48**(3-4): 190-7.

Kawahara, T., Y. Kuwano, S. Teshima-Kondo, et al. (2004). "Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells." *J Immunol* **172**(5): 3051-8.

Kawahara, T., S. Teshima, A. Oka, et al. (2001). "Type I Helicobacter pylori lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells." *Infect Immun* **69**(7): 4382-9.

Kikuchi, H., M. Hikage, H. Miyashita, et al. (2000). "NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells." *Gene* **254**(1-2): 237-243.

Kimura, S., G. X. Zhang, Y. Nagai, et al. (2004). "Time-dependent transition of tempol-sensitive reduction of blood pressure in angiotensin II-induced hypertension." *J Hypertens.* **22**(11): 2161-8.

Kitajima, S., M. Morimoto and E. Sagara (2002). "A model for dextran sodium sulfate (DSS)-induced mouse colitis: bacterial degradation of DSS does not occur after incubation with mouse cecal contents." *Exp Anim* **51**(2): 203-6.

Kitajima, S., M. Morimoto, E. Sagara, et al. (2001). "Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice." *Exp Anim* **50**(5): 387-95.

Klebanoff, S. J. (1970). "Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes." *Science* **169**(950): 1095-7.

Klebanoff, S. J. (1980). "Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes." *Ann Intern Med* **93**(3): 480-9.

Kobayashi, S., Y. Nojima, M. Shibuya, et al. (2004). "Nox1 regulates apoptosis and potentially stimulates branching morphogenesis in sinusoidal endothelial cells." *Exp Cell Res* **300**(2): 455-62.

Koh, A. Y., G. P. Priebe and G. B. Pier (2005). "Virulence of Pseudomonas aeruginosa in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia." *Infect Immun* **73**(4): 2262-72.

Kolios, G., V. Valatas and S. G. Ward (2004). "Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle." *Immunology* **113**(4): 427-37.

Kopke, R. D., W. Liu, R. Gabaizadeh, et al. (1997). "Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells." *Am J Otol* **18**(5): 559-71.

Krieglstein, C. F., W. H. Cerwinka, F. S. Laroux, et al. (2001). "Role of appendix and spleen in experimental colitis." *J Surg Res* **101**(2): 166-75.

Krieglstein, C. F., W. H. Cerwinka, F. S. Laroux, et al. (2001). "Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide." *J Exp Med* **194**(9): 1207-18.

Kuwano, Y., T. Kawahara, H. Yamamoto, et al. (2005). "Interferon-{gamma} activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and up-regulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol*.

Lambeth, J. D. (2002). "Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases." *Current Opinion in Hematology* **9**(1): 11-17.

Lambeth, J. D. (2004). "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." *Nat Rev Immunol* **4**(3): 181-9.

Lambeth, J. D., G. Cheng, R. S. Arnold, et al. (2000). "Novel homologs of gp91phox." *Trends in Biochemical Sciences* **25**(10): 459-461.

Landmesser, U., H. Cai, S. Dikalov, et al. (2002). "Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II." *Hypertension* **40**(4): 511-5.

Lassegue, B. and R. E. Clempus (2003). "Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**(2): R277-97.

Lassegue, B. and K. K. Griendling (2004). "Reactive oxygen species in hypertension; An update." *Am J Hypertens* **17**(9): 852-60.

Lassegue, B., D. Sorescu, K. Szocs, et al. (2001). "Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin
II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways." *Circulation Research* **88**(9): 888-894.

Laude, K., H. Cai, B. Fink, et al. (2005). "Hemodynamic and biochemical adaptations to vascular smooth muscle overexpression of p22phox in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(1): H7-12.

Laurent, A., C. Nicco, C. Chereau, et al. (2005). "Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species." *Cancer Res* **65**(3): 948-56.

Laurent, S., P. Boutouyrie and P. Lacolley (2005). "Structural and genetic bases of arterial stiffness." *Hypertension* **45**(6): 1050-5. Epub 2005 Apr 25.

Lavigne, M. C., H. L. Malech, S. M. Holland, et al. (2001). "Genetic demonstration of p47phox-dependent superoxide anion production in murine vascular smooth muscle cells." *Circulation* **104**(1): 79-84.

Lee, Y. S., Y. S. Kang, J. S. Lee, et al. (2004). "Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apototic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells." *Free Radic Res* **38**(4): 405-12.

