

Université de Montréal

**GLP, une nouvelle protéine associée au récepteur AT1, induit de l'hypertrophie
dans les cellules du tubule proximal du rein de rat.**

Par
Valérie Tardif

Département de médecine
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade M.Sc.
en Sciences biomédicales

Août, 2004

© Valérie Tardif, 2004



W

4

U58

2005

V. 036

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
GLP, une nouvelle protéine associée au récepteur AT1, induit de l'hypertrophie dans les
cellules du tubule proximal du rein de rat.

Présenté par :
Valérie Tardif

11615540

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Johanne Tremblay
Président-rapporteur

Dr. Deng-Fu Guo
Directeur de recherche

Dr. Janos Filep, M.D.
Membre du jury

Résumé en français

Le système rénine-angiotensine joue un rôle important dans plusieurs pathologies dont l'hypertension et les maladies rénales. L'angiotensine II (ang II) stimule l'hypertrophie dans différents types cellulaires dont les cellules du tubule proximal rénal et mène à des dommages rénaux. L'ang II agit à travers deux récepteurs, AT1 et AT2, toutefois le mécanisme moléculaire impliquant l'induction d'hypertrophie cellulaire par l'ang II n'est pas clair. Une nouvelle protéine, GLP, associée au récepteur AT1 de l'angiotensine a été identifiée. Des résultats obtenus par cytométrie de flux, incorporation de [³H]-leucine et contenu en protéines totales, ont démontré que la surexpression du gène GLP induit de l'hypertrophie dans les cellules du muscle lisse vasculaire (VSMCs) et les cellules immortalisées du tubule proximal de rein (IRPTCs). L'expression de l'ARNm de GLP est stimulée par l'ang II d'une manière dépendante du temps, de la dose et du récepteur AT1. Des analyses avec des inhibiteurs spécifiques ont indiqué que plusieurs voies de signalisation règlent l'expression de l'ARNm de GLP dans les IRPTCs stimulées avec l'ang II. Les voies impliquées sont celles de EGFR, ERK1/2, PKC et la voie des ROS. Des résultats d'incorporation de [³H]-leucine et de contenu en protéines totales en présence d'ang II et d'inhibiteurs spécifiques ont démontré que l'hypertrophie observée dans les IRPTCs semble modulée par la voie des ROS. Finalement, la protéine GLP pourrait être le lien entre le récepteur AT1 et l'hypertrophie. GLP pourrait donc être une bonne cible pour le développement de nouveaux médicaments pour le traitement des patients souffrant de maladies cardiovasculaires et rénales.

Mots clé : récepteur AT1; angiotensine II; hypertrophie cellulaire; cellules du tubule proximal rénal; expression génique ; espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Résumé en anglais

The renin-angiotensin system plays an important role in many diseases such as hypertension and renal failure. Angiotensin II (ang II) stimulates cell hypertrophy in different cells including renal proximal tubular cells, which leads to renal injury. The actions of ang II are mediated through the AT1 and AT2 receptors, however, the molecular mechanism involved in ang II-induced cell hypertrophy is not clear. A novel AT1 receptor-associated protein, GLP, was identified. Results obtained by flow cytometry, [³H]-leucine incorporation and total protein content show that the overexpression of GLP gene induces hypertrophy in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and rat immortalized proximal tubular cells (IRPTCs). Data show that ang II stimulates GLP mRNA expression in a time-, concentration-, and AT1 receptor-dependent manner in IRPTCs. To further determine the signal transduction pathways which may be involved in ang II-induced GLP mRNA expression, we used various specific inhibitors. The results indicate that the EGFR, ERK1/2, PKC and ROS pathways are involved, while, ang II-induced cellular hypertrophy in IRPTCs involves the ROS pathway. Indeed, the results obtained by [³H]-leucine incorporation and total protein content show a significant decrease in GLP mRNA expression when cells are stimulated with ang II and each specific inhibitor. Finally, GLP protein may be the missing molecule coupling to the AT1 receptor and initiating cellular hypertrophic effects. GLP may thus be a good target for the development of new drugs to treat patients with cardiovascular and renal diseases.

Key words : AT1 receptor; angiotensin II; cellular hypertrophy; renal proximal tubular cells; gene expression; reactive oxygen species (ROS)

Table des matières

Résumé en français	i
Résumé en anglais	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vi
Listes des figures	vii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xii
Introduction	1
Chapitre 1 - Revue de la littérature	3
1. Hypertension	4
1.1. Statistiques	4
1.2. Définition	4
1.3. Effets secondaires	5
1.4. Facteurs de risques	6
1.5. Contrôle et traitements	7
2. Système rénine-angiotensine (RAS)	8
2.1 Fonction	8
2.2. Composants	9
2.3. Systémique vs intrarénal	10
2.3.1. L'angiotensine II et les reins	12
2.3.2. L'angiotensine II rénale et l'hypertension	16
2.3.3. Autres composants du RAS et hypertension	18
2.4. Angiotensine II	19
2.4.1. Rôles et effets	20
2.5. Récepteurs de l'angiotensine	22
2.5.1. Distribution tissulaire	24
2.5.2. Rôles du récepteur AT1	25
2.5.3. Rôles du récepteur AT2	26
2.5.4. Régulation	27
3. Le rein	28

3.1. Anatomie et physiologie	28
3.2. Fonctions	30
3.3. Maladies rénales	32
3.4. Maladies rénales et hypertension	36
4. Cellules immortalisées du tubule proximal de rein de rat (IRPTCs)	37
5. Voies de signalisation	39
5.1. Mécanisme de la liaison de l'ang II à ses récepteurs	39
5.2. Protéine G	41
5.3. MAPKs	44
5.4. Récepteurs tyrosine kinases (RTKs)	48
5.5. Récepteur du facteur de croissance epidermal (EGFR)	49
5.6. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	51
6. Hypertrophie cellulaire	57
7. Protéines associées au récepteur AT1	61
Chapitre 2	63
Hypothèse et objectifs spécifiques	64
Chapitre 3	65
Introduction de l'article	66
Article 1: A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells.	67
Abstract	68
Introduction	69
Materials and methods	71
Results	76
Discussion	82
References	87
Figure legends	92
Figures	96
Chapitre 4	107
Introduction de l'article	108
Article 2 : Angiotensin II stimulates a novel angiotensin II type 1	109

receptor-associated protein, GLP gene expression in rat kidney proximal tubular cells : mechanism of GLP-induced cellular hypertrophy.

Abstract	110
Introduction	111
Materials and methods	113
Results	116
Discussion	121
References	126
Figure legends	133
Figures	136
Chapitre 5 - Discussion	147
Conclusion	161
Bibliographie	162

Listes des tableaux**Revue de la littérature****Tableau 1** : Stimulus et rôles des MAPKs.

46

Liste des figures

Revue de la littérature

Figure 1 : Cascade du système rénine-angiotensine (RAS).	8
Figure 2 : Concentrations et niveaux interstitiels et du tubule proximal d'angiotensinogène (AGT), angiotensine 1 et angiotensine II.	12
Figure 3 : Séquence d'acides aminés de l'angiotensine II, ses effets non hémodynamiques sur le rein.	20
Figure 4 : Structure secondaire et séquence d'acides aminés du récepteur AT1 du mammifère représentant la structure classique des récepteurs couplés à la protéine G (GPCRs).	23
Figure 5 : Propriétés des deux types de récepteur à l'angiotensine II, AT1 et AT2.	25
Figure 6 : (A) Position et organisation des reins et du système urinaire. (B) Section de rein montrant les vaisseaux majeurs desservant les reins en sang et schéma de la circulation dans chaque néphron. (C) Représentation de la structure cellulaire du tubule proximal.	29
Figure 7 : Évolution de la maladie rénale.	35
Figure 8 : Voies de signalisation impliquées à travers les tyrosine kinases lors de la médiation par l'angiotensine II.	39
Figure 9 : Voies de signalisation du récepteur AT2 induit par l'ang II. (A) Stimulation des phosphatases. (B) Stimulation de la phospholipase A ₂ . (C) Activation des voies de signalisation de l'apoptose.	43
Figure 10 : Voie de signalisation de la MAPK ERK1/2.	47
Figure 11 : Génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le réseau vasculaire.	53
Figure 12 : Schéma représentant les phases du cycle cellulaire.	58

Article 1

- Figure 1** : A, sequence of human GLP cDNA and its predicted amino acid sequence. B, comparison of seven tandem repeats motif with their amino acid sequences. C, structure comparison of human GLP and RCC1 genes, GLP contains a seven repeats motif similar to that of RCC1 protein. 96
- Figure 2** : GLP mRNA expression in different human tissues (A) and different cell types (B). GLP protein expression in different cell types (C). 97
- Figure 3** : Intracellular localization of GFP-GLP in HEK-293 cells expressing a pcDNA3-GFP-GLP fusion protein observed with a fluorescence microscope (A). GLP overexpression induces bigger cell size in VSMCs visualized with a light microscope. 98
- Figure 4** : The GLP gene induces cellular hypertrophy in VSMCs. 99
- Figure 5** : Effect of GLP gene on the phosphorylation of AKT/PKB protein and cellular p27^{Kip1} protein expression in VSMCs. 100
- Figure 6** : Effect of LY294002 and DPI on phosphorylation of AKT2 and relative cell size in VSMCs overexpressing GLP gene. 101
- Figure 7** : Establishment of IRPTC lines stably expressing pcDNA3-Myc-GLP (GLP), GLP deletion mutant M1 pcDNA3-Myc-GLP-M1 (GLP-M1), GLP in antisense orientation (GLP-AS), and pcDNA3 (Control). 102
- Figure 8** : Effect of GLP gene on cellular hypertrophy in different IRPTC lines. 103
- Figure 9** : GLP overexpression induces p27^{Kip1} protein expression but not activation of AKT/PKB in different IRPTC lines. 104
- Figure 10** : Effect of Ang II-induced hypertrophy in different IRPTC lines. 105
- Figure 11** : Ang II stimulates GLP mRNA expression in a time- and dose-dependent manner in IRPTCs. 106

Article 2

- Figure 1** : shows the amino acid sequence comparison between human, mouse and rat GLP proteins. 136

- Figure 2 :** Ang II stimulates GLP mRNA expression in a time-dependent manner in IRPTCs. 137
- Figure 3 :** Ang II stimulates GLP mRNA expression in a dose-dependent manner in IRPTCs. 138
- Figure 4 :** Ang II stimulates GLP mRNA expression via AT1, but not AT2 receptor in IRPTCs. 139
- Figure 5 :** Transactivation of the EGF receptor signaling pathway is involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. 140
- Figure 6 :** Activation of PKC and ROS generation are partially involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. 141
- Figure 7 :** P38 MAPK and JAK2 kinase pathways are not involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. 142
- Figure 8 :** ROS generation signaling pathway is involved in GLP-induced IRPTC hypertrophy. 143
- Figure 9 :** Activation of ERK1/2 MAPK signaling pathway is not involved in GLP-induced IRPTC hypertrophy. 144
- Figure 10 :** Inhibition of ROS generation blocks GLP-induced IRPTC hypertrophy. 145
- Figure 11 :** Model of signaling pathways involved in Ang II-stimulated GLP mRNA expression and GLP-induced cellular hypertrophy in IRPTCs. 146

Liste des abréviations

Ang II : angiotensine II

AT1R : récepteur de l'angiotensine II type 1

AT2R : récepteur de l'angiotensine II type 2

CAT : catalase

DAG : diacylglycérol

DPI : diphenyliodonium chloride

EGF : facteur de croissance épidermal («epidermal growth factor»)

EGFR : récepteur d'EGF

ERK1/2 : kinase régulé e par les signaux extracellulaires («extracellular signal-regulated kinase»)

FAK : kinase à adhésion focale («focal adhesion kinase»)

GEF : facteur d'échange GDP/GTP («GDP/GTP exchange factor»)

GLU : glutathion peroxydase

GLP : «GEF-like protein»

GPCR : récepteur couplé à la protéine G («G-protein coupled receptor»)

HEK : cellule embryonnaire de rein humain («human embryonic kidney cell»)

IGF : facteur de croissance de l'insuline («insulin growth factor»)

IGF(R) : récepteur d'IGF

IP3 : inositol-triphosphate

IRPTC : cellule immortalisée du tubule proximal de rein de rat («immortalized renal proximal tubular cell»)

JAK2 : kinase janus 2 («janus kinase 2»)

JNK : protéine kinase c-jun N-terminal («c-jun N-terminal protein kinase»)

MAPK : protéine kinase activée par des mitogènes («mitogen-activated protein kinase»)

MEK : MAPK/ERK kinase

PDGF: facteur de croissance dérivé des plaquettes («platelet-derived growth factor»)

PDGFR : récepteur de PDGF

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PKC : protéine kinase C

PLC : phospholipase C

PYK2 : kinase tyrosine riche en proline 2 («proline-rich tyrosine kinase 2»)

ROS : espèces réactives de l'oxygène («reactive oxygen species»)

RTK : récepteur tyrosine kinase

SOD : superoxyde dismutase

TGF- β : facteur β de croissance transformé («transforming growth factor- β »)

VSMC : cellule du muscle lisse vasculaire («vascular smooth muscle cell»)

Remerciements

J'aimerais utiliser les quelques lignes qui suivent afin de souligner et de remercier du même souffle des personnes qui ont collaboré de près ou de loin à l'achèvement de cet ouvrage.

Tout d'abord je ne peux pas passer sous silence Dr Deng-Fu Guo qui m'a accueilli dans son laboratoire afin que je puisse réaliser mes expériences durant la maîtrise.

De plus, il faut que je souligne la participation étroite d'Isabelle Chénier, l'agente de recherche du laboratoire, pour son support technique, concernant les corrections et conseils de l'écriture du mémoire, et moral, pendant les temps de manipulations où toutes les expériences ne donnent pas des résultats probants.

Merci remarquable à Karim Ghelima pour son aide afin de compléter mes expérimentations.

Je me dois de mentionner la participation du laboratoire de Dr. Chan. Je remercie son équipe pour les nombreuses discussions scientifiques qui ont su modeler ma pensée et ainsi m'ouvrir sur des pistes de réflexions diversifiées.

À Annick, Amélie et Annie je vous remercie pour tous les encouragements qui m'ont gardés motivée, ce qui m'a poussée à persévérer.

Grâce aux valeurs qu'ils m'ont enseignés et parce qu'ils ont réussi à m'aiguillonner, je dois remercier mes parents, sans eux et leurs supports de toutes sortes, je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui.

Avant de conclure, je veux remercier spécialement ma pitoune Laïka, mon amour Mathieu et mon petit monstre de neveu, Samuel, pour leurs présences à la maison, leurs supports affectifs et tous les divertissements, voulus ou pas, qu'ils ont occasionnés.

Finalement, je dédie ce mémoire à ma grand-mère et mon grand-père, je ne vous oublierai jamais.

Introduction

L'hypertension atteint 13% de la population, soit 4,1 millions de Canadiens et Canadiennes (2). Avec le vieillissement de la population, cette maladie risque de prendre d'énormes proportions au pays (2;3). Malheureusement, les symptômes liés à l'hypertension prennent un certain temps avant de se manifester qualifiant l'hypertension de «tueur silencieux» (3). Dans plusieurs cas, l'hypertension n'est pas causée par un organe précis, alors que dans certains cas la maladie est due à des troubles endocriniens comme la suractivation du RAS.

Le RAS est un système endocrinien qui consiste en une cascade d'interactions biochimiques aboutissant à la production de l'ang II (4). Le RAS est responsable du maintien de la pression sanguine moyenne et de la conservation du volume extracellulaire. À l'origine, le RAS était considéré systémique, cependant, la notion d'un RAS local a été mentionnée (5). Il a été démontré que le rein est l'un des organes possédant un RAS local, ce qui en fait un organe doté d'une grande autonomie dans la régulation des niveaux intrarénaux d'ang II (6). En effet, les niveaux intrarénaux d'ang II sont grandement supérieurs aux niveaux d'ang II plasmatiques (5;7-9). La production intrarénale d'ang II ajoutée à l'ang II internalisée provoque, dans certains cas, un surplus d'ang II intrarénale menant au développement de l'hypertension dépendante de l'ang II (6;10).

L'ang II est une hormone (11), de huit acides aminés (12;13) contrôlant un nombre imposant de réponses physiologiques, dont la régulation de la pression sanguine via la vasoconstriction (5;14-16) et la rétention de sel et d'eau par les tubules proximaux rénaux (12;16) ainsi que la soif (17).

L'action biologique majeure de l'ang II est régie par deux types de récepteurs, AT1 et AT2, de la surface cellulaire (1;18). La grande majorité des actions physiologiques de l'ang II agissent à travers le récepteur AT1 (19). La région carboxyl-terminale du récepteur AT1 joue un rôle important dans la régulation du récepteur AT1, dont l'internalisation du récepteur, la phosphorylation, la désensibilisation, le recyclage et les voies de signalisation (13). Les récepteurs AT1 sont couplés à de multiples cascades de signalisation spécifiques (20) et hautement complexes (17) menant à diverses actions biologiques (20). Plusieurs voies de signalisation ont des interactions avec le récepteur AT1, dont la PKC, les MAPKs,

les RTKs incluant EGFR et la voie des ROS. L'une des actions biologiques transduites est l'hypertrophie cellulaire.

L'hypertrophie rénale est souvent le résultat de dommages chroniques aux néphrons. Cette hypertrophie est alors adaptative et compense pour le mal causer aux reins. Par contre, par la suite cette même hypertrophie devient néfaste et mène, par différents mécanismes tel que la génération des ROS, à la fibrose interstitielle et au stade terminal de maladie rénale (21-23).

Les mécanismes moléculaires précis de l'hypertrophie cellulaire impliquant l'ang II et le récepteur AT1 ne sont cependant pas bien compris. Étant donné l'importance du récepteur AT1, nous lui avons cherché des partenaires intracellulaires. Une protéine associée au récepteur AT1, GLP, fut récemment découverte. Nous démontrons que cette protéine pourrait être le lien entre l'ang II et l'initiation de l'hypertrophie cellulaire.

Chapitre 1
Revue de littérature

1. Hypertension

1.1 Statistiques

L'hypertension atteint 4,1 millions de Canadiens, soit environ 13 % de la population entre 18 et 74 ans (2). On retrouve aussi la même proportion d'hypertendus dans les autres pays industrialisés (24;25). Tous ces gens risquent plus que d'autres une crise cardiaque ou un accident vasculo-cérébral (25).

L'incidence de la maladie croît avec l'âge (2;26). Au Canada, 22% des personnes âgées de 18 à 70 ans souffrent d'hypertension et cette proportion monte à 30 % chez les personnes de plus de 50 ans (2;27) et 50% chez les personnes âgées de plus de 65 ans. Avec le vieillissement de la population, l'hypertension risque de prendre des proportions effarantes au pays (2;3). Malheureusement, du fait que les symptômes rattachés à l'hypertension artérielle prennent un certain temps à se manifester, on estime que 42 % des hypertendus ne sont pas conscients de leur état (2;3;28), c'est pourquoi on nomme la maladie le « tueur silencieux » (3).

Il s'agit d'une maladie fréquente, mais peu contrôlée. En fait, l'hypertension de seulement 16% des victimes serait contrôlée de façon adéquate (2;3;29;30). Il existe un fort lien causal entre cette affection et la morbidité et la mortalité associées aux maladies cardiovasculaires cérébrales et aux néphropathies. Effectivement, l'hypertension constitue un important facteur de risque de l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, l'insuffisance cardiaque et l'insuffisance rénale. En fait, l'hypertension est considérée comme le troisième facteur de risque de mort dans le monde (29).

Mais qu'est-ce que l'hypertension artérielle?

1.2 Définition

La tension artérielle est en fait une mesure de la pression exercée par le sang sur les parois des artères et ce, immédiatement après la contraction du cœur (systolique), et entre deux battements du cœur (diastolique). L'interprétation du résultat sera donc toujours le rapport entre les deux nombres obtenus. Ainsi, une tension artérielle élevée signifiera que la

circulation du sang dans les artères est difficile (28). En fait, ces deux chiffres indiquent l'intensité de l'effort que doit fournir le cœur et l'état des vaisseaux sanguins. La tension optimale établie par l'Organisation mondiale de la santé et la Société internationale de l'hypertension est 120/80 mm Hg et le début de l'hypertension à 140/90 mm Hg (28). Au point de vue physiologique, l'hypertension se définit comme la persistance d'une pression artérielle de 140/90 mm Hg ou plus, donc plus la pression artérielle est élevée, plus les risques de problèmes cardiovasculaires et cérébraux sont augmentés (27).