Leseney, A. M., D. Deme, O. Legue, et al. (1999). "Biochemical characterization of a Ca2+/NAD(P)H-dependent H2O2 generator in human thyroid tissue." *Biochimie* **81**(4): 373-80.

Li, L., J. C. Mamputu, N. Wiernsperger, et al. (2005). "Signaling pathways involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and matrix metalloproteinase-2 expression induced by leptin: inhibitory effect of metformin." *Diabetes* **54**(7): 2227-34.

Li, S. L., A. J. Valente, M. Qiang, et al. (2002). "Multiple PU.1 sites cooperate in the regulation of p40(phox) transcription during granulocytic differentiation of myeloid cells." *Blood* **99**(12): 4578-87.

Lien, L. L., Y. Lee and S. H. Orkin (1997). "Regulation of the myeloid-cell-expressed human gp91-phox gene as studied by transfer of yeast artificial chromosome clones into embryonic stem cells: suppression of a variegated cellular pattern of expression requires a full complement of distant cis elements." *Mol Cell Biol* **17**(4): 2279-90.

Lim, S. D., C. Sun, J. D. Lambeth, et al. (2005). "Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer." *Prostate* **62**(2): 200-7.

Liu, J., F. Yang, X. P. Yang, et al. (2003). "NAD(P)H oxidase mediates angiotensin II-induced vascular macrophage infiltration and medial hypertrophy." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(5): 776-82.

Liu, W. M., R. Mei, X. Di, et al. (2002). "Analysis of high density expression microarrays with signed-rank call algorithms." *Bioinformatics* **18**(12): 1593-9.

Luchtefeld, M., K. Grote, C. Grothusen, et al. (2005). "Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner." *Biochem Biophys Res Commun* **328**(1): 183-8.

Mahadev, K., H. Motoshima, X. Wu, et al. (2004). "The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H2O2 and plays an integral role in insulin signal transduction." *Mol Cell Biol* **24**(5): 1844-54.

Mahler, M., I. J. Bristol, E. H. Leiter, et al. (1998). "Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis." *Am J Physiol* **274**(3 Pt 1): G544-51.

Martyn, K. D., L. M. Frederick, K. von Loehneysen, et al. (2005). "Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases." *Cell Signal* **28**: 28.

Marumo, T., V. B. Schini-Kerth, B. Fisslthaler, et al. (1997). "Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells." *Circulation* **96**(7): 2361-7.

Matsuno, K., H. Yamada, K. Iwata, et al. (2005). "Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice." *Circulation* **112**(17): 2677-85.

McCarthy, J. J., A. Parker, R. Salem, et al. (2004). "Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes." *J Med Genet* **41**(5): 334-41.

McFadden, S. L., D. Ding, A. G. Reaume, et al. (1999). "Age-related cochlear hair cell loss is enhanced in mice lacking copper/zinc superoxide dismutase." *Neurobiol Aging* **20**(1): 1-8.

McKenzie, S. J., M. S. Baker, G. D. Buffinton, et al. (1996). "Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease." *J Clin Invest* **98**(1): 136-41.

Mervaala, E. M., Z. J. Cheng, I. Tikkanen, et al. (2001). "Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes." *Hypertension* **37**(2 Part 2): 414-8.

Miller, F. J., W. J. Sharp, X. Fang, et al. (2002). "Oxidative Stress in Human Abdominal Aortic Aneurysms, A Potential Mediator of Aneurysmal Remodeling." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **22**: 560-565.

Miyazaki, S., T. Fujikawa, I. Kobayashi, et al. (2001). "Development of systemic bacteraemia after oral inoculation of vancomycin-resistant enterococci in mice." *J Med Microbiol* **50**(8): 695-701.

Mollnau, H., M. Wendt, K. Szocs, et al. (2002). "Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling." *Circ Res* **90**(4): E58-65.

Morazzani, M., D. D. de Carvalho, H. Kovacic, et al. (2004). "Monolayer versus aggregate balance in survival process for EGF-induced apoptosis in A431 carcinoma cells: Implication of ROS-P38 MAPK-integrin alpha2beta1 pathway." *Int J Cancer* **110**(6): 788-99.

Mori, M., K. Y. Stokes, T. Vowinkel, et al. (2005). "Colonic blood flow responses in experimental colitis: time course and underlying mechanisms." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**(6): G1024-9.