1.3 Effets secondaires

Malgré que l'hypertension soit généralement asymptomatique pendant les 10 à 20 premières années de son évolution, elle fatigue tout de même le cœur et endommage les artères. L'hypertension prolongée est la principale cause de l'insuffisance cardiaque, des maladies vasculaires, de l'insuffisance rénale et des maladies vasculaires cérébrales. Elle peut être l'effet secondaire ou la complication de d'autres maladies. Comme le cœur doit surmonter une résistance accentuée, il travaille plus fort qu'il ne le devrait et, au fil du temps, pour compenser, le myocarde s'hypertrophie (27). Le cœur se détériorera alors plus rapidement et s'épuisera à la longue (28). En effet, lorsque le cœur finit par excéder ses capacités, il s'affaiblit et ses parois deviennent flasques.

L'hypertension aura aussi un impact sur la santé générale des vaisseaux sanguins ainsi que son endothélium car elle favorise le dépôt de graisses sur et dans les parois des artères (28) et cause dans l'endothélium de petites déchirures qui précipitent les ravages de l'athérosclérose, soit l'accumulation des lipides sur la paroi interne des artères, et provoquent l'artériosclérose, soit le durcissement des artères (27). Cette condition peut entraîner, à mesure que les vaisseaux sanguins s'obstruent, une diminution de l'apport en sang dans les tissus, et des complications cérébrales, oculaires, cardiaques et rénales (27) ou des troubles circulatoires aux jambes (28).

L'hypertension artérielle est donc un problème de santé sérieux car elle a un impact sur plusieurs fonctions vitales de l'individu puisque le sang circule partout dans l'organisme (28). Il est aussi dangereux car son silence amène beaucoup de conséquences avant le diagnostique.

1.4 Facteurs de risques

Il est estimé que dans environ 90% des cas, l'hypertension est dite essentielle ou inexpliquée, c'est-à-dire qu'elle n'a pas de cause organique précise. Toutefois, il est fort possible que plusieurs facteurs jouent un rôle. L'âge serait l'un d'eux, les signes cliniques de la maladie apparaissant habituellement vers l'âge de 40 ans (24). L'évolution diffère aussi selon les groupes de la population. Ainsi les études montrent que l'on trouve plus d'hypertendus de race noire que de race blanche et que les autres races. Plusieurs explications ont été données, par exemple les afro-américains semblent être plus sensibles au sel, qui retient l'eau et augmente par la suite la pression artérielle. De plus, les afro-américains sont plus sujets à avoir des lésions rénales dérivant de l'hypertension artérielle (26).

L'obésité (26) est un autre facteur de risque de l'hypertension artérielle car elle est fréquente parmi les personnes obèses, chez lesquelles la longueur totale des vaisseaux sanguins est plus grande que chez les personnes minces (27). Aussi, en règle générale, les hommes sont plus concernés par l'hypertension artérielle que les femmes non ménopausées (24). Néanmoins cette différence s'amenuise à partir du moment où les femmes sont ménopausées, les études montrant qu'après la ménopause, la prévalence de l'apparition de l'hypertension artérielle est augmentée, indépendamment des autres variations physiologiques liées à cet état (24).

Bien entendu, une origine génétique de l'hypertension est suspectée (24). En effet, des études familiales démontrent un composant héréditaire significatif concernant la régulation de la pression sanguine et l'hypertension. L'hérédité de la régulation pression sanguine, en se basant sur des études familiales est d'environ 15-35% et augmente dans les cas de jumeaux (31;32). L'hypertension est héréditaire : l'enfant d'un parent souffrant d'hypertension court deux fois plus de risques d'être atteint de la maladie que l'enfant né de parents normotendus (26;28). Plusieurs groupes ont donc pour objectifs d'identifier les loci génétiques et les gènes candidats responsables exprimés lors de l'hypertension et dans les changements phénotypique qui peuvent contribuer à l'hypertension (31;33). Toutefois, les habitudes de vie telles que le manque d'exercice (26;28), une consommation excessive

d'alcool, le stress, sans oublier l'alimentation et la cigarette (26-28) sont aussi en grande partie liées à l'hypertension.

Toutefois, les facteurs de risques les plus importants sont les élévations répétitives de la pression artérielle, le taux sanguin de cholestérol, l'usage du tabac (26;27), le diabète sucré (27) et le stress (26-28).

1.5 Contrôle et traitements

L'hypertension essentielle est incurable, mais elle peut être maîtrisée par une intervention diététique adéquate, (diète faible en sel et en cholestérol), une perte pondérale et des médicaments antihypertenseurs (27).

Cependant, moins de 10% des cas d'hypertension sont dus à des troubles identifiables, dont l'hypersécrétion de la rénine et des troubles endocriniens. Dans ces cas, le traitement de l'hypertension vise plutôt à éliminer le facteur causant ces dérèglements (27).

Le contrôle de l'hypertension artérielle peut prévenir de nombreuses complications, c'est pourquoi il est donc si important de la maîtriser (26).

Mais l'hypertension artérielle est un problème de santé parmi tant d'autres au Canada. Traiter l'hypertension exige une approche multifactorielle (28) et un certain nombre de facteurs qui influent sur la prévention, le traitement et la maîtrise de l'hypertension sont similaires, voire identiques, à ceux d'autres maladies chroniques (29).

Finalement, l'hypertension artérielle n'est qu'un élément d'un phénomène comportant de nombreux facteurs, et des efforts doivent être accomplis pour mettre en place une approche de gestion globale des facteurs de risque de maladie cardiovasculaire (29).

2. Système rénine-angiotensine (RAS)

2.1 Fonction

Le système rénine-angiotensine-aldostérone, aussi appelé système rénine-angiotensine ou RAS, a été longtemps considéré comme un système endocrinien général (5). En fait, il a été décrit pour la première fois comme un système endocrine par H. Goldblatt en 1934 (4). Le RAS consiste en une cascade d'interactions biochimiques aboutissant à la production de l'angiotensine II (ang II), un peptide de huit acides aminés (4).

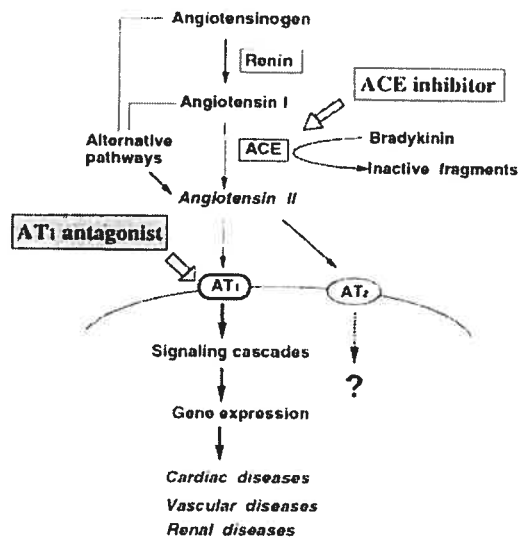


Figure 1. Cascade du système rénine-angiotensine (RAS). (Tiré de Kim et *al* (16))

Le RAS est l'un des principaux complexes de régulation de la pression sanguine et est distribué entre le sang circulant et l'espace péricellulaire de l'interstitium tissulaire (4). Les rôles du RAS endocrinien, dans la vue classique, sont le maintien de la pression artérielle moyenne et la conservation du volume extracellulaire lors des états aigus d'hypovolémie et de réduction saline chronique (5). Le RAS augmente la réabsorption de l'eau et du sodium par des actions directes sur la fonction du transport tubulaire rénal. Le transport du sodium dans le tubule proximal est stimulé par l'amélioration de l'activité ion-antiport sodium-hydrogène sur la membrane luminale. L'augmentation de la pompe sodium/potassium et du co-transporteur sodium/bicarbonate sur la membrane basolatérale des cellules du tubule proximal améliore aussi la réabsorption du sodium (1). Le RAS maintient aussi la perfusion de tous les organes en leur totalité par la régulation du volume de fluide extracellulaire, de

la balance en eau et sodium, et de l'activité cardiovasculaire. Ce système est équilibré pour répondre aux dangers compromettant la stabilité de la pression sanguine et le volume homéostatique du fluide extracellulaire, tel que la perte d'un volume sanguin circulant efficace, la déficience autant du contenu intravasculaire en eau et en sodium ainsi que toute situation clinique associée à un hémodynamie instable (1).

2.2 Composants

Comme le montre la figure 1, ce système comprend une cascade de produits peptidiques intermédiaires l'aidant à effectuer ses fonctions (1). Plusieurs facteurs tel qu'une baisse de la pression de la perfusion rénale ou la restriction et la perte du sodium, stimulent le relâchement d'une enzyme protéolytique, la rénine (5). La biosynthèse de la rénine, dans la vue classique du RAS, se traduit comme une préproprotéine dans les cellules juxtaglomérulaires du rein. Comme toutes les protéines sécrétées, la prépro-rénine contient un peptide signal qui est clivé pour activer la rénine dans les cellules juxtaglomérulaires (5). La conversion de la pro-rénine à la rénine active se produit exclusivement dans les cellules juxtaglomérulaires du rein (34). Donc, la synthèse commence par le relâchement de rénine par les cellules juxtaglomérulaires, ainsi que par d'autres tissus.

L'enzyme rénine est considérée comme l'étape limitante dans le RAS et sa synthèse est influencée par de nombreuses causes incluant les sens de la pression hydrostatique à l'artériole glomérulaire afférente, les niveaux d'ang II et la quantité de sodium livrée dans la macula densa. De plus, la concentration plasmatique du potassium et les niveaux du peptide atrial natriurétique (ANP) et d'endothéline (ET-1) affectent aussi la synthèse de rénine.

La rénine a une demi-vie dans le sang d'environ 30 minutes à 1 heure (35). Elle clive l'angiotensinogène (AGT) (1), son substrat, une globuline en un peptide de 10 acides aminés (35) synthétisée par le foie (1;5) et sécrétée dans la circulation sanguine (5), l'angiotensine 1. Le seul substrat humain de la rénine est l'AGT, et la rénine agit seulement sur ce dernier comme une enzyme, donc l'AGT n'a pas d'activité biologique directe (34). Le produit formé de ce clivage est l'angiotensine I (ang I) (1;5). Quelques secondes après la formation de l'ang I, 2 acides aminés sont coupés de ce dernier pour former l'ang II un

peptide de 8 acides aminés (35). L'enzyme responsable de cette conversion est l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (1).

ACE est une enzyme protéolytique, une large glycoprotéine métalloprotéinase acide, retrouvée dans les cellules endothéliales des poumons, de l'endothélium vasculaire et dans les membranes des cellules rénales, du cœur et du cerveau. Bien qu'il était originalement présumé que ACE agissait exclusivement dans les cellules endothéliales du lit pulmonaire, il est maintenant clair que la formation de l'ang II dans les tissus périphériques (incluant le rein) est également importante. ACE dégrade aussi la bradykinine en fragments inactifs, réduisant dans le sérum le niveau de vasodilatateurs endogènes (1). Donc ACE aide à la vasoconstriction par la formation de l'ang II. Le dernier produit de la cascade du RAS est l'ang II, toutefois sa demi-vie dans le sang n'est que de seulement 1 ou 2 minutes (35) et elle est ensuite dégradé rapidement (36) par de multiples enzymes tissulaires et sanguines appelées angiotensinases (35).

Récemment, une nouvelle enzyme du RAS, ACE2, fut identifiée chez le rongeur et l'humain avec une distribution plus restrictive que ACE. En fait, cette enzyme est trouvée principalement dans le cœur et les reins et son action principale est la conversion de l'ang II en ang 1-7. L'ang 1-7 agit en peptide cardioprotecteur en faisant la promotion de la vasodilatation, l'apoptose et l'arrêt de la croissance (37;38). ACE2 et le peptide ang 1-7 pourrait donc avoir une fonction de régulation négative en présence d'un RAS activée (38). ACE2 a été impliqué dans la fonction cardiaque ainsi que des maladies incluant l'hypertension et le diabète. De plus, chez les rats hypertendus, une réduction de l'expression génique et de la protéine ACE2 est observée, suggérant que ACE2 est un fort candidat pour un loci trait quantitatif (QTL) hypertenseur sur le chromosome X (38;39). Cette découverte permet de mieux connaître et comprendre la physiologie cardiovasculaire et rénale et ainsi que d'identifier une nouvelle cible thérapeutique (37).

2.3 Système RAS systémique et intrarénal

Le RAS était à l'origine considéré comme étant systémique. Cependant, depuis quelques années, le concept d'un RAS organe-spécifique ou RAS local, avec tous les composants nécessaires pour la génération d'ang II, a été évoqué. Le RAS local peut exister et

fonctionner indépendamment ou interagir avec le RAS systémique. L'une des premières observations menant à la reconnaissance d'un RAS local fut l'existence de la conversion de l'ang I en ang II dans la plupart des tissus périphériques, incluant le rein. Un RAS local avec tous les composants nécessaires pour générer et métaboliser aussi bien l'expression des récepteurs de l'ang II que les voies de transduction du signal appropriées, a ainsi été décrit dans le cerveau, le cœur, le système reproducteur et les reins (5).

Le rein a été traditionnellement considéré comme étant l'un des organes crucial impliqué dans les actions systémiques du RAS et ce, avec la production de rénine dans l'appareil juxtaglomérulaire et l'ang II comme joueur clé dans la régulation de l'hémodynamie glomérulaire. Cependant, plusieurs études dans la dernière décennie, épaulées par la caractérisation complète de tous les éléments du RAS, ont fourni des évidences convaincantes indiquant que le rein possède un RAS local, lequel peut fonctionner indépendamment des actions systémiques du RAS endocrinien. De plus, des populations de cellules distinctes peuvent également posséder tous les composants d'un RAS fonctionnel. Dans le rein, les cellules du tubule proximal par exemple, expriment l'ARNm et la protéine de l'AGT, la rénine et ACE. Ces cellules montrent aussi à leur surface une protéase comme l'angiotensinase, laquelle inactive l'ang II (1;5).

Le RAS sert donc de système paracrine, autocrine et intracrine, aussi bien que de système endocrinien classique. Bien que tous les tissus du corps ont les éléments du RAS, le rein est unique car il a toutes les composantes du RAS en profusion et compartimente l'ang II dans les tubules ainsi que le réseau interstitiel. La capacité à générer ou synthétiser localement le peptide angiotensine, aide à expliquer pourquoi les niveaux d'ang II dans le rein sont supérieurs aux autres tissus (6). Mais cette formation de l'ang II intrarénal est particulièrement complexe, car tous les composants nécessaires pour la formation de l'ang II sont formés localement (40). La présence du RAS permet de poursuivre la synthèse de l'ang I et ce, même en absence d'ang I, permettant les effets autocrines et paracrines de l'ang II. Par exemple, les niveaux intrarénaux d'ang II dans le fluide du tubule proximal, le fluide interstitiel et dans la médulla rénale sont supérieurs aux niveaux systémiques. Ceci supportent donc la notion que l'ang II est synthétisée localement et agit comme une hormone paracrine avec des fonctions spécifiques aux organes (1).

D'autres voies, nommée voie non-rénine et non-ACE, existent aussi dans le corps permettant la production d'ang II venant directement de l'AGT ou de l'ang I. La synthèse d'ang II peut avoir lieu et cela même en présence d'inhibiteur de ACE. Une quantité approximative de 40 % de l'ang II retrouvée dans les reins est générée par la voie alternative indépendante de ACE (1). Ces voies impliquent, entre autre, la chymase, la trypsine et la cathepsine G. Les voies non-ACE apparaissent apporter une contribution plus élevée de leur production en ang II lors d'une diète forte en sel (41). Cette dernière information est importante lorsqu'on considère que c'est par ce mécanisme qu'une grande partie des thérapies agissent, en interrompant cette cascade (1). Les bloqueurs du récepteur AT1 pourraient alors voir un meilleur effet thérapeutique que les inhibiteurs de ACE (41).

2.3.1 L'ang II et le rein

Le RAS est une cascade coordonnée de protéines et d'hormones peptidiques, dont le principal effecteur est l'ang II. L'évidence indique maintenant que le rein régule ces fonctions via le RAS qu'il contient en lui dans le mode paracrine (34). Le RAS a, en plus d'avoir un rôle majeur dans le contrôle de la pression sanguine et la balance homéostatique, un rôle fondamental dans le développement du rein. En effet, le fonctionnement de la cascade générant l'ang peut contrôler le processus du développement et d'homéostasie. Puis, lorsqu'un défaut survient dans ses processus, elle cause des maladies (42).

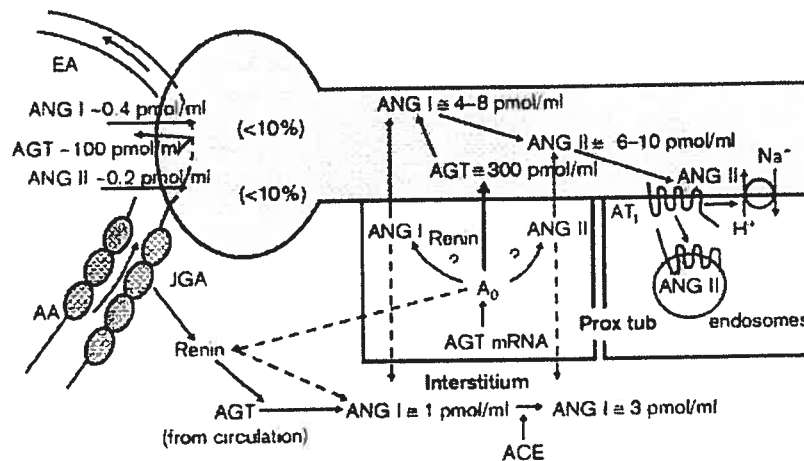


Figure 2. Concentrations et niveaux interstitielles et du tubule proximal d'angiotensinogène (AGT), angiotensine 1 et angiotensine II. (Tiré de Navar et al (6)).

La présence de tous les composants du RAS observée dans les reins leur donne une grande flexibilité et indépendance dans la régulation des niveaux intrarénaux d'ang II. La rénine est sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires dans le compartiment interstitiel et agit sur l'AGT. Cependant, la taille de l'AGT plasmatique (62 kDa) (36;43) l'empêche d'être filtrée efficacement à travers la membrane glomérulaire et les cellules du tubule proximal synthétisent donc aussi l'AGT (6;8;9). Cette production apporte une grande contribution à l'AGT intrarénal ainsi qu'à la formation subséquente locale d'ang II. Donc, la présence de l'ARNm et de la protéine de l'AGT dans les segments du tubule proximal permet la génération abondante de substrat intrarénal et la formation locale subséquente du peptide angiotensine (6).

La grande proportion d'AGT intrarénal produit, dérivée des cellules du tubule proximal, est sécrétée directement dans le tubule (6;8). Beaucoup d'AGT se trouve localisé près de la bordure luminale ou apicale des cellules du tubule proximal, suggérant que l'AGT peut aussi être sécrété dans le lumen du tubule (6;9). Ces cellules sont alors la première source interstitielle et intratubulaire des concentrations d'ang I et II (6;8).

La production d'AGT intrarénal par le tubule proximal est particulièrement significative dans la régulation de la hausse du taux d'ang II intrarénal, parce qu'il peut être positivement contrôlé par l'ang II elle-même. En effet, une amplification positive de la synthèse d'AGT par l'augmentation d'ang II intrarénal fournit un mécanisme de retour positif, permettant le maintien de hautes concentrations d'ang II dans le fluide interstitiel rénal et le fluide du tubule proximal (6;8;43). Les concentrations d'ang II dans le fluide tubulaire proximal ne sont pas dérivées du filtrat, indiquant ainsi que les tubules proximaux sécrètent de l'ang II ou un précurseur dans le fluide du tubule proximal (8). Ce processus permet de régler les niveaux d'ang II intrarénal de manière sélective, en accord avec l'homéostasie nécessaire à la réabsorption du sodium, permettant une régulation appropriée de la balance de sodium et du volume extracellulaire (6). La présence du RAS dans le tubule proximal suggère donc que l'ang II produit localement peut moduler la fonction du tubule proximal (44).