Morteau, O., S. G. Morham, R. Sellon, et al. (2000). "Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2." *J Clin Invest* **105**(4): 469-78.

Mourelle, M., A. Salas, F. Guarner, et al. (1998). "Stimulation of transforming growth factor beta1 by enteric bacteria in the pathogenesis of rat intestinal fibrosis." *Gastroenterology* **114**(3): 519-26.

Mueller, C. F., K. Laude, J. S. McNally, et al. (2005). "ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(2): 274-8. Epub 2004 Oct 28.

Nakamura, Y., R. Makino, T. Tanaka, et al. (1991). "Mechanism of H2O2 production in porcine thyroid cells: evidence for intermediary formation of superoxide anion by NADPH-dependent H2O2-generating machinery." *Biochemistry* **30**(20): 4880-4886.

Nakamura, Y., S. Ohtaki, R. Makino, et al. (1989). "Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in porcine thyroid plasma membrane." *J Biol Chem* **264**(9): 4759-61.

Narouz-Ott, L., P. Maurer, D. P. Nitsche, et al. (2000). "Thrombospondin-4 binds specifically to both collagenous and non-collagenous extracellular matrix proteins via its C-terminal domains." *J Biol Chem* **275**(47): 37110-7.

Newburger, P. E., R. A. Ezekowitz, C. Whitney, et al. (1988). "Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14): 5215-9.

Ohtsuka, Y. and I. R. Sanderson (2003). "Dextran sulfate sodium-induced inflammation is enhanced by intestinal epithelial cell chemokine expression in mice." *Pediatr Res* **53**(1): 143-7.

Paffenholz, R., R. A. Bergstrom, F. Pasutto, et al. (2004). "Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase." *Genes Dev* **18**(5): 486-91.

Pedruzzi, E., C. Guichard, V. Ollivier, et al. (2004). "NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells." *Mol Cell Biol* **24**(24): 10703-17.

Perner, A., L. Andresen, G. Pedersen, et al. (2003). "Superoxide production and expression of NAD(P)H oxidases by transformed and primary human colonic epithelial cells." *Gut* **52**(2): 231-6.

Podolsky, D. K. (2002). "The current future understanding of inflammatory bowel disease." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **16**(6): 933-43.

Quie, P. G., J. G. White, B. Holmes, et al. (1967). "In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood." *J Clin Invest* **46**(4): 668-79.

Rahhkonen, O., M. Su , H. Hakovirta, et al. (2004). "MIce with a deletion in the first intron Of the *Colla1* Gene develop Age Dependent Aortic Dissecton and rupture." *Circ Res* **94**: 83-90.

Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, et al. (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* **118**(2): 229-41.

Rath, H. C., M. Schultz, R. Freitag, et al. (2001). "Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice." *Infect. Immun.* **69**(4): 2277-2285.

Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, et al. (2002). "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K+ flux." *Nature* **416**(6878): 291-7.

Reeves, E. P., M. Nagl, J. Godovac-Zimmermann, et al. (2003). "Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophil granulocyte." *J Med Microbiol* **52**(Pt 8): 643-51.

Rossi, F. and M. Zatti (1964). "Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells." *Experientia* **20**(1): 21-3.

Royer-Pokora, B., L. M. Kunkel, A. P. Monaco, et al. (1986). "Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location." *Nature* **322**(6074): 32-8.

Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, M. Ruperez, et al. (2001). "Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field." *Hypertension* **38**(6): 1382-7.

Sadlack, B., H. Merz, H. Schorle, et al. (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." *Cell* **75**(2): 253-61.

Saito, Y. and B. C. Berk (2002). "Angiotensin II-mediated signal transduction pathways." *Curr Hypertens Rep* **4**(2): 167-71.

Salles, N., I. Szanto, F. Herrmann, et al. (2005). "Expression of mRNA for ROS-generating NADPH oxidases in the aging stomach." *Exp Gerontol* **40**(4): 353-7.

Saraff, K., F. Babamusta, L. A. Cassis, et al. (2003). "Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(9): 1621-6. Epub 2003 Jul 10.

Schoneich, C. (1999). " Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach." *Exp Gerontol* **34.**(1): 19-34.

Segal, A. W. and O. T. Jones (1978). "Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes." *Nature* **276**(5687): 515-7.

Segal, A. W., O. T. Jones, D. Webster, et al. (1978). "Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease." *Lancet* **2**(8087): 446-9.