Parce que l'AGT est produit par les cellules proximales rénales, l'ang I peut être formé autant à l'intérieur des cellules proximales que dans le lumen tubulaire par l'action de la

rénine ou des enzymes comme la rénine, présentes dans le fluide tubulaire ou sur la bordure en brosse. Les cellules du tubule proximal en culture produisent de la rénine et contiennent son ARNm, mais seulement en faible quantité (8). Il est aussi démontré qu'il y a une quantité abondante de ACE et de son ARNm associé aux cellules du tubule proximal de la bordure en brosse (6;8;9). À l'opposé, les peptides dérivés de l'AGT (ang I et II) n'agissent vraisemblablement que dans le compartiment dans lequel ils ont été produits (4).

L'ang II est produit systémiquement via le RAS classique et localement par les tissus du RAS (45). Les hauts niveaux intrarénaux d'ang II dépendent de multiples mécanismes responsables de la régulation de l'ang II intrarénale. En ajoutant la formation d'ang II intrarénal systémiquement libéré ou le substrat endogène formé, le rein peut accumuler ou séquestrer une grande quantité d'ang II de la circulation lié aux récepteurs AT1 et l'internaliser dans des endosomes via un mécanisme d'endocytose dirigé par ce récepteur (6;8;46).

L'endocytose est communément associée avec la sous-régulation et désensibilisation du récepteur (42). Le contenu net d'ang II intrarénal aussi bien que la séquestration de l'ang II dans des endosomes internalisant les complexes ang II-récepteur AT1 mène à un surplus, augmentant ainsi les contenus d'ang II intrarénaux (36;46). Dans ces endosomes rénaux, il n'y aurait pas seulement le complexe ang II-récepteur AT1 mais aussi les peptides angiotensines, ACE ainsi que les récepteurs à l'ang II (36;47;48). La présence de l'ang II dans des endosomes rénaux indique que la majorité de l'ang II internalisé demeure intact et contribue au contenu total d'ang II mesuré dans le tissu homogénéisé (46). Le blocage du récepteur AT1 prévient l'augmentation de l'ang II intrarénale provenant d'infusions chroniques d'ang II suggère une accumulation progressive d'ang II dirigé par le récepteur AT1 dans un compartiment intracellulaire. Il suggère aussi que la majeure partie de l'ang II internalisé est protégé de la dégradation (46). Les fonctions possibles de l'internalisation de l'ang II pourraient donc être le recyclage, suivi de la sécrétion afin d'exercer d'avantage d'actions par la liaison aux récepteurs de l'ang II sur les membranes cellulaires (36;46).

L'ang II intracellulaire peut exercer des actions cytosoliques (36;46). Une hypothèse est que l'ang II migre au noyau pour exercer des effets génomiques (46) ou transcriptionnels (9;36). La liaison aux sites nucléaires pour l'ang II dans les cellules rénales a récemment

été rapportée par Licea *et al.* Les récepteurs nucléaires sont principalement du type AT1 puisqu'ils sont déplacés par le losartan. L'ang II se lie aux sites sensibles au losartan, avec une prédominance au noyau des cellules rénales, suggérant que des récepteurs AT1 nucléaires peuvent être impliqués dans les actions génomiques de l'ang II (46). Les faits suggèrent que le complexe ang II-récepteur AT1 peut migrer au noyau. Ceci est possible car la stimulation par l'ang II de l'ARNm de l'AGT nécessite l'internalisation de l'ang II et des actions génomiques directes sont proposées (48). Donc, les actions directes de l'ang II intracellulaire peuvent inclure la régulation d'évènements de signalisation nucléaire (36). Collectivement, ces résultats supportent la possibilité que des récepteurs nucléaires à l'ang II peuvent exercer des actions transcriptionnelles distinctes de la médiation via les voies classiques, activés par les récepteurs membranaires des cellules (47).

Il semblerait aussi que le contenu intrarénal d'ang II n'est pas distribué de manière homogène, mais plutôt compartimenté autant de manière régionale que segmentaire (8;9). Il s'agit d'une différence marquée dans la distribution du contenu en ang II dans la médulla versus le cortex. Dans le cortex, l'ang II est distribué dans le fluide interstitiel, le fluide tubulaire et dans les compartiments intracellulaires (8). L'ang II dans la médulla rénale est d'intérêt puisque plusieurs études suggèrent que l'ang II influence l'hémodynamie de la médulla à une plus grande échelle que l'hémodynamie corticale. En plus, les études de liaison du récepteur ont démontré que la densité du récepteur de l'ang II est plus importante dans la médulla que dans le cortex. Le taux d'ang II médullaire est aussi plus élevé que le taux dans le cortex chez des rats hypertendus et infusés avec de l'ang II. La combinaison d'un taux élevé d'ang II dans la médulla couplée à une densité élevée des récepteurs à l'ang II suggèrent que l'ang II exerce un rôle majeur dans la régulation des fonctions hémodynamiques et tubulaires dans la médulla (8).

La découverte que les concentrations d'ang II dans le fluide interstitiel rénal sont plus élevées que les taux plasmatiques soutient la formation substantielle d'un ang II interstitiel. Puisque tous les composants nécessaires pour la génération d'ang II y sont présents (36). Des études ont établi que la concentration d'ang II dans le lumen du tubule proximal est situé à 10^{-8} M (44) ou 10^{-9} M (6;40;49), alors que dans le plasma systémique elle est de seulement 10^{-10} M (44;50) à 10^{-12} M (50) soit de 100 à 1000 fois supérieures (5;7-9).

Les quantités élevées d'ang II dans le rein découleraient, selon de récentes études, de la formation intracellulaire et il est de plus possible que cette ang II synthétisée intracellulairement soit sécrétée dans l'espace interstitiel (40). Des études ont aussi montré que des concentrations similaires sont retrouvées dans le fluide tubulaire collecté dans des segments en aval du tubule proximal de tubule perfusé. Les concentrations d'ang II dans le fluide tubulaire ne sont ainsi pas dérivées de la filtration, indiquant que le tubule proximal sécrète effectivement de l'ang II ou ses précurseurs dans le fluide du tubule proximal. L'ang I est aussi présent en concentration nanomolaire dans le fluide du tubule proximal, indiquant que tout l'ang II peut être formé par l'action de ACE sur l'ang I dans la bordure en brosse. Il existe aussi une dissociation entre les concentrations d'ang II circulants et les concentrations d'ang II intratubulaires, car l'expansion du volume du fluide extracellulaire réduit les concentrations d'ang II plasmatiques sans abaisser les concentrations d'ang II intratubulaires (6). L'ang II ou ses précurseurs sont donc sécrétés par les cellules du tubule proximal.

Alternativement, l'ang I peut être sécrété et converti par ACE dans la bordure en brosse ou par l'AGT lui-même qui peut être sécrété dans le lumen du tubule (6).

2.3.2 Ang II rénal et hypertension

Le rôle systémique du RAS dans la régulation de la pression artérielle, dans l'homéostasie du sodium et dans la physiopathologie de l'hypertension a été prouvé depuis plusieurs décennies (8). Un simple dérèglement d'un composant du RAS peut amener à développer ou bien à maintenir l'hypertension. L'une des causes les plus répandues semble être la concentration élevée d'ang II intrarénal amenant à sa suite plusieurs conséquences. Ces concentrations élevées d'ang II sont causées autant par une fraction supérieure de l'ang II internalisée dans les endosomes intracellulaires via un processus dépendant du récepteur AT1 (6;8), que par le mécanisme de rétroaction positive par lequel l'ang II peut stimuler la formation et le relargage d'AGT intrarénal (6;9) menant à son tour à davantage de production intrarénale d'ang II (formation *de novo*) (10;51). Plus d'ang II est produite et plus il y en a d'internalisée, menant à un cercle vicieux, s'encourageant l'un l'autre.

La production intrarénale d'ang II, ajoutée à l'ang II internalisée provoque un surplus d'ang II intrarénal lors du développement de l'hypertension dépendante de l'ang II (6;10). Ces découvertes supportent l'hypothèse que l'accumulation intrarénale, due aux peptides angiotensines dans les endosomes tubulaires corticaux rénaux, est améliorée lors de l'hypertension dépendante de l'ang II. Ce processus dirigé par les récepteurs AT1 peut améliorer la réabsorption du sodium du tubule proximal en relation avec l'hypertension dépendant de l'ang II (48).

L'augmentation de l'expression du récepteur et l'internalisation du complexe ang II-récepteur AT1 peut être importante pour l'expression complète des actions hypertensinogéniques, paracrines et intracrines de l'ang II dans le rein, lors de l'hypertension dépendante de l'ang II (48). L'augmentation de l'AGT intrarénal dans l'hypertension dépendante de l'ang II est aussi dépendante de l'activation des récepteurs AT1 et leur blocage réduit de façon marquée les taux d'excrétions urinaires d'AGT. Donc, l'amélioration du taux d'excrétion urinaire de l'AGT n'est pas simplement la conséquence de l'hypertension ou de la protéinurie. Collectivement, les résultats indiquent que cette augmentation du taux de l'excrétion urinaire de l'AGT est spécifiquement une conséquence de l'hypertension induite par l'ang II et des niveaux d'expression d'ARNm et de protéine intrarénale d'AGT (52).

L'augmentation d'activité d'ang II intrarénal et de production d'AGT est associée avec le taux d'excrétion d'AGT urinaire. Les taux d'excrétion d'AGT urinaire montrent une relation claire avec le contenu d'ang II rénal, suggérant que l'AGT urinaire peut servir d'index de l'hypertension dépendante de l'ang II (43). Ces données supportent un rôle puissant de l'ang II intrarénal dans la pathogénèse de l'hypertension (9). Dans l'hypertension dépendante de l'ang II, une haute pression artérielle est communément associée à l'augmentation des concentrations intrarénales d'ang II (10). Des hauts niveaux d'ang II intrarénal contribuent alors à la rétention excessive de sodium et aux dommages aux tissus (la prolifération et la fibrose) accélérant la détérioration des fonctions rénales (6).

L'ang II, le produit central du RAS, peut jouer un rôle central non seulement dans l'étiologie de l'hypertension, mais aussi dans la pathophysiologie de maladies cardiovasculaires et rénales chez l'humain (16). La conséquence physiologique de

l'augmentation d'ang II dans le fluide interstitiel rénal lors de l'hypertension dépendante de l'ang II inclut l'amélioration de la réabsorption tubulaire de sodium et l'augmentation de la sensibilité du mécanisme de rétroaction tubuloglomérulaire (10). L'ang II formée localement dans le rein est donc critique dans la régulation paracrine de la fonction rénale et dans les processus pathophysiologiques de l'hypertension.

2.3.3 Autres composants du RAS et hypertension

D'autres composants du RAS peuvent aussi jouer un rôle dans l'hypertension. Dans ce cas, il s'agit d'avoir une activation inappropriée du RAS. Des niveaux élevés de rénine circulante dans diverses conditions hypertensives sont reconnus comme indicateur de l'activation inappropriée du RAS, mais cette augmentation locale de l'activité du RAS peut aussi avoir lieu lorsque les indices de la circulation sont normaux. Ceci est particulièrement apparent dans les conditions où l'élévation de la concentration d'ang II circulante est soutenue menant à une augmentation des niveaux d'ang II intrarénal, marquant la suppression du relâchement de la rénine et du contenu en rénine dans le rein (6). Les reins de rats hypertendus infusés avec de l'ang II contiennent moins de rénine, résultat de la suppression des niveaux d'ARNm de la rénine, suggérant une augmentation des concentrations d'ang II intrarénal via la voie indépendante de la rénine (49).

Une augmentation de l'activité du RAS pourrait, également, être due en partie à l'augmentation de l'expression de ACE sur les cellules endothéliales vasculaires dans certaines maladies dont le diabète et l'hypertension (36;53). La délétion de ACE cause une réduction frappante de la pression sanguine, une balance d'électrolytes du sérum anormale et des pathologies rénales, indiquant le rôle crucial du RAS (34).

Enfin, plusieurs modèles expérimentaux de l'hypertension supportent l'idée d'une suractivation du RAS dans le développement et le maintien de l'hypertension (48). Dans les formes d'hypertension dépendante de l'ang II, l'activation inappropriée du RAS limite la capacité des reins à maintenir une balance sodique lorsqu'ils sont perfusés à des pressions artérielles normales. La suractivation du RAS intrarénal mène alors à des altérations dans les fonctions hémodynamiques et de transport. La persistance de cette suractivation mène à

des conséquences à long-terme, incluant la prolifération cellulaire et le dommage rénal (9;36;46).

Dans le traitement de l'hypertension, des variations dans la diète sont intimement associées aux changements dans le contenu de rénine, ang I et II (6;36) dans le rein. Néanmoins le contenu d'ang I et II dans le rein entier demeure plus élevé que la concentration plasmatique correspondante. Ces niveaux intrarénaux dépendent clairement autant de l'enzyme de conversion à l'angiotensine (ACE) que du récepteur AT1 (6).

Il est possible de traiter cette hypertension avec des inhibiteurs de ACE ou des bloqueurs du récepteur AT1, comme le losartan (49). Les inhibiteurs de ACE et les bloqueurs du récepteur AT1 réduisent effectivement l'ang II rénal, et la combinaison des deux médicaments réduit davantage l'ang II rénal chez le rat (6). Le traitement avec des bloqueurs du récepteur AT1 prévient la cascade impliquant l'activation du ligand-récepteur et l'internalisation, avec la stimulation subséquente de la synthèse d'AGT (6).

Ces stratégies interrompent le RAS à différents stades, et ces différences physiologiques sont importantes entre elles (54). Un traitement avec un inhibiteur de ACE hausse l'ang I circulant, mais réduit les concentrations d'ang II. De plus, l'ang II du tissu rénal n'est pas significativement réduit par un traitement avec un inhibiteur de ACE, suggérant des voies alternatives de formation de l'ang II (46). Les inhibiteurs de ACE sont donc un traitement efficace pour l'hypertension présentant moins d'effets secondaires que plusieurs agents antihypertenseurs (54).

2.4 Angiotensine II

L'angiotensine II (ang II) est une hormone (11) octapeptide (12;13) comportant, comme son nom l'indique, huit acide aminés.

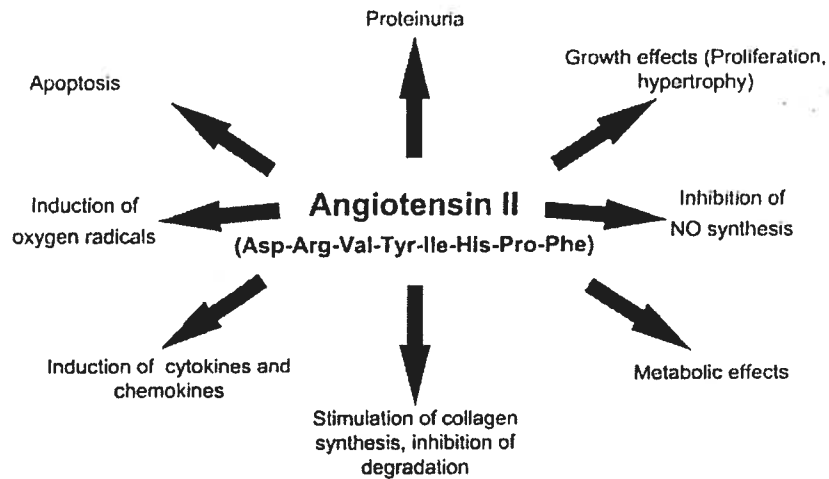


Figure 3. Séquences d'acides aminés de l'angiotensine II ses effets non hémodynamiques sur le rein. (Tiré de Wolf et *al* (55)).

L'ang II est produit par des clivages protéolytiques de prohormone AGT (51) comme montré précédemment sur la figure 1. Elle est le produit central du RAS, son effecteur et contrôle un nombre imposant de réponses physiologiques. L'ang II régule la pression sanguine, le volume plasmatique, l'activité nerveuse sympathique et la soif (17). Ces actions sont autant systémiques que locales.

2.4.1 Rôles et effets

Lors de sa courte vie dans le sang, l'ang II cause deux principaux effets pouvant élever la pression sanguine. Le premier est la vasoconstriction, qui se produit rapidement et intensivement dans les artérioles et beaucoup moins dans les veines. La constriction des artérioles augmente la résistance périphérique totale, donc augmente la pression artérielle. Aussi, une constriction moyenne des veines favorise le retour veineux du sang au cœur, aidant le cœur à pomper pour contrer l'augmentation de la pression (35). Le second effet de l'ang II est une action directe aux reins en diminuant l'excrétion de sel et d'eau. Cette augmentation lente du volume de fluide extracellulaire, augmente du même fait la pression artérielle pour une longue période (heures et/ou jours). Cet effet à long-terme est également plus puissant que le mécanisme de vasoconstriction aiguë dans un retour éventuel de la pression artérielle à la normale après une chute de pression sanguine (35). L'ang II est donc reconnu pour causer une puissante augmentation de la pression sanguine systémique et

locale via des actions vasoconstrictrices (5;14-16) et influencer les tubules rénaux à retenir le sodium et l'eau (12;16).

Les actions locales de l'ang II sont primordiales à l'homéostasie systémique. L'ang II joue un rôle critique sur l'effet de la hausse de la pression sanguine, l'hémodynamique intrarénale (1;51). La constriction de l'artériole efférente par l'ang II réduit le débit sanguin rénal en augmentant la filtration glomérulaire par la hausse de la pression dans les capillaires glomérulaires. Des changements dans les pressions tubulaires accélèrent le mouvement du sodium et des fluides du tubule proximal dans l'interstitium et dans la circulation systémique via les vaisseaux rénaux (1). L'ang II joue aussi un rôle critique dans l'homéostasie électrolytique (81) en augmentant la réabsorption du sodium à travers les actions de la pompe Na^+/K^+ (5;6).

Ce peptide agit à plusieurs autres niveaux et joue un rôle majeur dans la régulation hémodynamique et la fonction tubulaire dans la médulla (9). Il joue aussi un rôle dans l'hypertrophie cardiovasculaire dans les fibroblastes cardiaques, les myocytes et les cellules de muscle lisse vasculaire (14;56). Il active aussi les cellules mésangiales et tubulaires, et les fibroblastes interstitiels induisant de l'hyperplasie/hypertrophie (15). L'ang II, de plus, stimule la transcription et la synthèse du collagène dans les cellules du tubule proximal en culture (55), ainsi que la sécrétion de facteurs de croissance et des composants de la matrice (14). Il est, finalement, suggéré que l'ang II joue un rôle important dans l'organogénèse rénale (57).

De récentes études montrent que l'ang II est aussi un facteur de croissance (5;17) possédant des propriétés comme les cytokines (17). Toutefois, la classification indiquant quelle substance est un facteur de croissance est récemment devenu assez arbitraire car des substances vasoactives telles l'ang II, l'endothéline ou les chémokines pourraient toutes exercer des actions stimulant la croissance des cellules rénales (58). Le niveau cellulaire d'ang II module la contraction, régule la croissance cellulaire, l'apoptose et la différenciation, influence la migration cellulaire et la déposition de la matrice extracellulaire, stimule l'inflammation ainsi que la production d'autres facteurs de croissance et transactive des récepteurs à facteur de croissance, (EGFR, IGFR) (17).

Un bon nombre de découvertes *in vitro* et *in vivo* sur les fonctions de l'ang II ont montré que l'ang II cause directement la croissance cellulaire, régule l'expression génique de diverses substances bioactives (hormones vasoactives, facteurs de croissance, composants de la matrice extracellulaire, cytokines et plus) et active les cascades de signalisations intracellulaires (cascades MAPK, tyrosine kinase, divers facteurs de transcription et plus) dans les cellules cardiovasculaires et rénales. En plus, l'ang II peut directement causer des maladies cardiovasculaires et rénales, indépendamment de son effet sur l'élévation de la pression sanguine (16). Il est donc maintenant bien reconnu que l'ang II a plusieurs autres actions en plus, des réponses hémodynamiques observées.

La capacité du rein à générer de hautes concentrations interstitielles et intratubulaires d'ang II (49), et à accumuler l'ang II dans les compartiments intracellulaires (36), permet aux reins de réguler les niveaux intrarénaux en accord avec l'homéostasie nécessaire à la régulation de l'hémodynamie rénale, la réabsorption et le transport tubulaire et la régulation de la balance en sodium (59).