Sellon, R. K., S. Tonkonogy, M. Schultz, et al. (1998). "Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice." *Infect Immun* **66**(11): 5224-31.

Serrano, F., N. S. Kolluri, F. B. Wientjes, et al. (2003). "NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain." *Brain Res* **988**(1-2): 193-8.

Shiose, A., J. Kuroda, K. Tsuruya, et al. (2001). "A Novel Superoxide-producing NAD(P)H Oxidase in Kidney." *Journal of Biological Chemistry* **276**(2): 1417-1423.

Simon, G. (2004). "Pathogenesis of structural vascular changes in hypertension." *J Hypertens* **22**(1): 3-10.

Sorescu, D., D. Weiss, B. Lassegue, et al. (2002). "Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis." *Circulation* **105**(12): 1429-35.

Sorescu, G. P., H. Song, S. L. Tressel, et al. (2004). "Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase." *Circ Res* **95**(8): 773-9.

Stenina, O. I., T. V. Byzova, J. C. Adams, et al. (2004). "Coronary artery disease and the thrombospondin single nucleotide polymorphisms." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(6): 1013-30.

Strober, W., I. J. Fuss and R. S. Blumberg (2002). "The immunology of mucosal models of inflammation." *Annu Rev Immunol* **20**: 495-549.

Sturrock, A., B. Cahill, K. Norman, et al. (2005). "Transforming Growth Factor {beta}1 Induces Nox 4 NAD(P)H Oxidase and Reactive Oxygen Species-Dependent Proliferation in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.

Suh, Y. A., R. S. Arnold, B. Lassegue, et al. (1999). "Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1." *Nature* **401**(6748): 79-82.

Suliman, H. B., M. Ali and C. A. Piantadosi (2004). "Superoxide dismutase-3 promotes full expression of the EPO response to hypoxia." *Blood* **104**(1): 43-50.

Sumimoto, H., K. Miyano and R. Takeya (2005). "Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases." *Biochem Biophys Res Commun*.

Suzuki, S., A. Kumatori, I. A. Haagen, et al. (1998). "PU.1 as an essential activator for the expression of gp91(phox) gene in human peripheral neutrophils, monocytes, and B lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6085-90.

Szanto, I., L. Rubbia-Brandt, P. Kiss, et al. (2005). "Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease." *J Pathol* **207**(2): 164-176.

Szocs, K., B. Lassegue, D. Sorescu, et al. (2002). "Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **22**(1): 21-27.

Takeya, R. and H. Sumimoto (2003). "Molecular mechanism for activation of Superoxide-producing NADPH oxidases." *Mol Cell* **16**(3): 271-277.

Takeya, R., N. Ueno, K. Kami, et al. (2003). "Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases." *Journal of Biological Chemistry* **278**(27): 25234-25246.

Tanito, M., H. Nakamura, Y. W. Kwon, et al. (2004). "Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats." *Antioxid Redox Signal* **6**(1): 89-97.

Tarpey, M. M. and I. Fridovich (2001). "Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and
peroxynitrite." *Circulation Research* **89**(3): 224-236.

Taylor, W. R., D. T. Jones and A. W. Segal (1993). "A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain." *Protein Sci* **2**(10): 1675-85.

Teahan, C., P. Rowe, P. Parker, et al. (1987). "The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245." *Nature* **327**(6124): 720-721.

Tejada-Simon, M. V., F. Serrano, L. E. Villasana, et al. (2005). "Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus." *Mol Cell Neurosci* **29**(1): 97-106.

Tessner, T. G., S. M. Cohn, S. Schloemann, et al. (1998). "Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice." *Gastroenterology* **115**(4): 874-82.

Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (1995). "Activation of an H2O2-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1." *J Biol Chem* **270**(51): 30334-8.

Tlaskalova, H., J. Rejnek, J. Travnicek, et al. (1970). "The effect of antibodies present in the intestinal tract of germfree piglets on the infection caused by the intravenous

administration of the pathogenic strain Escherichia coli 055." *Folia Microbiol (Praha)* **15**(5): 372-6.

Touyz, R. M., X. Chen, F. Tabet, et al. (2002). "Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II." *Circ Res* **90**(11): 1205-13.