Bref, ce peptide induit de multiples réponses physiologiques dans différents types cellulaires. En ajoutant à cela ces effets vasoconstricteurs, on renforce la notion que l'ang II joue un rôle central non seulement dans l'hypertension, mais aussi dans les maladies cardiovasculaires et rénales (12). L'hypertension cause des changements structuraux dans le rein, dont l'hypertrophie cellulaire et l'accumulation de la matrice extracellulaire, qui ont été attribués aux changements hémodynamiques associés au stress mécanique et aux facteurs comme l'ang II et TGF- β (44). Effectivement, une multitude de faits semblent indiquer l'importance de l'ang II dans la pathophysiologie des maladies rénales chez les humains.

2.5 Récepteurs de l'ang II

L'action biologique majeure de l'ang II dans le rein et le système entier est régie par deux types de récepteurs de la surface cellulaire. Il s'agit du récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT1) (AT1R) et du récepteur à l'angiotensine II de type 2 (AT2) (AT2R) (1;18). Le récepteur de l'ang II a d'abord été identifié comme une entité fonctionnelle par Lin et Goodfriend (1970), qui ont décrit la liaison de l'ang II radioionisé à ses sites récepteurs dans la glande surrénale (59). Les structures primaires des récepteurs ont été établies par

clonage et séquençage (19;60). Autant AT1 que AT2 sont des récepteurs appartenant à la large famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (4;45;60;61).

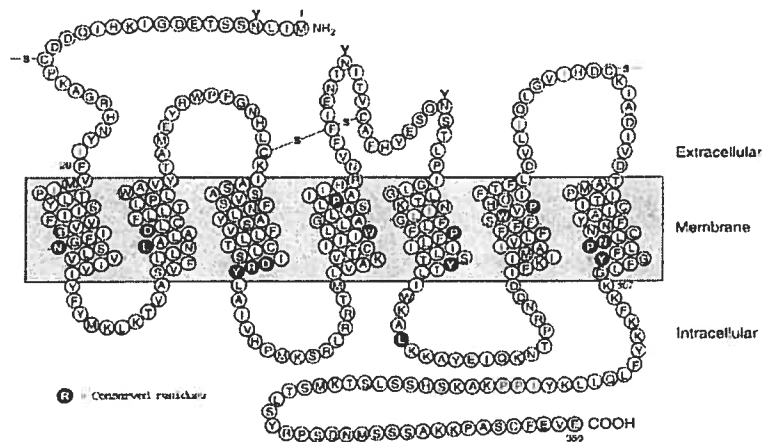


Figure 4. Structure secondaire et séquence d'acide aminé du récepteur AT1 du mammifère représentant la structure classique des récepteurs couplés à la protéine G (GPCRs). (Tiré de De Gasparo et *al* (59))

Le récepteur AT1 a été cloné dans deux laboratoires dès 1991 (12). De plus, les approches pharmacologiques (12;60) et moléculaires (60) ont confirmé l'existence de deux sous-types des récepteurs (12). En effet, les deux isoformes ont été divisés autant sur la base de leurs pharmacologie et fonction que de leur caractère structural (45). Ils sont donc bien caractérisés. Il semblerait exister deux autres récepteurs potentiels de l'ang, soit AT3 et AT4, cependant, ils ne sont pas inclus dans la classification définitive (19).

Les deux récepteurs à l'angiotensine partagent plusieurs similitudes. Ce sont tous deux des polypeptides contenant environ 360 acides aminés (1;12) qui sont couplés aux protéines G. Pourtant, leurs gènes sont situés sur différents chromosomes, le gène d'AT1 humain étant localisé sur le chromosome 3 (1;16) et celui d'AT2 sur le chromosome X. Leurs gènes partagent une homologie de séquence d'environ 30 % (1), tout comme l'homologie au niveau des protéines (55;62). En conséquence, ces deux récepteurs sont distincts du point de vue fonctionnel, ils utilisent donc des voies de transduction du signal différentes (1).

Les rongeurs (rats et souris) possèdent deux sous-types du récepteur AT1, soit AT1A et AT1B (16;63). Les gènes des récepteurs AT1A et AT1B sont localisés, chez le rat, aux chromosomes 17 et 2, respectivement. Ils ont une homologie de séquence en acides aminés

de l'ordre de 94 % et ont des propriétés pharmacologiques (16). Seuls les rongeurs expriment ces 2 sous-types (57). Aussi rien ne laisse supposer l'existence de sous-types pour le récepteur AT2 (57).

2.5.1 Distribution tissulaire

L'expression du récepteur AT1 est la même, un mois après la naissance ou à l'âge adulte (42). Le récepteur AT1 est omniprésent et abondamment distribué. Ce récepteur est retrouvé d'un bout à l'autre du système cardiovasculaire, rénal, endocrinien et nerveux chez l'humain (19). Dans le tissu adulte, on le retrouve plus exactement dans le réseau vasculaire, les glandes surrénales, le cœur, le foie, le cerveau (1;16), les poumons (16) et les reins (1;16). Les actions complexes et étendues de l'ang II sur la fonction rénale sont dues à une distribution générale des récepteurs à l'ang II dans divers types cellulaires dans le rein (9;36). En fait, des études utilisant des anticorps polyclonaux et monoclonaux du récepteur AT1 ont identifiés une grande quantité de récepteurs localisés dans le rein en entier (9). Ils sont nombreux dans les petites artères corticales, le glomérule (59) ou les podocytes glomérulaires, l'interstitium (59) ou les cellules interstitielles (36), et les membranes de la bordure en brosse et basolatérales des tubules proximaux (9;34;59). Une localisation luminale des récepteurs AT1 est aussi observée tant sur les segments proximaux que distaux du néphron et autant dans les régions corticales que médullaires (9).

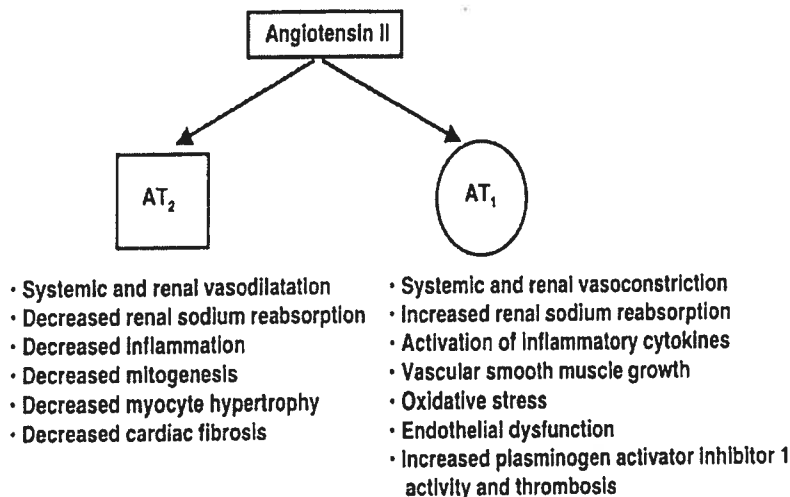
Chez le rat, le récepteur AT1A (49), ainsi que son ARNm (64), est prédominant dans la plupart des tissus, dont tous les segments du néphron (9;63). Mais à l'opposé, les récepteurs AT1B sont aussi hautement exprimés dans le glomérule (63).

Des études utilisant des anticorps polyclonaux et monoclonaux (9) du récepteur AT2 ont été réalisées et ont permis de localiser une quantité moindre de récepteur AT2 dans les reins adultes, on en retrouve quand même dans le tubule proximal (9;36), le tube collecteur et plusieurs dans le réseau vasculaire (36). Chez l'adulte sain, le récepteur AT2 est présent seulement dans la médulla surrénalienne, l'utérus, les ovaires, l'endothélium vasculaire, certaines parties distinctes du cerveau (16), le pancréas, les reins (17) et le cœur. On le retrouve au contraire abondamment distribué dans les tissus fœtaux en développement (1;16), cependant, l'expression du récepteur AT2 diminue rapidement après la naissance

(16;17;19). En effet, une fois la maturation complétée, l'expression des récepteurs AT2 est réduite et disparaît au cours de la seconde semaine post-natale. D'un autre côté, l'expression des récepteurs AT1 augmente dans les régions plus matures, devenant prédominant après la première semaine après la naissance (42;57). Par contre, le récepteur AT2 est réexprimer chez l'adulte à la suite d'une défaillance cardiaque et vasculaire ou pendant la guérison d'une blessure ou d'une obstruction rénale, suggérant que ce type de récepteur joue un rôle dans le remodelage tissulaire, la croissance et/ou le développement (17;19). Dans le cas des maladies rénales, le rôle des récepteurs AT2 reste donc à être défini (19).

2.5.2 Rôles du récepteur AT1

La grande majorité des actions physiologiques de l'ang II, tel que la régulation de la pression sanguine et la balance hydro-électrolytique, sont effectuées par AT1 (19). Il dirige les actions hémodynamiques et les effets mitogéniques de l'ang II dans le rein et les fonctions endocrines (1). Le rein étant un organe cible majeur de l'ang II et la plupart de ses actions semblent être expliqué par les fonctions du récepteur AT1 (59). La très grande abondance des récepteurs AT1 dans le rein est complémentée par le niveau plus élevé d'ang II tissulaire que plasmatique (9). L'ang II joue donc un rôle important dans la fonction de réabsorption du tubule proximal, principalement via l'activation du récepteur AT1 (43).



Les actions hypertensinogéniques de l'ang II sont principalement attribuées au récepteur AT1 (9;36), à cause de ses multiples effets vasculaires et de transports (9). L'ang II agit directement à travers les récepteurs AT1, indirectement à travers le relargage d'autres facteurs, et via des interactions avec les voies de signalisation intracellulaire de d'autres agents vasoactifs, facteurs de croissance et cytokines (17). Les récepteurs AT1 sont couplés à de multiples cascades de signalisation spécifiques menant à diverses actions biologiques. AT1 est reconnu aussi comme étant l'un des plus puissant stimulateurs du remodelage hypertrophique des vaisseaux sanguins et de la paroi ventriculaire cardiaque (20). Il est aussi impliqué dans l'effet promoteur de la croissance, des processus fibrotiques, thrombotiques et inflammatoires à travers l'activation des diverses voies de transduction du signal, dont la mobilisation du calcium, l'activation de protéine kinase, et la production de ROS (19).

Puisque la signature de la liaison de récepteurs AT1A et AT1B sont identiques, il est impossible de distinguer leurs fonctions avec l'utilisation d'antagonistes pharmacologique (63). Le rôle critique des récepteurs AT1A dans la régulation de la pression sanguine a été confirmé par le développement d'une souris knockout du récepteur AT1A. Effectivement, cette souris montre une pression sanguine faible et des altérations dans l'habilité pour la prise de sodium par le rein et la capacité à concentrer l'urine comparativement aux souris contrôles (63). À l'opposé, une souris knockout du récepteur AT1B ne montre aucun phénotype anormal. Toutefois, il a été montré qu'en l'absence des récepteurs AT1A, AT1B peut remplacer partiellement la fonction des récepteurs AT1A dans la régulation de la pression sanguine et dans la médiation des effets dans le réseau vasculaire rénal. Les récepteurs AT1B compensent donc partiellement pour l'absence des récepteurs AT1A (63).

2.5.3. Rôles du récepteur AT2

Le récepteur AT2, quant à lui, possèdent des effets vasodilatateurs et antiprolifératifs et règle le développement des organes fœtaux (1). En contraste avec les récepteurs AT1 qui stimulent la croissance, l'ang II peut induire de l'apoptose à travers les récepteurs AT2 selon les conditions de croissance (57;65). Les récepteurs AT2 semblent donc être impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et le

développement, l'angiogénèse, le rétablissement des blessures, la régénération tissulaire et également l'apoptose (62).

Le récepteur AT2 interagit avec et module les actions perpétrées par le récepteur AT1, comme antagoniste à plusieurs de ces effets (1;17). Par exemple, la délétion du récepteur AT2, dans une souris traitée avec un inhibiteur de la synthase d'oxyde nitrique (NOS), est associée à l'hypertension et à une réduction de l'excrétion de l'eau et du sodium. Par contre, une souris ayant un récepteur AT2 intact demeure normotensive et maintient une homéostasie normale de l'eau et du sodium (1). Il a été montré que l'activation des récepteurs AT2 diminue la pression sanguine à travers le relargage d'oxyde nitrique (NO) (55). De plus, il est suggéré que l'activation des récepteurs AT2 joue un rôle protecteur dans la régulation de la pression sanguine, qui s'oppose aux actions hypertensinogéniques de l'ang II agissant à travers les récepteurs AT1 (63).

2.5.4. Régulation

La sous-régulation des récepteurs AT1 et AT2 est observée après une stimulation à l'ang II, et cet effet est renversé à la suite d'un traitement avec un antagoniste du récepteur AT1 (66). Dans les modèles hypertendus, la régulation des récepteurs intrarénaux est complexe puisque les récepteurs vasculaires et tubulaires répondent différemment à des hautes concentrations d'ang II. En général, les taux élevés d'ang II sont associés avec une diète faible en sel, diminuant l'expression des récepteurs AT1 mais augmentent les niveaux des récepteurs AT1 tubulaires (46). Il est suggéré que la surrégulation des récepteurs AT1 dans les multiples cellules rénales apporte une contribution à la pathogénèse de l'hypertension (46). L'activation du récepteur AT1 dans le rein contribue à l'hypertension à travers la rétention de sodium (1), compte tenu que la réduction du sel augmente l'ARNm du récepteur AT1 et la densité de ce récepteur dans le tubule proximal (44).

Des données *in vitro* et *in vivo* supportent le concept que l'ang II, par le récepteur AT1, peut participer directement dans la pathogénèse de diverses maladies cardiovasculaires et rénales (16). En effet, les actions moléculaires et cellulaires de l'ang II dans les maladies cardiovasculaires et rénales sont presque exclusivement provoquées à travers le récepteur AT1 (16). Au cours des dernières années, de puissants antagonistes non peptidiques du

récepteur AT1 ont été développés, tels que le losartan et le valsartan et sont utilisés pour le traitement clinique de l'hypertension (16). Des études ont montré que l'administration d'agoniste du récepteur AT2 potentialise l'action anti-hypertensive du blocage du récepteur AT1 dans les rats spontanément hypertendus et diminue la pression sanguine dans les rats normotendus. Les récepteurs AT1 sont donc sélectivement bloqués par les biphenylimidazoles (losartan) alors que les tetrahydroimidazopyridine (PD122219) inhibent spécifiquement les récepteurs AT2 (16;17).

3. Le rein

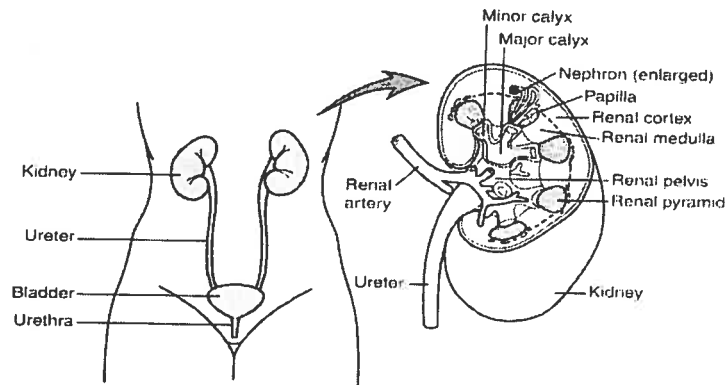
« Les os peuvent se fracturer, les muscles s'atrophier, les glandes se dérégler. Le cerveau, quant à lui, peut s'endormir sans menacer immédiatement la survie. Par contre, si les reins viennent à manquer...ni les os, ni les muscles, ni les glandes, ni le cerveau ne peuvent continuer à fonctionner. »Voilà ce que déclarait le regretté Dr. Homer Smith, spécialiste réputé des fonctions rénales, dans son livre intitulé « Fish to Philosopher. » (26)

Cette réflexion en dit énormément sur l'importance centrale et primordiale de la fonction des reins dans l'ensemble du corps humain et animal, le désignant comme un organe vital.

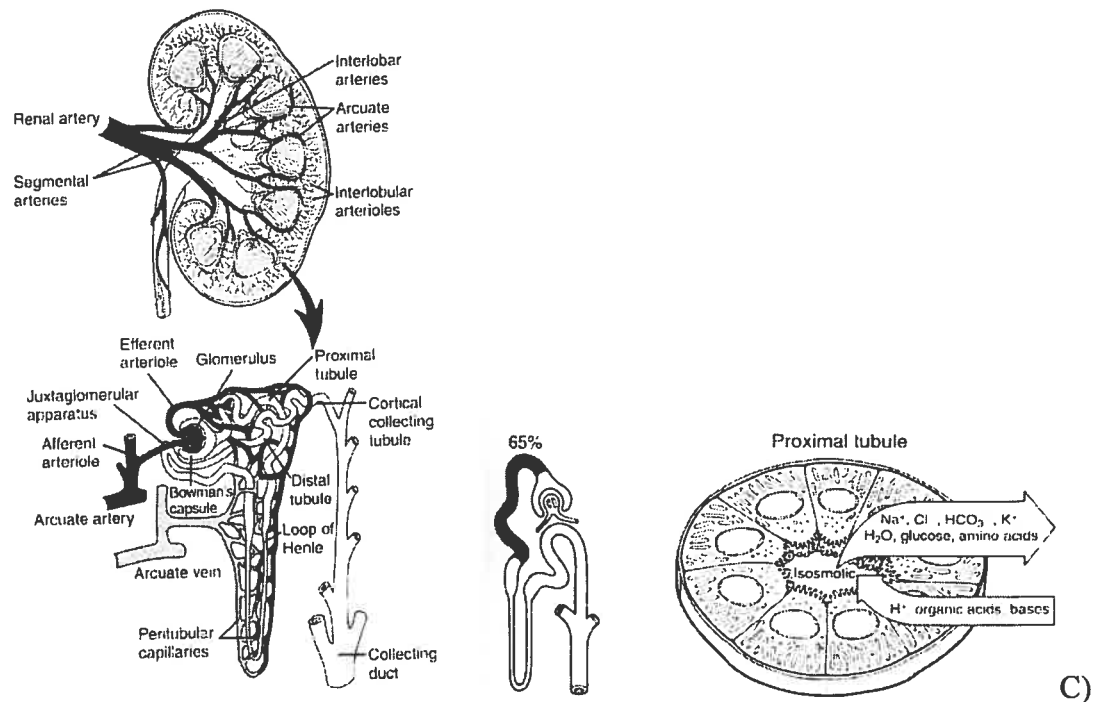
3.1 Anatomie et physiologie

Tout d'abord, les reins sont des organes pairs, c'est-à-dire étant au nombre de deux et ont la forme d'un haricot. Ils sont d'une longueur d'environ 10 cm chacun chez l'humain (67). Bien que les reins représentent moins de 1 % de la masse corporelle du corps humain, ils reçoivent environ 20% du sang propulsé par chaque battement de cœur. L'urine, est le déchet métabolique liquide formé dans les reins (67).

A)



B)



C)

Figure 6. (A) Position et organisation des reins et du système urinaire. (B) Section de rein montrant les vaisseaux majeurs desservant les reins en sang et schéma de la circulation dans chaque néphron. (C) Représentation de la structure cellulaire du tubule proximal. (Tiré de Guyton et Hall (35)).

Les reins sont composés de plus d'un million néphrons (27;67), représentant environ 80 Km de tubules (67) disposés de façon radiale. Les néphrons constituent les unités fonctionnelles du rein (67). Ils sont de minuscules unités de filtration du sang où se déroulent les processus menant à la formation de l'urine (27). Les reins sont composés de deux régions fonctionnelles, le cortex externe et la médulla interne (67). Il existe donc des néphrons juxtamédullaires possédant de longues anses qui s'étendent dans la médulla rénale, alors que les néphrons corticaux se trouvent seulement dans le cortex rénal. La plupart des néphrons (85%) sont des néphrons corticaux, car seulement une petite portion de leur anse s'enfoncent dans la médulla rénale externe. Les autres néphrons, les néphrons juxtaglomérulaires, ont une structure quelque peu différente, et ils jouent un rôle important dans la capacité des reins à produire de l'urine concentrée (27). La structure d'un néphron consiste en un corpuscule rénal et un tubule rénal bordé de vaisseaux sanguins. Le tubule rénal mesure approximativement 3 cm de long. Les principales régions du tubule rénal sont le tubule contourné proximal, les parties descendantes et ascendantes de l'anse du néphron, et le tubule contourné distal qui se jette dans un tubule rénal collecteur desservant de nombreux autres néphrons (27).

L'artère rénale apporte au rein de 1100 jusqu'à 2000 L de sang par jour. Le sang est ensuite retourné à la circulation systémique par la veine rénale. Les néphrons transforment approximativement 180 L de ce volume en filtrat et excrètent seulement 1,5 L d'urine. La différence (99 % d'eau) est réabsorbée par le sang. Les reins équilibrent la composition du sang et produisent l'urine comportant les déchets métaboliques (67).

3.2 Fonctions

Les reins accomplissent des fonctions cruciales qui touchent l'ensemble des parties de l'organisme. Les reins sont ainsi qualifiés comme étant les maîtres-chimistes de l'organisme (26).

Ils ont une multitude de fonctions comme l'excrétion de déchets métaboliques, de produits chimiques étrangers, drogues, la régulation des balances hydrique et d'électrolyte, la régulation de l'osmolalité de fluide métabolique et des concentrations d'électrolytes, la concentration de l'urine, la régulation de la balance acide-base, la régulation de la pression

artérielle, la sécrétion, le métabolisme et l'excrétion d'hormones et enfin la gluconéogenèse (35).

L'ajustement simultané de la composition du sang se divise principalement en trois processus. La filtration glomérulaire s'effectue dans les glomérules, qui jouent le rôle de filtres non sélectifs. La réabsorption tubulaire et la sécrétion tubulaire, sont soumises à des mécanismes de régulation rénaux et hormonaux précis, relevant des tubules rénaux (27).

Suite à la filtration glomérulaire, une grande proportion du filtrat est réabsorbée. Ce second processus atteste que des reins en santé réabsorbent presque tous les nutriments organiques (glucose et acides aminés) pour maintenir ou encore rétablir les concentrations normales dans le plasma. D'ailleurs, les reins ajustent la quantité d'eau et d'ions réabsorbés en réaction à des signaux hormonaux. Ce processus de réabsorption peut requérir, selon les substances transportées dans le filtrat, de l'énergie sous forme d'ATP (réabsorption active) ou non (réabsorption passive) (27).

Les cellules tubulaires sont incapables de réabsorber certains solutés filtrés, ce qui constitue l'un des deux principaux facteurs de l'élimination des substances indésirables du plasma. La sécrétion tubulaire en est un autre (68). Ce troisième processus, la sécrétion tubulaire, s'effectue non seulement dans le tubule contourné proximal, mais aussi dans la partie corticale du tubule rénal collecteur et dans le segment qui relie cette partie au tubule contourné distal. En conséquent, l'urine est composée autant de substances filtrées que sécrétés (27).

Le tubule contourné proximal participent en grande partie à la réabsorption et la sécrétion. Il participe aussi au maintien d'un pH constant dans les liquides biologiques et ce, par la régulation de la sécrétion de protons (H^+). De plus, les médicaments et les substances toxiques transformés par le foie sont sécrétés dans le filtrat par les cellules de l'épithélium du tubule contourné proximal. Néanmoins, les nutriments comprenant le glucose et les acides aminés, sont transportés par un processus actif du filtrat au liquide interstitiel. Or, sans le processus de réabsorption, ces nutriments seraient éliminés avec l'urine (67).

La réabsorption de l'eau et du NaCl représente l'une des fonctions les plus importantes du tubule contourné proximal. En effet, environ 70 % de l'eau et 75% du NaCl traverse du sang au tubule rénal lors de la filtration qui sont ensuite réabsorbées à travers l'épithélium du tubule contourné proximal (35;44). Les membranes transportent le Na^+ de l'intérieur des cellules vers le liquide interstitiel. Les électrolytes, quant à eux, circulent du filtrat au liquide interstitiel, tandis que l'eau suit de manière passive par osmose (67). Ainsi dans des conditions normales, 65 % de la charge filtrée de sodium et d'eau et le faible pourcentage de chlore filtré, sont réabsorbés par le tubule proximal et ce, avant d'atteindre l'anse de Henlé. Ces pourcentages peuvent tout de même être augmentés ou réduits dans différentes conditions pathologiques (35).

En plus de maintenir l'homéostasie, de filtrer le plasma et de garder l'équilibre chimique du sang, les reins produisent aussi une enzyme appelée rénine. Cette enzyme régule la pression artérielle ainsi que la fonction rénale (27). En fait, deux mécanismes rénaux, l'un direct et l'autre indirect, influencent la régulation à long-terme de la pression artérielle. Le mécanisme direct est relié aux changements du volume du sang. Quand le volume sanguin ou encore la pression artérielle augmente, les reins rejettent beaucoup d'eau. À ce moment, une réduction du volume sanguin est observée ainsi qu'une diminution de la pression et vice versa, lorsque la pression ou le volume du sang est faible, les reins conservent l'eau et la retournent dans la circulation systémique (27). Le mécanisme rénal indirect fait plutôt intercéder le RAS. Quand la pression artérielle s'affaiblit, les cellules spécialisées de l'appareil juxta-glomérulaire retrouvées dans les reins la rénine dans le sang. Elle active la cascade du RAS (figure 1) qui se termine par la formation d'ang II. L'ang II stimule alors la libération de l'aldostérone, qui elle, est produite par les corticosurrénales. Cette hormone encourage la réabsorption rénale du sodium. La réabsorption de l'eau étant proportionnelle à celle du sodium,, le volume sanguin augmente et la pression artérielle s'élève (27). Malgré que le RAS collabore à l'autorégulation rénale, sa première fonction est surtout de stabiliser la pression artérielle du système et le volume du liquide extracellulaire (27).

3.3 Maladies rénales

Dans des conditions normales, le rein peut hausser amplement sa quantité de travail. Mais dans une situation où il n'y a qu'un seul rein restant, ce dernier peut augmenter son volume

et faire le travail pour les deux. Cependant, un arrêt complet des deux reins entraîne une accumulation des déchets et liquides dans le corps et il est alors nécessaire, pour ne pas dire obligatoire, de recourir à la dialyse ou bien à la transplantation rénale (26).

Les maladies des reins sont parmi les plus importantes causes de mort et de d'incapacité dans plusieurs pays à travers le monde. En 1999, on estime que plus de 20 millions de personnes aux États-Unis souffraient d'une maladie rénale (35), alors qu'au Canada 1,9 millions de personnes seraient atteintes de maladies rénales chroniques. La plupart des gens l'ignorant car la maladie est asymptomatique (69).

Il existe deux catégories de maladie rénale sévère soit les dommages rénaux aigus et les dommages rénaux chroniques. Dans le premier cas, les reins arrêtent abruptement de travailler, mais peuvent éventuellement recouvrir une fonction presque normale. Alors que dans le second cas, il s'agit d'une perte progressive de la fonction d'un nombre de plus en plus grand de néphrons, diminuant graduellement la fonction rénale en entier. Dans ces deux catégories, un vaste étalage de maladies rénales spécifiques peut affecter les vaisseaux sanguins des reins, le glomérule, les tubules, l'interstitium rénal et les parties des régions urinaires (35).

Il existe trois causes principales de dommages rénaux aigus : dommage pré-rénal, intrarénal et post-rénal (35). Tandis que les dommages rénaux chroniques résultent d'une perte irréversible d'un grand nombre de néphrons fonctionnels, le rein ne pouvant en générer de nouveaux. Les symptômes cliniques sérieux n'apparaissent habituellement que lorsque le nombre de néphrons tombe à moins de 70% de la normale (35). Malheureusement, les maladies du rein progressent insidieusement et détruisent souvent une bonne partie de la fonction rénale avant que les symptômes apparaissent (26). L'adaptation des néphrons restants dans lesquels le processus de croissance joue un rôle crucial, cause ultimement une détérioration irréversible de la fonction rénale, qui se caractérise morphologiquement par des changements fixes de glomérulosclérose et de fibrose tubulointerstitielle. Les mécanismes exacts responsables de ces changements ne sont pas connus, mais impliquent aussi bien l'hypertrophie (la croissance de diverses structures des néphrons survivants), que des changements fonctionnels, qui diminuent la résistance vasculaire et la réabsorption tubulaire dans les néphrons survivants. En fait, il est

suggéré que les protéines filtrées à travers la barrière du capillaire glomérulaire pourraient avoir une toxicité rénale et contribuer à la progression des dommages rénaux. La réabsorption des protéines filtrées active l'épithélium des cellules du tubule proximal et cette activation tubulaire, en réponse au stress protéique, code pour des gènes de substances vasoactifs et inflammatoires et synthétise les protéines produites correspondantes (70). Donc, après plusieurs années, ces changements augmentent la pression glomérulaire et endommagent le reste des néphrons fonctionnels, contribuant d'autant plus à la détérioration de la fonction rénale. (1;70;71).

Les dommages chroniques du néphron résultent alors souvent dans une hypertrophie compensatrice du reste de la structure du rein. Tous les constituants structuraux du néphron sont impliqués dans l'hypertrophie, celle des cellules du tubule proximal compte principalement, en terme quantitatif, pour le composant principal. Les mécanismes induisant l'hypertrophie cellulaire du tubule proximal ne sont pas complètement compris, et fondamentalement différents de l'hyperplasie cellulaire, qui advient après une nécrose tubulaire intense (21;23;72-75). Toutefois, l'hypertrophie initiale est adaptative, mais par la suite devient maladaptative (21-23) à travers des mécanismes variés, incluant la génération de ROS, la sécrétion de cytokines proinflammatoires, l'expression d'autoantigènes potentiels et probablement la transdifférenciation dans les fibroblastes sécrétant du collagène. La conséquence est l'atrophie tubulaire et la fibrose interstitielle (23;23;76). Il est bien connu que sans égard de la première cause de défaillance rénale, la maladie rénale chronique mène souvent à la fibrose rénale et au stade terminal de maladie rénale (77).

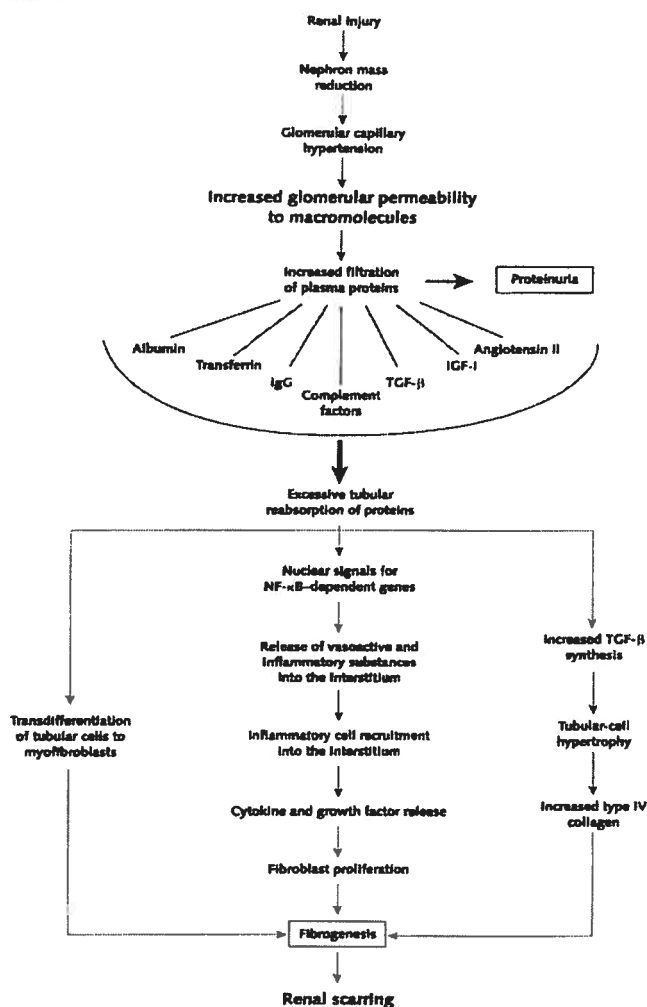


Figure 7. Évolution de la maladie rénale. (Tiré de Remuzzi et *al* (70)).

On estime à environ 975 patients par million souffrant de maladie rénale en dernier stade aux États-Unis seulement (78).

Et bien que la qualité du traitement de dialyse se soit amélioré d'une façon marquée dans la dernière décennie, les patients avec le stade terminal de la maladie rénale subissent une dialyse maintenue et présentent encore une haute mortalité et morbidité. Donc, le développement de stratégies thérapeutiques pour prévenir, ou au moins ralentir la progression de maladie rénale chronique est essentiel (78).

D'abord, la glomérulonéphrite sous toutes ces formes, puis, le diabète et l'hypertension sont reconnus comme menant au stade terminal de maladie rénale (35). Près de 90 % des

sujets présentant une insuffisance rénale ont des antécédents d'hypertension artérielle. Il est bien prouvé que plus le niveau de pression artérielle est important et plus le risque de présenter une insuffisance rénale est grand. Ainsi, un patient hypertendu a entre 2 et 10 fois plus de risques de développer une insuffisance rénale comparativement à un sujet qui n'a pas d'hypertension artérielle (24). De plus, la mortalité causée par les maladies cardiovasculaires est plus de 3 fois plus élevée chez les sujets en dernier stade de maladie rénale que chez les sujets avec une fonction rénale normale (77).

3.4 Maladies rénales et hypertension

L'hypertension peut exacerber les dommages aux vaisseaux sanguins et aux glomérules des reins et vice versa, les anomalies de la fonction rénale peuvent causer l'hypertension. La relation entre l'hypertension et les maladies rénales représente donc un cercle vicieux. Les dommages aux reins mènent à l'augmentation de la pression sanguine, laquelle cause à son tour davantage de dommages aux reins, menant à davantage d'augmentation de la pression sanguine. Pendant ce temps, le stade terminal de la maladie rénale se développe (35).

Deux mécanismes d'atteintes rénales peuvent expliquer une hypertension artérielle : l'atteinte de l'artère qui irrigue le rein de sang et l'atteinte du rein lui-même. La première survient lorsque l'artère qui apporte le sang au rein est bloquée ou présente un rétrécissement. Comme le sang arrive moins bien au niveau du rein, celui-ci va fabriquer des substances, la rénine et l'ang II entre autres, qui vont favoriser l'apport de sang dans le rein et entraîner une élévation de la pression artérielle. La seconde se manifeste par toutes les atteintes graves et chroniques du rein qui peuvent induire une hypertension artérielle. Les mécanismes de l'hypertension artérielle sont mixtes : d'une part, le rein réabsorbe plus de sel et d'eau et augmente la pression dans les artères, alors que d'autre part, le rein sécrète des substances qui contractent les artères responsables d'une augmentation de la pression artérielle (24).

Puis comme mentionné précédemment, l'hypertension artérielle endommage les vaisseaux sanguins dans les reins. Il en résulte une diminution de l'apport sanguin dans les reins qui

n'arrivent plus à débarrasser le sang des liquides et des déchets, d'où le risque d'insuffisance rénale (26).

Plusieurs études récentes ont montré que les inhibiteurs de ACE ralentissent la progression des maladies rénales, en réduisant la pression artérielle systémique. La production excessive d'ang II peut être associée à des dommages progressifs aux reins. (1;79). Un double blocage du RAS avec les inhibiteurs d'ACE et les bloqueurs de récepteurs de l'angiotensine peut donc fournir un bénéfice rénal supérieur à la thérapie avec un seul médicament (1). Ils peuvent donc fournir une approche thérapeutique rationnelle pour atténuer la progression d'une variété de maladies rénales (80).

4. Cellules immortalisées de tubule proximal de rein de rat (IRPTC).

Dans le rein, les cellules du tubule proximal sont le site principal de la synthèse locale (intrarénale) d'AGT et d'ang II. Cette synthèse locale permet une concentration intrarénale supérieure à la concentration plasmatique, comme mentionné à la section 2.3.1. La présence d'un RAS complet intrarénal, soit la rénine, l'angiotensinogène, l'angiotensine I et II, ACE, et les récepteurs AT1 et AT2, est bien établie. La production endogène d'ang II dans les tubules rénaux apparaît être intimement impliquée dans la modulation de la réabsorption du sel et de l'eau, du glucose et des acides aminés et peut jouer un rôle dans la croissance et la réparation des cellules. Ces cellules sont donc d'une grande importance dans l'obtention d'une homéostasie rénale et systémique. Néanmoins, le mode de fonctionnement du RAS des tubules proximaux n'est pas complètement compris (8).

Deux lignées cellulaires ont donc été développées. La première est une lignée de cellules immortalisées de tubule proximal de rat, obtenue par transfection avec un virus SV40 mutant sensible à la température. Ces cellules sont transformées à une température permissive (34°C), mais retournent à un état non transformé à la température non permissive (41°C). Toutefois, ni l'une ni l'autre de ces températures n'est convenable pour la culture cellulaire de routine (37°C). Cette température étant choisie car c'est celle du corps humain et il est important de la conserver afin que des mécanismes anormaux dus à la température ne soient observés. Une seconde lignée stable de cellules du tubule proximal à

croissance rapide a donc été mise au point en utilisant un plasmide avec une origine défectueuse SV40. Cette lignée cellulaire, transformée éternellement, c'est-à-dire stable, a une fonction distincte de la lignée de tubule proximal sensible à la température. Elle a été développée pour une utilisation à des fins expérimentales et où une grande quantité de matériel est nécessaire (8).

Les cellules ont été isolées de reins provenant de 4 à 5 rats Wistar mâles, âgés de 4 à 6 semaines. La transfection avec le plasmide SV40 a été faite par la méthode au calcium-phosphate. La lignée cellulaire, désignée 93-p-2-1, apparaît stable pour plus de 50 passages puisque les cellules conservent les caractéristiques morphologiques conséquentes et les marqueurs du tubule proximal. Les marqueurs du tubule proximal sont une légère immunocoloration pour la rénine dans le cytoplasme et à la surface cellulaire et une forte coloration pour l'AGT et ACE dans 90-95 % des cellules. De plus, des études indiquent que les cellules immortalisées du tubule proximal de rein de rat (IRPTCs) sécrètent de l'ang II. La lignée IRPTC (93-p-2-1) décrite ici exprime les enzymes et les protéines qui sont normalement présentes dans les cellules du tubule proximal normal (8) et exprime donc tous les composants du RAS : AGT, rénine, ACE et autant les récepteurs AT1 qu'AT2 (8;81).

Plusieurs études ont rapporté que le type AT2 est détecté dans les reins fœtaux de rat, mais qu'il disparaît lorsque le rein se développe. Pourtant, le récepteur AT2 peut être détecté dans les reins adultes des opossums. Donc, Ingelfinger et *al* ont pu démontrer par une liaison au récepteur et l'analyse de l'ARNm que cette lignée d'IRPTCs 93-p-2-1 exprime bel et bien le récepteur sous-type AT2. En conséquence, AT1 et AT2 sont tous deux exprimés dans cette lignée cellulaire tant à la membrane plasmique qu'au noyau des cellules du tubule proximal (8).

Finalement, cette lignée cellulaire du tubule proximal étant une représentation des cellules du tubule proximal retrouvée dans les reins, elles peuvent donc être utilisées comme modèle dans des études *in vitro* (8). Toutefois, il ne faut pas omettre de mentionner que les cellules immortalisées peuvent ou ne pas exprimer des facteurs ou enzymes retrouvés dans les cellules normales. Il est possible que le plasmide SV40 transfecté dans ces cellules modifie ces facteurs ou enzymes. Certaines caractéristiques comme l'inhibition de

contact, que ne possèdent plus les cellules immortalisées, le montre bien. Les IRPTCs peuvent bien être utilisés pour étudier comme les voies de signalisation, mais par la suite il est important d'effectuer ces mêmes expériences sur des cellules primaires soit non-transfectées et sur des animaux afin d'en vérifier les résultats.

5. Voies de signalisation

Les multiples actions de l'ang II sont provoquées via des voies de signalisation intracellulaire hautement complexes. Elles sont stimulées suite à la liaison initiale du peptide à son récepteur spécifique (AT1 ou AT2). Le terme voie de signalisation intracellulaire inclut des cascades moléculaires inter-reliées qui transmettent l'information du récepteur membranaire aux protéines intracellulaires qui régulent l'activité cellulaire (17). La liaison de l'ang II au récepteur est responsable de toutes les actions physiologiques de l'ang II (12). Elle conduit ainsi une multitude d'événements de signalisation et d'actions dans une multitude de tissus (17).