Touyz, R. M., C. Mercure, Y. He, et al. (2005). "Angiotensin II-dependent chronic hypertension and cardiac hypertrophy are unaffected by gp91phox-containing NADPH oxidase." *Hypertension* **45**(4): 530-7. Epub 2005 Mar 7.

Touyz, R. M., F. Tabet and E. L. Schiffrin (2003). "Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**(11): 860-6.

Tulis, D. A., Z. H. Mnjoyan, R. L. Schiesser, et al. (2003). "Adenoviral gene transfer of fortilin attenuates neointima formation through suppression of vascular smooth muscle cell proliferation and migration." *Circulation* **107**(1): 98-105.

Ushio-Fukai, M. and R. W. Alexander (2004). "Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase." *Mol Cell Biochem* **264**(1-2): 85-97.

Ushio-Fukai, M., Y. Tang, T. Fukai, et al. (2002). "Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis." *Circ Res* **91**(12): 1160-7.

Vallance, P. and J. Leiper (2004). "Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(6): 1023-30. Epub 2004 Apr 22.

Vallet, P., Y. Charnay, K. Steger, et al. (2005). "Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia." *Neuroscience* **132**(2): 233-8.

Van Buul, J. D., M. Fernandez-Borja, E. C. Anthony, et al. (2005). "Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells." *Antioxid Redox Signal* **7**(3-4): 308-17.

Verweij, C. L. and S. I. Gringhuis (2002). "Oxidants and tyrosine phosphorylation: role of acute and chronic oxidative stress in T-and B-lymphocyte signaling." *Antioxid Redox Signal* **4**(3): 543-51.

Videla, S., J. Vilaseca, F. Guarner, et al. (1994). "Role of intestinal microflora in chronic inflammation and ulceration of the rat colon." *Gut* **35**(8): 1090-7.

Vignais, P. V. (2002). "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism." *Cell Mol Life Sci* **59**(9): 1428-59.

Vowinkel, T., T. J. Kalogeris, M. Mori, et al. (2004). "Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis." *Dig Dis Sci* **49**(4): 556-64.

Wallace, T. L., V. Paetznick, P. A. Cossum, et al. (1997). "Activity of liposomal nystatin against disseminated Aspergillus fumigatus infection in neutropenic mice." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(10): 2238-43.

Wang, D., X. De Deken, M. Milenkovic, et al. (2005). "Identification of a novel partner of duox: EFP1, a thioredoxin-related protein." *J Biol Chem* **280**(4): 3096-103.

Wang, H. and I. E. Kochevar (2005). "Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF-beta biosynthesis and activation in keratinocytes." *Free Radic Biol Med* **38**(7): 890-7.

Wang, H. D., D. G. Johns, S. Xu, et al. (2002). "Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(5): H1697-702.

Wang, H. D., S. Xu, D. G. Johns, et al. (2001). "Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice." *Circ Res* **88**(9): 947-53.

Wartenberg, M., E. Hoffmann, H. Schwindt, et al. (2005). "Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids." *FEBS Lett* **579**(20): 4541-4549.

Wessel, J., E. J. Topol, M. Ji, et al. (2004). "Replication of the association between the thrombospondin-4 A387P polymorphism and myocardial infarction." *Am Heart J* **147**(5): 905-9.

Wiest, R. and H. C. Rath (2003). "Bacterial translocation in the gut." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**(3): 397-425.

Wingler, K., S. Wunsch, R. Kreutz, et al. (2001). "Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo." *Free Radical Biology and Medicine* **31**(11): 1456-1464.

Wong, J. L., R. Creton and G. M. Wessel (2004). "The oxidative burst at fertilization is dependent upon activation of the dual oxidase Udx1." *Dev Cell* **7**(6): 801-14.

Yamasoba, T., A. L. Nuttall, C. Harris, et al. (1998). "Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss." *Brain Res* **784**(1-2): 82-90.

Yang, S., P. Madyastha, W. Ries, et al. (2002). "Characterization of interferon gamma receptors on osteoclasts: effect of interferon gamma on osteoclastic superoxide generation." *J Cell Biochem* **84**(3): 645-54.

Yang, S., Y. Zhang, W. Ries, et al. (2004). "Expression of Nox4 in osteoclasts." *J Cell Biochem* **92**(2): 238-48.

Zalba, G., G. San Jose, M. U. Moreno, et al. (2001). "Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase." *Hypertension* **38**(6): 1395-9.

ANNEXE 1

Article Publié