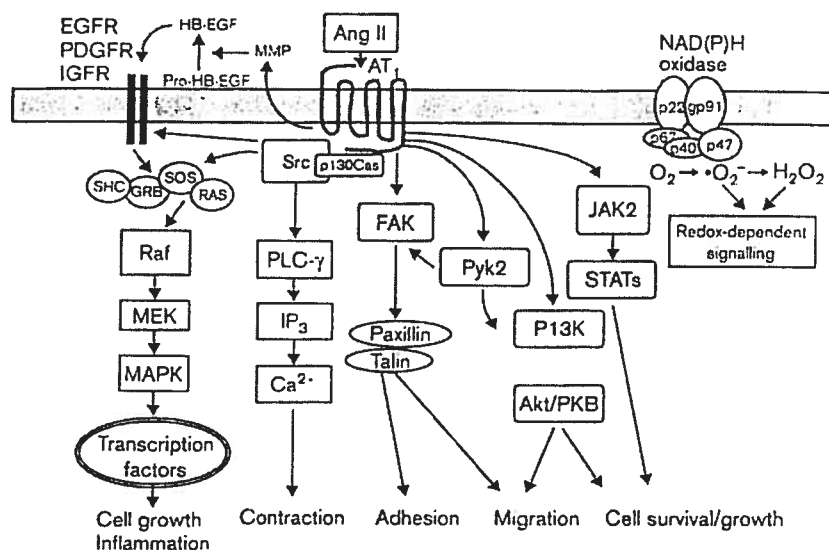


Figure 8. Voies de signalisation impliquées à travers les tyrosine kinases lors de la médiation par l'angiotensine II. (Tiré de Touyz et *al* (82))

5.1 Mécanisme de la liaison de l'ang II à ses récepteurs

Le processus est initié par la liaison de l'ang II à des récepteurs spécifiques, AT1 et AT2, sur les cellules cibles. Les récepteurs sont localisés sur la membrane plasmique des cellules

cibles. Quand l'ang II se lie à son récepteur, cela initie habituellement une cascade de réactions dans la cellule, avec une amplification à chaque étape, faisant que de petites concentrations d'ang II peuvent avoir un large effet (35;59).

L'ang II agit sur ces tissus cibles en formant un complexe hormone-récepteur altérant la structure du récepteur lui-même. Le complexe active le récepteur et initie les effets hormonaux (83). Il peut changer la perméabilité de la membrane, activer les enzymes intracellulaires et activer les gènes par liaison avec les récepteurs intracellulaires (35).

La liaison de l'ang II avec son récepteur permet le couplage du récepteur à la protéine G. Si la protéine G stimule le système adénylate cyclase- AMPc, elle est appelée une protéine G stimulatrice (Gs). Dans le cas contraire, elle est appelée G inhibitrice (Gi). La stimulation de l'adénylate cyclase, une enzyme liée à la membrane, par la protéine Gs catalyse la conversion de petites quantités d'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc dans la cellule. Ceci active la protéine kinase AMPc-dépendante, laquelle phosphoryle des protéines spécifiques dans la cellule, déclenchant des réactions biochimiques qui mènent ultimement à la réponse cellulaire à l'ang II (35). L'AMPc formé dans la cellule active habituellement une cascade d'enzymes. Donc l'ang II exerce son action intracellulaire en stimulant la formation d'un second messenger, l'AMPc, à la membrane cellulaire. L'AMPc, à son tour, cause les effets intracellulaires subséquents de l'ang II. Le seul effet direct de l'ang II sur la cellule est donc d'activer un type spécifique de récepteur membranaire. Le(s) second(s) messenger(s) fait le reste (35). En fait, seulement quelques molécules d'adénylate cyclase activées à la membrane cellulaire peuvent causer de plus en plus de molécules de la prochaine enzyme à être activées. Dans cette voie encore, une légère quantité d'ang II agissant sur la surface cellulaire peut initier une cascade puissante d'amplification activant la force de la cellule entière (35;74).

Si la liaison de l'ang II aux récepteurs est couplée à la protéine Gi, l'adénylate cyclase est bloquée, cela réduit la formation de l'AMPc et mène ultimement à une action inhibitrice dans la cellule. Donc, dépendant du couplage du récepteur hormonal à une protéine G stimulatrice ou inhibitrice, l'ang II peut augmenter ou diminuer la concentration d'AMPc et la phosphorylation de protéines clé dans la cellule (35;59).

L'action spécifique qui survient en réponse à une augmentation ou diminution d'AMPc dans chaque type cellulaire cible dépend de la nature de la machinerie intracellulaire car chaque cellule ne possède pas les mêmes enzymes. Il existe donc des fonctions différentes dans différentes cellules cibles comme, par exemple, l'initiation de la synthèse de produits chimiques intracellulaires spécifiques causant la contraction ou relaxation musculaire, l'initiation de la sécrétion par les cellules ou l'altération de la perméabilité cellulaire (35). Dans le cas des cellules épithéliales des tubules rénaux, une augmentation de leur perméabilité à l'eau est un effet de l'AMPc (35).

5.2 Protéine G

La superfamille des récepteurs couplés à la protéine G (GPCRs), provoque les réponses biologiques des cellules à divers stimuli extracellulaires tels que la lumière, les odeurs, les neurotransmetteurs, les amines biogéniques et les hormones (84). Les protéines G sont des modulateurs intracellulaires qui entraînent le signal d'information des récepteurs de la membrane activée aux enzymes effecteurs ou aux canaux ioniques (74).

Les récepteurs à l'angiotensine AT1 et AT2 appartiennent à cette famille (84;85). Lorsque l'ang II se lie au récepteur AT1, il y a induction d'un changement conformationnel dans la molécule du récepteur encourageant l'interaction avec la(les) protéine(s) G laquelle stimule à son tour la transduction du signal via plusieurs systèmes effecteurs de la membrane plasmique (84).

Ils sont composés de sept hélices à domaines transmembranaires (84;85). Les interactions de ces hélices avec les portions intracellulaire et extracellulaire de la molécule sont responsables de la liaison du ligand pour l'activation du récepteur (12). La formation du complexe ang II-AT1 entraîne un changement conformationnel menant à une association de ce dernier à la protéine G hétérotrimérique qui active l'échange GDP-GTP. Le déplacement de GDP par GTP cause la dissociation de la sous-unité α du complexes $\beta\gamma$, exposant ainsi le site de liaison pour l'adénylate cyclase de la sous-unité α (17;84). La sous-unité α se lie et active l'adénylate cyclase à produire plusieurs molécules d'AMPc. L'hydrolyse de la liaison GTP en GDP permet à la sous-unité α de se réassocier avec le

dimère $\beta\gamma$, et de se préparer pour une autre ronde d'activation régulée par le récepteur (86). Les protéines G modulent les activités de plusieurs molécules effectrices (84) et transmettent leurs signaux à travers l'adénylate cyclase (via G_i et G_s), la phospholipase C (PLC) (via $G_q/11$) et l'élévation du calcium cytoplasmique (20;84).

Afin d'activer plusieurs voies de signalisation intracellulaires conduisant aux réponses induites par l'agoniste dans une large variété de cellules cibles de l'ang II, le récepteur AT1 occupé par l'agoniste subit la désensibilisation et l'internalisation de la même manière que plusieurs autres GPCRs (59). Dans plusieurs cas, les réponses des cellules aux agonistes sont limitées par un quenching rapide ou une désensibilisation des signaux générée par les récepteurs couplés à la protéine G (GPCRs) activée. Les GPCRs activés sont aussi internalisés ou séquestrés dans les cellules et ils peuvent être ciblés aux lysosomes pour la dégradation protéolytique, ou re-sensibilisés et recyclés à la membrane plasmique, où ils redeviennent disponibles pour d'avantage de liaison au ligand (84). Lors de l'activation d'un grand nombre de récepteurs à la surface cellulaire, le récepteur induit par l'agoniste est internalisé. La liaison du ligand au récepteur couplé à la protéine G induit alors un mouvement latéral des complexes ligand-récepteur suivi par leur association avec des vésicules enrobées et leur internalisation subséquente. Une étude montre qu'autant AT1A que AT1B sont capables de subir l'internalisation après l'interaction avec l'agoniste peptidique ang II ou l'antagoniste, mais que l'antagoniste non peptidique est pauvrement internalisé (61). Ce processus a déjà été clairement démontré pour d'autres récepteurs liés à la membrane, tels que ceux pour la transférine ou l'EGF (61).

Ces dernières années, le rôle des GPCRs comme médiateurs importants de la croissance cellulaire et de la prolifération a été clairement reconnu via les GPCRs, plusieurs agonistes peuvent stimuler les voies de signalisation mitogéniques, l'expression de gènes associés à la croissance, la synthèse protéique et la prolifération cellulaire (87). Les protéines G couplées aux récepteurs AT1 enclenchent diverses voies de transduction du signal, incluant l'activation de phospholipases, l'inhibition d'adénylate cyclase, la stimulation de phosphorylation de tyrosine, et d'autres seconds messagers (55). De plus, la région carboxyl-terminale du récepteur AT1 semble pouvoir s'associer directement avec plusieurs des effecteurs en aval (45).

Dans le cas du récepteur AT₂, une association à une protéine G est controversée (16;55). Toutefois, un nombre d'études ont indiqué que l'activation des récepteurs AT₂ mène à une augmentation dans l'activité des protéines phosphatases (tyrosine phosphatase et sérine/thréonine phosphatase) (55;62;65) intracellulaires et implique certaines voies de signalisation des lipides (65), la phospholipase A₂, l'oxyde nitrique et la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (62). Considérant cela, les fonctions biologiques et les voies de signalisations de AT₂ ne sont pas encore complètement élucidées (19;62;65).

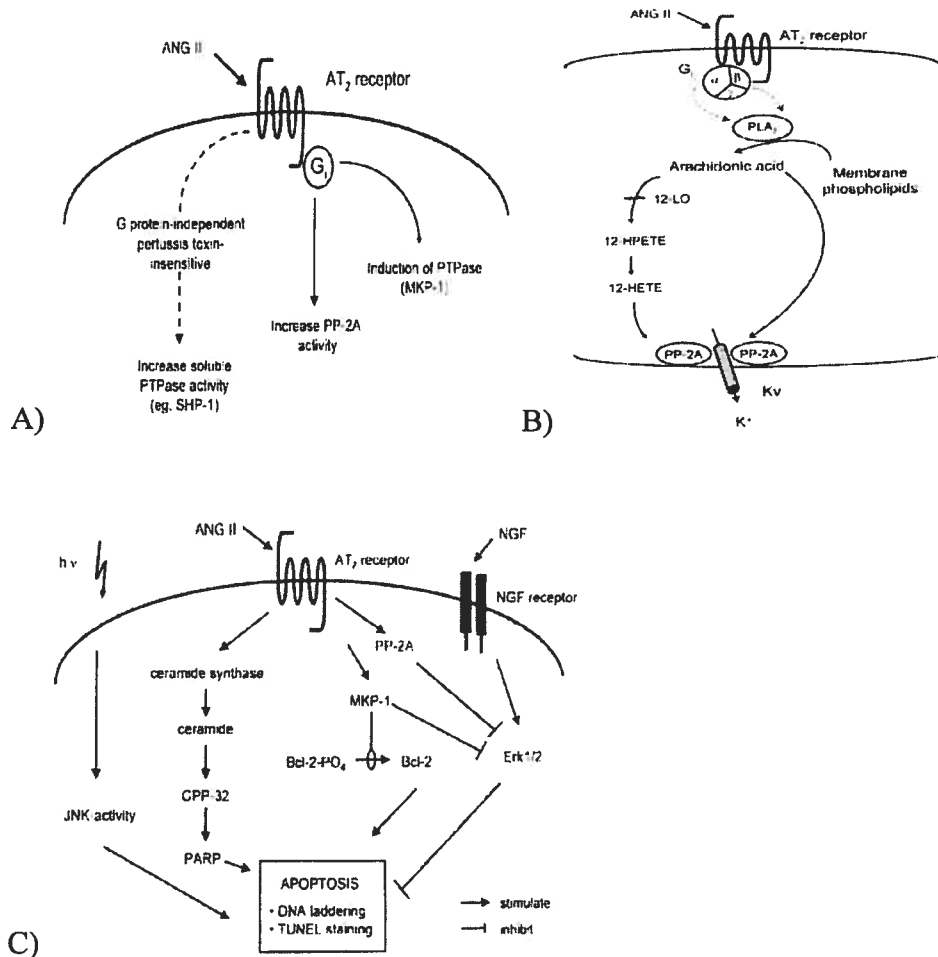


Figure 9. Voies de signalisation du récepteur AT₂ induit par l'ang II. (A) Stimulation des phosphatases. (B) Stimulation de la phospholipase A₂. (C) Activation des voies de signalisation de l'apoptose. (Selon Gallinat et al (88)).

Dans le rein, le couplage du récepteur AT₁, autant à G_q que G_i, indique pourquoi une diminution des niveaux d'AMPC et l'hydrolyse des phosphoinositides par la PLC sont des chemins importants par lesquels la stimulation de la prolifération cellulaire est accomplie.

L'ang II stimule aussi, au moins en partie, l'échange Na^+/H^+ dans le tubule proximal par l'activation de Gi, menant à une inhibition de l'adénylate cyclase ainsi qu'à la diminution des taux d'AMPc (44). Il est montré que le récepteur AT1 est couplé à l'adénylate cyclase par la protéine Gi sensible à la toxine de Pertussis, car cette toxine et d'autres agents augmentant l'AMPc intracellulaire abolissent la synthèse protéique qui est induite par l'ang II (78;83). AT1 est aussi couplé à G12 et Gq, et est responsable des effets traditionnels de l'ang II tel que la contraction, la rétention des fluides, les réponses d'hypertrophie et d'hyperplasie du système cardiovasculaire (56). Le récepteur AT1 (AT1A et AT1B) couplé à Gq mène à l'activation de la PLC qui, à son tour, clive les phosphoinositides membranaires pour générer du diacylglycérol (61;89;90) et de l'inositol-triphosphate (IP3) (89). Dans la voie classique, l'activation du récepteur AT1 résulte en une production rapide d'IP3 et un relargage plus soutenu de diacylglycérol. Le diacylglycérol, un activateur physiologique (17), active la protéine kinase C (PKC), alors que l'IP3 induit plutôt le relargage de calcium du réticulum sarcoplasmique (89). Ces seconds messagers, générés à travers le récepteur AT1, contribuent vraisemblablement à la fonction de vasoconstriction de l'ang II (91). De plus, la PKC, agit sur la régulation de l'expression génique, vis le complexe AP-1, de c-jun, de c-fos (4;85) et des MAPK. Cette activation aboutit à une augmentation globale de la synthèse protéique (4).

Cependant, le récepteur AT1 n'est pas seulement couplé aux voies bien reconnues de signalisation de la PKC et du calcium stimulé par Gq, mais aussi aux cascades de signalisation intracellulaires qui se prolongent dans le noyau. Ces voies régulent la transcription génique et l'expression des protéines qui contrôlent les réponses à la croissance et la prolifération cellulaire dans plusieurs tissus cibles de l'ang II (59).

5.3 MAPKs («Mitogen-activated protein kinase»)

L'activation de PKC résulte en l'activation de MAPK dans plusieurs systèmes (86). Les événements de signalisations dans les cellules rénales par l'ang II sont considérés émerger en différentes voies linéaires, où les cibles intracellulaires sont la phospholipase A (PLA) (distincte de la voie PLC/ (PKC)) et sont dépendantes des voies tyrosine kinase (TK)/ «mitogen-activated protein kinase» (MAPK). Il semblerait que ces cascades de signalisation intracellulaire majeures ne fonctionnent pas indépendamment et seraient

activement engagées dans des interactions (7;17). L'activation de la protéine G couplée aux récepteurs résulte en une stimulation de la voie des MAPK. Ceci inclut les récepteurs pour une variété de ligands peptidique et non-peptidique. Malgré des recherches considérables, les mécanismes précis impliqués dans une stimulation de la cascade MAPK par l'activation couplée à une protéine G ne sont pas connus, mais il est clair que les récepteurs couplés à la protéine G utilisent de multiples voies convergentes à l'activation de MAPK (86).

Les MAPKs sont une famille largement conservée de protéines kinases sérine/thréonine impliquées dans nombre de complexes cellulaires et régulatrices d'évènements, incluant la mitogénèse, la différenciation, la survie, la migration et les signaux au stress (64;90). Cette famille d'enzymes peut donc jouer un rôle intégral dans la croissance anormale observée dans les complications rénales (64). De plus, ils transduisent les signaux de la membrane cellulaire au noyau en réponse aux facteurs de croissance classiques, aux agonistes-récepteurs couplés à la protéine G et au stress cellulaire (11), contrôlent ainsi la réponse cellulaire à la croissance et l'apoptose (90).

Les MAPKs sont divisées en trois familles principales : 1) les kinases de signaux extracellulaire (p42/44 MAPK ou extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)), 2) les MAP kinases activé par le stress (p38 MAPK et c-Jun N- terminal kinase (JNK)) et 3) la grande famille MAPK (ERK5 ou BMK10) (11;17;91). Les MAPKs sont généralement activées par des stimuli extracellulaires distincts et phosphorylent différents substrats moléculaires (11;82).

Tableau 1. Stimulus et rôles des MAPKs.

MAPK	Stimulus	Rôle(s)	Référence(s)
ERK1/2	Facteurs de croissance, stimuli mitogéniques et GPCR	Impliquer dans la croissance cellulaire, la différenciation et le développement	(11;14;92)
P38 MAPK	Stress cellulaire (chaleur, chocs osmotiques, radiation UV et hypoxie/réoxygénation), cytokines inflammatoires, facteurs de croissances et GPCR	Influence la croissance, l'apoptose, la différenciation et l'inflammation	(11;14;17;34;93)
JNK	Stress cellulaire (chaleur, chocs osmotiques, radiation UV et hypoxie/réoxygénation), cytokines inflammatoires, facteurs de croissances et GPCR	Influence la croissance, l'apoptose, la différenciation et l'inflammation	(11)
ERK5	Stress, facteurs de croissances, stimuli mitogéniques et GPCR	Impliqué dans la synthèse protéique, la progression du cycle cellulaire, la croissance cellulaire et l'activation du facteur de transcription NFκB	(82;94)

La voie ERK1/2 est une cascade de protéines kinases qui lie les signaux de croissance et de différenciation initiant la transcription, résultant en des effets sur la prolifération cellulaire (64). Une augmentation d'activité de cette enzyme est généralement suivi d'une prolifération cellulaire (64). La stimulation de ERK1/2 initie des événements de phosphorylation menant à l'activation de facteurs de transcription tel que Elk-1 et c-fos (11). ERK1/2 est activé par des facteurs de croissance via la voie conservée Ras/Raf1/MEK/ERK1/2 (11;17). L'activation de la protéine Ras est GTP-dépendante. Si Ras est activé, il recrute et active la protéine kinase Raf, qui à son tour initie l'activation de MAPKK (MEK) et des molécules MAPK, et résulte ultimement dans l'activation de gènes de transcription nucléaire (11;86).

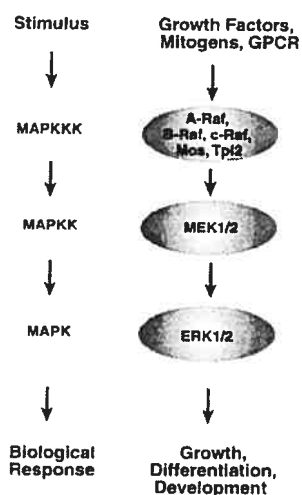


Figure 10. Voie de signalisation de la MAPK ERK1/2. (Tiré de Cell Signaling (95))

La stimulation de ERK1/2 par l'ang II est associée avec l'augmentation de l'expression des gènes précoces c-myc, c-fos (17;20) et c-jun, de la synthèse d'ADN, la croissance et différenciation des cellules et de l'organisation du cytosquelette (17). Le rôle de PKC dans l'activation de ERK1/2 par l'ang II reste mitigé (7) et il demeure une controverse quant à la sensibilité de ERK1/2 au stress oxydatif, qui varie avec le type cellulaire et le stimulus (11). En plus d'activer ERK1/2, l'ang II active aussi p38 MAPK et JNK (14).

Les MAPKs agissent principalement à travers le récepteur AT1 et plusieurs cascades de transduction du signal, dont les radicaux d'oxygène réactif et diverses protéines kinases ont permis d'établir un lien entre l'activation du récepteur AT1 et la régulation de la machinerie du cycle cellulaire (65).

Les membres de la super famille MAPK semblent être sensibles au potentiel rédox (96), et surtout aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) (82). Dans les VSMCs, les ROS intracellulaires sont critiques pour que l'ang II et l'endotheline-1 puissent activer p38 MAPK, JNK et ERK5, alors que la phosphorylation de ERK1/2 semble être insensible au rédox (82). Alors que dans d'autres cas, comme les cellules endothéliales microvasculaires cardiaques, l'ang II active ERK1/2 d'une manière sensible au rédox, mais pas p38 MAPK (96). La régulation rédox des MAPKs peut être spécifique à la fois au ligand et à la cellule (82).

L'activation de la voie ERK1/2 est nécessaire, mais n'est pas suffisante, à l'induction d'hypertrophie par l'ang II (11). En effet, des données semblent indiquer un rôle pour le O_2^- et le H_2O_2 dans l'hypertrophie des VSMCs et il a été démontré que seul la p38 MAPK agit à travers le H_2O_2 intracellulaire. Cette voie p38 MAPK sensible au rédox est donc impliquée dans l'hypertrophie induite par l'ang II et autant les voies ERK1/2 que p38 MAPK sont requises pour une réponse hypertrophique complète à l'ang II (11).

5.4 Récepteurs tyrosine kinase (RTKs)

Plusieurs effets de l'ang II requièrent un autre type de voie de signalisation, soit la phosphorylation de tyrosine couplée à la protéine G, comme l'ont montré des études avec les inhibiteurs des tyrosine kinases (12). Les tyrosine kinases incluent : (1) les récepteurs tyrosine kinases (récepteur de facteur de croissance épidermal (epidermal growth factor - EGFR) et récepteur de facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor-PDGFR) (6) et les récepteurs non tyrosine kinase (c-Src) (91). En plus de leur rôle comme récepteur pour leurs propres ligands spécifiques, les récepteurs tyrosine kinases (RTKs) peuvent aussi servir comme transducteurs de signaux pour une variété de stimuli extracellulaires (74;87). Il a été montré que les agonistes de GPCRs induisent la phosphorylation sur la tyrosine de multiples substrats dans les cellules cibles et qu'à large spectre, les inhibiteurs de tyrosine kinases peuvent bloquer la stimulation de la synthèse d'ADN ou de protéines par ces facteurs. (82). Il existe une interaction entre les RTKs et les récepteur AT1 (82). La cascade de signalisation initiée par le récepteur AT1 requiert l'activation des tyrosine kinases (97). Les récepteurs AT1 n'ayant pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, il recrute des tyrosine kinases ou des protéines qui activent les tyrosine kinases (82) en transactivant les récepteurs à facteur de croissance comme EGFR (82), qui eux possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque (12). La capacité d'AT1R d'agir comme un récepteur multifonctionnel est réalisée, en partie, par l'activation de multiples tyrosine kinases (12). Plusieurs de ces tyrosine kinases clé activées par le récepteur AT1 ont été caractérisées dans les VSMCs (91). Les nouvelles découvertes dans le domaine de la signalisation de l'ang II démontrent l'activation du récepteur AT1, associée avec une augmentation de la phosphorylation de protéines tyrosine et l'activation des MAPKs (17;82). Il est aussi apparent que les GPCRs et les récepteurs tyrosine kinases (RTKs)

partage des intermédiaires de signalisation communs dans la voie menant à l'activation de la sous-famille ERK des MAPKs (20;87).

L'association du facteur de croissance avec son récepteur, qui possède souvent un domaine tyrosine kinase intracellulaire, peut mener à un changement conformationnel (par exemple la dimérisation des deux chaînes) et à l'autophosphorylation du récepteur. D'autres récepteurs ne sont pas eux-mêmes des tyrosine kinases mais interagissent tout de même avec les tyrosines kinases cytoplasmiques (89). La participation des récepteurs non tyrosine kinases Src (85;97), Fyn, Yes, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2), focal adhesion kinase (FAK) et JAK2 (97) a aussi été rapportée (85). En effet, Src joue un rôle important dans les réponses provoquées par l'ang II, telles la prolifération cellulaire (l'activation de ERK1/2), la migration (l'ensemble des adhésions focales) et la contraction (hausse du calcium intracellulaire) (12).

5.5 Récepteur EGF (Epidermal growth factor)

Le rein est l'un des organes principaux où est synthétisé l'EGF, un peptide de 53 acides aminés (89). Les sites principaux de la synthèse d'EGF dans les souris adultes sont les reins et les glandes salivaires, mais d'autres tissus peuvent aussi en produire (74). Le récepteur EGF est une protéine de 170 000 kDa qui possède une activité tyrosine kinase intracellulaire (74). On en retrouve dans les cellules mésangiales, le tube collecteur et les cellules du tubule proximal (89), ainsi que dans une variété de lignées cellulaires originants du tubule proximal (74).

L'EGF est un mitogène puissant pour les cellules tubulaires en culture et il stimule la phosphorylation des protéines membranaires intrinsèque et inhibe la gluconéogenèse dans ces cellules (74;89). L'expression des récepteurs d'EGF est améliorée à la suite à d'une nécrose tubulaire aigüe. L'administration d'EGF exogène accélère le processus de réparation rénal après des dommages ischémiques dans les rats (89). Toutefois, les changements dans l'expression d'EGF rénal ne sont pas limités à l'hyperplasie subséquente à la nécrose tubulaire, mais surviennent également lors de l'hypertrophie rénale compensatoire (89). Assurément, il semble qu'EGF soit un initiateur de l'hypertrophie

tubulaire puisque des changements dans le contenu rénal d'EGF précèdent l'augmentation de la taille des cellules (89).

Des résultats *in vitro* suggèrent que la transactivation de EGFR par l'induction du récepteur AT1 est importante pour plusieurs des effets trophiques de l'ang II et suggère que les RTKs sont des cibles en aval des récepteurs AT1 (17;82) comme montré dans la figure 8. Seta et Sadoshima rapportent d'ailleurs que la phosphorylation des tyrosines du récepteur AT1 en aval est requise, en plus du terminal carboxyl d'EGFR, pour une transactivation de EGFR (85;97). De plus, cette transactivation de EGFR et PDGFR, par l'ang II, permet aux deux récepteurs de se transactiver l'un l'autre à travers l'hétérodimérisation des récepteurs (20). De nouvelles découvertes supportent la notion que la transactivation d'EGFR et, possiblement de d'autres RTKs, peut contribuer à la signalisation de croissance fait par les GPCRs (82;87). En fait, la liaison du facteur de croissance, par exemple, l'EGF, à ces récepteurs de surface induit la prolifération cellulaire via la voie de signalisation (89). L'induction de la synthèse protéique qui est orchestrée par l'ang II passe aussi par EGFR et ERK1/2 dans les VSMCs (20;85;87). (Voir figure 7)

Puis, il semblerait que l'activation de ERK1/2 par l'ang II soit dépendante du calcium et exige la phosphorylation de EGFR et l'activation de PKC (82;90). Daub et al ont d'ailleurs rapporté qu'EGFR est rapidement phosphorylé suite à la stimulation du récepteur AT1 avec des agonistes et que l'inhibition de l'activité kinase du EGFR supprime l'activation de ERK1/2, ainsi que l'induction de c-fos (87). Ces études montrent donc que l'ang II stimule la phosphorylation de ERK1/2 via la transactivation d'EGFR par AT1 (94).

Toutefois, des études ont montré qu'un inhibiteur d'EGFR (AG1478) atténue la phosphorylation des MAPKs (ERK1/2, p38 MAPK et ERK 5) induite par l'ang II, sans l'abolir complètement, indiquant que l'ang II active ERK1/2, p38 MAPK et ERK5, mais seulement en partie à travers l'EGFR (94). La transactivation est considérée comme l'un des divers mécanismes d'interactions avec des récepteurs contribuant à la diversité des événements de signalisation en réponse à un simple stimulus (94). Bien que plusieurs études ont été effectuées concernant le lien entre les GPCRs et EGFR, plusieurs inconnus persistent à propos de la signification biologique de ce mécanisme dans un contexte physiologique normal (87).

La transactivation d'EGFR est rapidement activée après l'ajout d'ang II et est requise pour l'activation de plusieurs voies de signalisation en aval, incluant l'activation d'AKT dépendante de la PI3-K (98). Une des cibles potentielles pour l'ang II est la sérine/thréonine kinase AKT/PKB (71). L'ang II active la PI3-K dans les VSMCs, pour ensuite activer des intermédiaires et enfin AKT/PKB. L'activation de cette dernière peut provoquer plusieurs réponses biologiques, incluant la survie cellulaire, la synthèse protéique, l'hypertrophie cellulaire et la modulation du tonus vasculaire par la régulation de la production d'oxyde nitrique (99;100). Donc, elle joue divers rôles dans la régulation des fonctions cellulaires (100).

5.6 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les mécanismes sous-tendant la transactivation de RTKs par l'ang II n'incluent pas seulement l'activation de RTKs mais aussi des processus sensibles au rédox (82).

Il existe deux sortes de radicaux libres biologiquement actifs : les espèces réactives de l'oxygène (« reactive oxygen species »-ROS) et les espèces réactives de l'azote (« reactive nitrogen species »-RNS). Leur génération, réactions chimiques et effets *in vivo*, sont étroitement liés (101). Le terme ROS est fréquemment mal employé, causant de la confusion dans la littérature et menant à des généralisations qui peuvent être ou ne pas être vrais. Les vrais ROS comprennent un nombre de molécules et d'atomes, incluant l'indispensable superoxyde (O_2^-); l'oxygène seul; le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2); le radical hydroxyl ($\bullet OH$); les peroxydes organiques et le peroxyde nitrite ($OONO^-$) (90;102). Alors que l'oxyde nitrique (NO) est considéré dans une classe différente de composés (102).

Brièvement, le second type de radicaux libres, les RNS inclut le cation nitronium (NO^+), l'anion nitroxyl (NO^-) et le peroxyde nitrate ($ONOO^-$). Plusieurs de ces RNS sont générés par la réaction de ROS avec l'oxyde nitrique (NO) ou les produits relatifs au NO. La réaction des oxydants avec le NO peut chélater l' $O_2^{\bullet -}$ et le H_2O_2 et ainsi fournir plusieurs protections cellulaires afin de prévenir la peroxydation des lipides provoquée par les ROS des

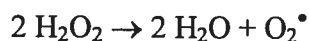
membranes cellulaires, un bénéfice qui est offert par la génération de RNS lesquels imposent un stress oxydatif additionnel à la cellule (101).

Les ROS sont des molécules dérivées ultimement de l'oxygène mais ayant subi une réduction univalente, ainsi ils réagissent facilement avec d'autres produits biologiques (90). Le principal ROS présent dans le corps est le superoxyde, lequel est généré de la réduction d'un électron (e^-) de la molécule d'oxygène ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$). O_2^- est converti ensuite en peroxyde d'hydrogène par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (103). Cette conversion est rapide car la demi-vie de O_2^- n'est que de quelques secondes et cela est dû autant à son instabilité qu'à l'efficacité des défenses antioxydantes de la cellule (90). Finalement, le peroxyde d'hydrogène est à son tour réduit en eau par la catalase (CAT) ou la glutathion peroxydase (GPX), qui utilise plutôt le glutathion comme donneur d'hydrogène (103).

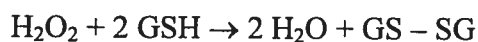
SOD



CAT



GPX



Sous des conditions normales, les ROS sont sécuritairement convertis en eau et oxygène moléculaire. Toutefois, en présence de métaux de transition (le fer et le cuivre) ou bien en excès d' O_2^- , H_2O_2 est converti en radicaux hydroxyl (OH^\bullet) qui sont les plus cytotoxiques des ROS connus (101;103).

La dismutation d' O_2^- par la SOD ne sert pas seulement de chélateur de O_2^- , mais produit aussi des ROS plus stables (H_2O_2) (90;104). La catalase et la glutathion peroxydase sont deux des plus importants chélateurs de peroxyde d'hydrogène (90). Ces ROS sont donc générés comme des produits intermédiaires dans la réduction de l'oxygène à l'eau (réaction rédox) (101).

Sous des circonstances normales, l'hôte se protège des effets toxiques des ROS et RNS par des antioxydants intracellulaire ou extracellulaire et des chélateurs du radical oxygène.

Cependant, quand ces systèmes de défense sont accablés, la cellule est placée sous stress oxydatif et peut être blessée, activée ou encore mourir (101).

L'un des plus importants mécanismes biologiques de la génération de ROS résulte de la génération de $O_2^{\bullet-}$ originant d' O_2 par l'enzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NAD(P)H oxydase) (101;105). Cette enzyme transfère les électrons du NADH ou NADPH à la molécule d'oxygène produisant alors $O_2^{\bullet-}$ (17;90). La NAD(P)H oxydase est présente dans les neutrophiles où elle a un rôle critique dans « l'éclatement oxydatif » qui est la première ligne de défense contre les bactéries (106). Les isoformes de la NAD(P)H oxydase ont aussi été identifiés dans VSMCs, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules mésangiales (101). L'oxydase neutrophile est une enzyme consistant en deux composantes membranaires : gp91^{phox} (aussi connu comme Nox-2 ou ses homologues Nox-1 et Nox-4) et p22^{phox} et trois composants cytosoliques : p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} (104;106;107). Le cortex du rein contient un complément complet de la NADPH oxydase de type phagocytaire et les trois isoformes de Nox (106). Toutefois, Nox-4 a été localisé dans les tubules proximaux (106). La fonction de gp91^{phox} et p22^{phox} est le transport d'électron de l'enzyme, et les composants cytosoliques sont requis pour l'activation, agissant comme amplificateurs de signal (90).

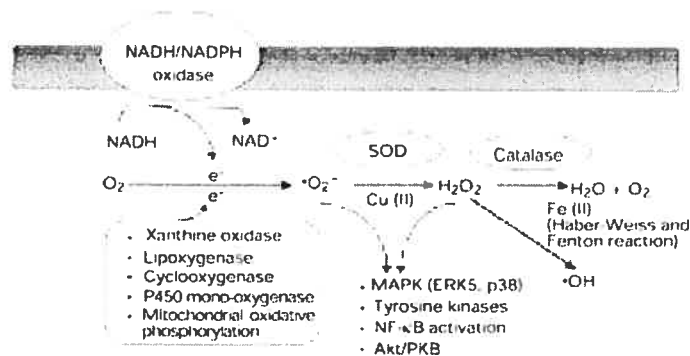


Figure 11. Génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le réseau vasculaire. (Tiré de Touyz et Berry (17)).

L'activité de la NAD(P)H oxydase liée à la membrane provoque souvent la génération intracellulaire de ROS dans la réponse aux ligands (108). Elle a ainsi été identifiée comme

une source majeure de O_2^- dans la paroi des vaisseaux sanguins (106;109). Cependant, en plus de la NAD(P)H oxydase (O_2^-), d'autres systèmes générateur de ROS comme les voies de la chaîne de transport d'électron des mitochondries, la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipooxygénase peuvent aussi contribuer dans la génération vasculaire de radicaux libres (52;103;104;109).

L'ang II est reconnu pour augmenter les ROS intracellulaires (96). L'ang II stimule la production de ROS dans tous les types de cellules vasculaires, principalement à travers l'activation de la NAD(P)H oxydase associée à la membrane de la cellule (91;94;96). Et cette activation de la NAD(P)H oxydase passe par l'activation du récepteur AT1 par l'ang II (103). P22phox et Nox-1 semblent être critiques dans la transduction des effets d'AT1 (augmentation) et AT2 (réduction) sur l'activité de la NADPH oxydase dans le rein (106). En fait, l'ang II cause un stress oxydatif par l'activation du récepteur AT1, mais ce stress est neutralisé par le récepteur AT2. Une infusion d'ang II améliore l'expression d'ARNm cortical rénal de p22^{phox}, Nox-1 et Mn-SOD et réduit l'expression de Nox-4 et EC-SOD (106;110). L'activation du récepteur AT2 fournit plutôt une contre balance puissante aux effets des récepteurs type 1 et 2 sur le stress oxydatif dans le rein (106).

L'ang II active la NAD(P)H oxydase, en présence de molécules d' O_2 et du substrat NAD(P), et génère l'anion superoxyde (O_2^-) (104). Les ROS sont capables d'induire des actions qui peuvent promouvoir autant la vasodilatation que la vasoconstriction. L' O_2^- vasculaire, lequel est généralement imperméable à la membrane cellulaire, est localisé principalement à l'intérieur des cellules. À l'opposé le H_2O_2 diffuse facilement et migre au milieu extracellulaire ou traverse la paroi vasculaire pour chercher l'endothélium. Donc, une augmentation d' O_2^- peut mener à l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire (82;104) et par conséquent à la vasoconstriction, alors qu'une augmentation de H_2O_2 endothéliale ou extracellulaire tendrait à promouvoir la vasodilatation (104). Donc, la compartimentalisation des différentes espèces de molécules d'oxygène activé peut être crucial dans tous les effets vasoactif de l'ang II (104).

L'ang II stimule la production de ROS de façon biphasique. La première phase de la génération de ROS arrive rapidement (pic à 30 secondes) et est dépendante de l'activation de la PKC. La seconde phase de la génération de ROS (pic à 30 minutes) a une plus grande

magnitude que la première et continue pour au moins 6 heures. Cette phase est probablement la plus influente des événements de signalisation à long-terme concernant la réponse de croissance. Elle requiert l'activation de Rac, une petite protéine G, par la transactivation d'EGFR. L'inhibition de Rac inhibe la production de ROS induite par l'ang II et les inhibiteurs de PI3-K et le bloqueur d'EGFR, diminuent autant l'activation de Rac que la génération de ROS (98). Ceci démontre bien l'implication des tyrosines kinases dans la stimulation des NAD(P)H oxydases par les protéines G couplées aux récepteurs (98).

Il a déjà été rapporté que l'hypertrophie induite par l'ang II est provoquée par les ROS (11;82). Il existe donc un lien entre l'ang II induisant l'activité de la NAD(P)H oxydase, produisant une augmentation rapide d' O_2^- et subséquemment de H_2O_2 intracellulaire, et l'hypertrophie (99;111). Cette voie passe à travers le récepteur AT1 et est couplée à la protéine G (11;111), toutefois, les voies de signalisation sensibles au rédox et impliquant l'hypertrophie induite par l'ang II ne sont pas définies (11). Il semble que l'activité de la NADH/NADPH oxydase est requise pour l'hypertrophie et que la production de H_2O_2 dépendante de la NADH/NADPH oxydase est nécessaire à l'induction par l'ang II de la synthèse protéique (11;90;111). L'inhibition de l'activité de SOD ou la surexpression de catalase inhibe profondément l'hypertrophie (111). Par contre, le stress oxydatif seul apparaît être insuffisant pour supporter la réponse hypertrophique complète à l'ang II (11).

Normalement, les ROS sont contrôlés par un groupe d'enzymes antioxydantes et endogènes, ainsi qu'une diète d'antioxydants. La production excessive de ROS ou l'altération de la capacité à la défense antioxydante mène au stress oxydatif, dans lequel les ROS non contrôlés causent des dommages aux tissus et induisant des dysfonctions (82;103). Cependant, un traitement avec des antioxydants peut induire de l'apoptose, impliquant que les ROS sont nécessaires à la prolifération normale. Donc, bien qu'un certain taux de stress oxydatif apparaît promouvoir la croissance, plusieurs stress sévères peuvent mener à la mort cellulaire, par nécrose ou apoptose (111). En général, de faibles doses de ROS induisent des réponses mitogéniques, des doses intermédiaires induisent un arrêt de croissance et un stress oxydatif sévère cause l'apoptose ou la nécrose (101). La régulation de l'état rédox des cellules peut donc être un mécanisme général par lequel les signaux de croissance sont transduits (105).

Les ROS, tels O_2^- et le peroxyde d'oxygène (H_2O_2), agissent comme seconds messagers intercellulaire et intracellulaire (93;94;112), jouant un rôle physiologique dans le tonus vasculaire et la croissance cellulaire, et un rôle pathophysiologique dans l'inflammation, l'ischémie/reperfusion, l'hypertension et l'athérosclérose (111). Les ROS agissent aussi comme d'importants régulateurs de la pression sanguine et de la fonction rénale (102). De plus, la NAD(P)H oxydase, et plus particulièrement la sous-unité p22phox, semble jouer un rôle dans la pathophysiologie de l'hypertension et des dommages aux organes cibles de l'hypertension (107;109). En effet, dans les rats spontanément hypertendus (SHRs), le stress oxydatif est associé avec une augmentation de la NAD(P)H oxydase et de la production du superoxyde dans le rein et les tissus vasculaires (103;109).

Bien que le rôle des ROS dans les réponses physiologiques à l'ang II soit le sujet de recherches intenses, il reste encore plusieurs questions quant aux voies de signalisation et aux gènes qui sont régulés par les ROS (90).

Toutes les MAPKs peuvent être activées par des oxydants xogènes et ainsi constituer une cible potentielle du stress oxydatif (11;94). Par exemple, ERK1/2, est activé par O_2^- (111), alors que le H_2O_2 intracellulaire produit par l'ang II permet plutôt de coupler le récepteur AT1 à p38 MAPK (11). En plus, il a été montré que les ROS activent aussi les voies PKC, AKT/PKB et JAK-STAT (100;113). Les récepteurs de facteurs de croissance tels PDGFR et l'EGFR sont aussi activés par le H_2O_2 et O_2^- (94).

Finalement, les cibles majeures des ROS, dans les VSMCs, incluent les tyrosine kinases et phosphatases, les canaux ioniques, les phospholipases et les facteurs de transcription (82).

Il apparaît rapidement que les différentes voies impliquant la transduction du signal et une stimulation par le stress oxydatif sont hautement interconnectées et modulent chacune des actions qui dépendent de la dose du stress oxydatif et du contexte physiologique dans lequel elles sont examinées (101).

6. Hypertrophie cellulaire

Un organe peut augmenter sa taille par deux mécanismes, soit par un nombre plus élevé de cellules (hyperplasie) ou soit par une augmentation de la taille individuelle des cellules (hypertrophie) (68;75). Ce sont deux réponses totalement différentes. L'hyperplasie, avec la mitogénèse des cellules tubulaires, joue un rôle central dans la régénération d'un épithélium tubulaire fonctionnel à la suite d'une nécrose tubulaire aigüe. Le nombre de cellules reflète la balance de la génération de nouvelles cellules par prolifération et la perte par apoptose. Plusieurs facteurs de croissance agissant en concert sont impliqués dans cette réponse proliférative des cellules tubulaires. Les mécanismes moléculaires, comme les signaux mitogéniques transduits au noyau, sont relativement bien caractérisés. Les mécanismes d'oscillation complexes des protéines associées au cycle cellulaire, comme les cyclines et différentes kinases, sont primordiales pour la progression de la mitose des cellules tubulaires quiescentes (non-divisées). En contraste à la croissance mitogénique, c'est-à-dire la régénération des cellules tubulaires, l'hypertrophie tubulaire est moins bien comprise.

L'hypertrophie est un processus actif requérant l'entrée dans le cycle cellulaire, sans la progression de celui-ci au-delà de la phase G1 (89). Les cellules hypertrophiques sont donc arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire et augmentent leur taille et leur contenu en ARN et en protéines, mais sans la réplication de leur ADN (68;89;114). L'hypertrophie peut être dépendante du cycle cellulaire (68;89) ou indépendante, par l'inhibition de la dégradation des protéines (23;68;69). Cette observation peut suggérer que d'autres facteurs, dont ceux induits par l'ang II, sont nécessaires pour le développement d'hypertrophie. En effet, l'ang II réduit l'activité de la protéinase des cellules tubulaires, donc stimule l'hypertrophie (23;83). De plus, certains autres facteurs (facteurs de croissance, hormones, matrice extracellulaire, forces mécaniques et hyperglycémie) induisent de l'hypertrophie en facilitant l'entrée dans le cycle cellulaire (89). Donc, la détermination moléculaire entre l'hypertrophie cellulaire versus l'hyperplasie pourrait se faire être au niveau de la machinerie moléculaire régulant la progression du cycle cellulaire (115).

Les cellules qui progressent à travers un cycle cellulaire normal doublent leur contenu en ADN, ségrègent leur chromosomes et éventuellement se divisent durant la mitose (68;89). La transition d'une phase du cycle cellulaire à une autre est un processus coordonné,

séquentiel et synchronisé qui survient à un temps précis dans un ordre bien défini afin de s'assurer que la machinerie cellulaire est prête pour la réplication de l'ADN. La réplication de l'ADN se produit seulement une fois par cycle et est complétée avant le début de la mitose (68). Le cycle a deux parties fondamentales : l'interphase, qui occupe la majorité du cycle, et la mitose. L'interphase peut être divisée en phases G₁, S et G₂ comme montré à la figure 11. Tout d'abord, les cellules quiescentes entrent dans l'interphase de la phase dormante G₀, passent à travers la phase G₁, répliquent leur ADN dans la phase S et entrent en mitose après la progression en G₂ (69;74;89;116). Après le passage de la phase limitante (G₁), les cellules ne sont pas longues à répondre aux signaux extracellulaires et complètent le cycle cellulaire sous le contrôle de protéines régulatrices spécifiques au cycle cellulaire (89).

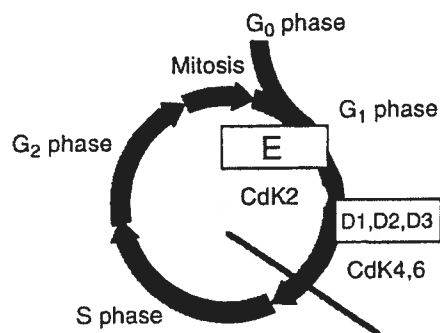


Figure 12. Schéma représentant les phases du cycle cellulaire. (Tiré de Wolf et Ziyadeh (116))

La transition entre les différentes phases du cycle cellulaire est réglée par l'activité d'enzymes distinctes, les kinases dépendantes des cyclines (CdK), et leurs sous-unités régulatrices, les cyclines (68;69;115;117).

Les cyclines ont une très courte demi-vie (<30-60 min), et leur niveau fluctue à travers le cycle cellulaire. En contraste, les Cdks sont exprimées constitutivement, et les niveaux demeurent inchangés à travers le cycle cellulaire (68;69). Les cyclines et Cdks forment un complexe et son activité dépend de leur phosphorylation (68). Le complexe lui-même montre l'activité kinase nécessaire pour la phosphorylation de différents substrats résultant dans la progression du cycle cellulaire (69).

Récemment, un groupe de nouvelles protéines, appelées inhibiteurs de CdKs (CKI), qui se lient et inactivent certains complexes cycline-CdK, a été identifié. Les Cdks sont activées par la phosphorylation et déphosphorylation à des sites spécifiques et cette activation est contrôlée par les CKI qui, en se liant, inhibent l'activation des complexes Cdk/cycline (115). Les CKI inhibent la prolifération par l'arrêt du cycle cellulaire, donc la prolifération et l'hypertrophie sont modulées par des protéines régulatrices spécifiques au cycle cellulaire (118).

Il existe deux familles de CKI sur la base de leur homologie de séquence et leur cible. La famille INK4 (p15 INK4b (p15), p16 INK4a et p18 INK4c) inhibe spécifiquement les complexes cyclines de type D-CdK. La famille CIP/KIP (p21^{CIP/WAF1} (p21) et p27^{KIP1} (p27) et p57^{KIP2}) se lie aux CDK 2, 4 et 6 (69) et inhibe les complexes cyclines/CDK de la phase G1 et S (118).

P21^{CIP1} et de p27^{KIP1} sont nommés ainsi selon leur poids moléculaire (68). P27^{Kip1} est largement exprimée dans les cellules non-prolifératives (quiescentes) rénales et les cellules non rénales (68;69). L'expression de p27 est régulée d'une manière post-transcriptionnelle par des changements dans la traduction et la dégradation de protéine à travers la voie protéolytique de l'ubiquitine et est aussi modifiée post-traductionnellement par phosphorylation (68). Puisque la progression de la cellule à travers la phase G1/S est orchestrée par les cyclines D, E et A, qui à leur tour lient et activent les CdKs, il est spéculé que les CKI, p27^{Kip1} en particulier, sont la clé du processus complexe de la transition du cycle cellulaire de la phase G1/S (119).

L'hypertrophie est un processus actif requérant l'entrée dans le cycle cellulaire, sans la progression à travers la phase S (68;69;75). L'hypertrophie et la prolifération cellulaire sont deux événements mutuellement exclusifs (68). L'entrée normale dans la phase G1 du cycle cellulaire est associée avec une augmentation de la taille, de la synthèse *de novo* des protéines et du contenu en protéines et ARN (68;69;75;114). La biosynthèse du collagène IV, la protéine spécifique à la membrane basale, augmente pendant l'hypertrophie cellulaire car les cellules hypertrophiées élargissent leur surface basale adhérente. L'augmentation de la synthèse de la membrane basale peut être nécessaire pour accommoder l'augmentation de la masse cellulaire (120).

Il est montré que l'ang II est un facteur stimulant l'hypertrophie des cellules du tubule proximal en culture (75;80;121), ainsi que d'autres tissus, dont les VSMC, myocytes cardiaques et les cellules neuronales (80).

L'ang II induit l'arrêt du cycle cellulaire des cellules du tubule proximal en phase G1, accompagné de l'hypertrophie cellulaire (23;121;122). Cette hypertrophie provoquée par l'ang II et l'inhibition de la progression du cycle cellulaire dépend de l'induction de p27^{Kip1}. En effet, l'ang II est associée avec une induction post-transcriptionnelle de p27^{Kip1} (23). Par contre, il a été plus récemment démontré que l'augmentation de p27^{Kip1}, provoquée par l'ang II, et l'induction de l'hypertrophie cellulaire, dans les cellules tubulaires rénales dépendent de la génération de radicaux d'oxygène. Un traitement avec le DPI, un inhibiteur de flavoprotéine, ou avec des antioxydants abolit à la fois la formation de O₂⁻ induite par l'ang II, l'expression de p27^{Kip1} et l'hypertrophie tubulaire. De plus, l'antisens d'une sous-unité de la NAD(P)H oxydase abolit complètement l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'ang II. Aussi, l'activation d'ERK1/2 est nécessaire pour de l'amélioration de l'expression de la protéine p27^{Kip1} et de l'hypertrophie cellulaire (121). Bref, l'ang II augmente, à travers la surrégulation de p22phox, une sous-unité de la NAD(P)H oxydase liée à la membrane, la concentration intracellulaire de ROS. Cette augmentation de ROS mène à la phosphorylation et l'activation d'ERK1/2, qui à son tour phosphoryle p27^{Kip1} aux résidus sérines (69).

Enfin, l'hypertrophie cellulaire et l'incorporation de [³H]-leucine stimulées par l'ang II sont abolies dans les cellules prétraitées à la toxine Pertussis, suggérant alors l'implication de la protéine G sensible à la toxine de Pertussis (73). Il semble aussi que l'hypertrophie induite par l'ang II dans les cellules du tubule proximal murin dépend, du moins en partie, de la sous-régulation de l'AMPc intracellulaire puisque des agents améliorant le niveau d'AMPc tel que la forskolin ou des analogues de l'AMPc atténuent l'hypertrophie (72). Donc, l'hypertrophie dépend de la transduction du signal à travers les récepteurs AT1 utilisant la protéine G sensible à la toxine du Pertussis et cause une diminution d'AMPc intracellulaire (72;80;120).

Il est donc proposé cette voie de transduction du signal : l'ang II se lie avec les récepteurs AT1 (23;121) couplés à l'adénylate cyclase à travers la protéine G inhibitrice (Gi) sensible

à la toxine de Pertussis. (75), active la NAD(P)H oxydase liée à la membrane, menant à l'augmentation de la génération d' O_2^- . Cette accumulation intracellulaire de ROS mène à la phosphorylation et l'activation d'ERK1/2 dans les cellules du tubule proximal. L'activation de cette enzyme mène à une augmentation de l'expression de p27^{Kip1}, la phase G1 s'arrête et on assiste à l'hypertrophie (56;71).

Finalement, puisque l'hypertrophie tubulaire est vraisemblablement un marqueur précoce du développement subséquent de dommages rénaux irréversibles chroniques tels que la fibrose interstitielle, la manipulation thérapeutique de ce processus de croissance adaptative peut prévenir la détérioration de la fonction rénale dans les maladies rénales chroniques. Comme les niveaux locaux d'ang II sont hauts dans presque toutes les maladies rénales chroniques, il est possible qu'une administration précoce de chélateurs d'oxygène prévienne l'induction tubulaire de p27^{Kip1}, l'arrêt du cycle cellulaire et le développement de la fibrose interstitielle (21). L'administration de chélateurs de ROS peut donc être un outil thérapeutique pour contrecarrer le remodelage dépendant de l'ang II dans les cellules du tubule rénal (21).

7. Les protéines associées aux récepteurs AT1.

Comme plusieurs récepteurs couplés à la protéine G, le récepteur AT1 exerce ses fonctions à travers ses domaines carboxyl-terminaux en plus de ses boucles cytoplasmiques intracellulaires. Le domaine carboxyl-terminal du récepteur AT1 interagit directement avec plusieurs effecteurs en amont. La mutagénèse de cette région a montré qu'elle contient des séquences d'acides aminés requises pour la désensibilisation et l'internalisation du récepteur. Comme pour plusieurs récepteurs couplés à la protéine G, le domaine carboxyl-terminal du récepteur AT1 interagit potentiellement avec les kinases et arrestines du récepteur couplé à la protéine G, causant la désensibilisation fonctionnelle du récepteur (13). Cette région joue donc un rôle important dans la régulation du récepteur AT1, dont l'internalisation du récepteur, la phosphorylation, la désensibilisation, le recyclage et les voies de signalisation (13).

Sachant cela, de nouvelles techniques pour la détection d'interactions protéine-protéine ont révélé une association du récepteur AT1 avec une variété de partenaires intracellulaires

autre que des protéines G hétérotrimériques (45). Deux nouvelles protéines, ATRAP et ARAP1 (type 1 angiotensin II receptor associated protein 1) ont été isolées en utilisant la méthode des deux hybrides chez la levure. ATRAP est une petite protéine de 18 kDa qui interagit spécifiquement avec le domaine carboxyl-terminal du récepteur AT1 entre les résidus 339 et 359. La surexpression d'ATRAP cause une inhibition marquée de l'activation de la PLC provoquée par le récepteur AT1, mais les voies de l'internalisation et du recyclage du récepteur AT1 ne sont pas affectées. Il a aussi été démontré que la surexpression d'ATRAP améliore l'internalisation du récepteur AT1 et inhibe la croissance cellulaire dans les VSMCs. ARAP1 est une autre protéine qui interagit avec le domaine carboxyl-terminal du récepteur AT1 entre les résidus 319 et 359. La caractérisation d'ARAP1 suggère qu'elle favorise le recyclage du récepteur AT1 à la membrane plasmique (45).

Et récemment, l'identification d'une nouvelle protéine associée à la région carboxyl-terminale du récepteur AT1 s'est faite par la méthode des deux hybrides chez la levure. GLP («GDP/GTP exchange factor (GEF)-like protein»), est encodé par 531 acides aminés. Le domaine carboxyl-terminal de la protéine GLP (acides aminés 371-531) interagit avec le domaine carboxyl-terminal du récepteur AT1. GLP possède un motif de 7 séquences répétées en tandem, similaire à celui observé chez le gène RCC1 (une GEF pour la petite protéine G, Ran) (13). La caractérisation du gène GLP sur la croissance cellulaire dans les VSMCs et les IRPTCs en cultures a permis d'établir un rôle pour GLP dans l'hypertrophie cellulaire (13).

Chapitre 2
Hypothèse et objectifs spécifiques

Hypothèse

L'ang II stimule l'hypertrophie chez plusieurs cellules dont les cellules du muscle lisse vasculaire (VSMCs). Puis, lorsque le récepteur AT1 est surexprimé spécifiquement dans le cœur, il y a induction d'hypertrophie chez les cardiomyocytes du ventricule gauche. Il a été montré, de plus, que la région carboxy-terminale du récepteur AT1 joue un rôle important dans la régulation du récepteur AT1, dont l'internalisation du récepteur, la phosphorylation, la désensibilisation, le recyclage et les voies de signalisation. Une nouvelle protéine, GLP (GEF-like protein), a été découverte par la méthode des deux hybrides. Alors que la molécule se liant au récepteur et initiant la série d'évènements menant à l'hypertrophie cellulaire induite par l'Ang II n'a pas été encore identifiée, il est suggéré que cette protéine, GLP pourrait être la molécule manquante.

Objectifs spécifiques

Les buts de ces études sont de caractériser la fonction biologique d'une protéine nouvellement identifiée, GLP, dans les cellules du tubule proximal de rein de rat immortalisées (IRPTCs). Puis, de déterminer les mécanismes moléculaires de l'expression du gène GLP stimulé par l'ang II dans des cellules du tubule proximal de rein de rat immortalisées (IRPTCs). Enfin, de déterminer le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) de l'induction de l'hypertrophie des les cellules du tubule proximal de rein de rat immortalisées (IRPTCs) par GLP.

Chapitre 3

Article 1

Introduction

Plusieurs récepteurs couplés à la protéine G, dont le récepteur AT1, exercent ces fonctions à travers ses domaines carboxyl-terminal, en plus de ses boucles cytoplasmiques intracellulaires. Le domaine carboxyl-terminal du récepteur AT1 interagit directement avec plusieurs effecteurs en amont. Cette région joue un rôle important dans la régulation du récepteur AT1, dont l'internalisation du récepteur, la phosphorylation, la désensibilisation, le recyclage et les voies de signalisation (102). De nouvelles techniques permettent la détection d'interactions protéine-protéine. La méthode des deux hybrides chez la levure a permis de révéler des associations du récepteur AT1 avec une variété de partenaires intracellulaires. Une nouvelle protéine associée au récepteur AT1, GLP (GEF-like protein) a récemment été découverte. Des recherches quant au(x) rôle(s) et à la fonction de GLP furent donc effectuées. L'article suivant montre l'état de ces études.

Guo DF, Tardif V, Ghelima K, Chan JS, Ingelfinger JR, Chen XM, Chenier I. A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. J Biol Chem. 2004 Feb 24

Rôle des différents coauteurs

Dr. DengFu Guo a découvert la protéine GLP et effectué les expériences de localisations tissulaire et intracellulaire. Isabelle Chénier a effectué toutes les expériences sur les VSMCs. Karim Ghelima a effectué des expériences préliminaires sur les cellules mésangiales. Dr. John S. D. Chan a contribué par le biais de différentes discussions à la rédaction de l'article. Dre. Julie R. Ingelfinger nous a gracieusement fait don de la lignée d'IRPTC. Dre. XiangMei Chen nous a gracieusement fait don des cellules mésangiales de rat. Finalement, j'ai effectué toutes les expériences concernant les IRPTCs.

A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells

Deng-Fu Guo^{1*}, Valerie Tardif¹, Karin Ghelima¹, John S.D. Chan¹, Julie R Ingelfinger², XiangMei Chen³, and Isabelle Chenier¹

¹Department of Medicine, University of Montreal and Research Center, CHUM-Hotel-Dieu Hospital, 3850, St-Urbain, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1T8; ²Massachusetts General Hospital, Pediatric Nephrology Unit, Boston, MA, U.S.A.; and ³Department of Nephrology, General Hospital of the PLA, Beijing, China

*corresponding author:

Fax: 514-412-7204

e-mail: guod@magellan.umontreal.ca

¹The abbreviations used are: Ang II, angiotensin II; VSMC, vascular smooth muscle cell; GLP, GEF-like protein; IRPTC, immortalized renal proximal tubular cell; PI, propidium iodide; GPCR, G protein-coupled receptor; GFP, green fluorescence protein ; ACE, angiotensin-converting enzyme; FBS, fetal bovine serum; MAP, mitogen-activated protein; PBS, phosphate-buffered saline; TCA, trichloroacetic acid; FALS, forward-angle light scatter; GEF, GDP/GTP exchange factor; DPI, diphenylene iodonium chloride; PKB, protein kinase B; PI3 kinase, phosphatidylinositol 3 kinase

Abstract

Angiotensin II stimulates cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. This effect is believed to be one of earliest morphological changes of heart and renal failure. However, the precise molecular mechanism involved in angiotensin II-induced hypertrophy is poorly understood. In the present study, we report the isolation of a novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein. It encodes a 531 amino acids protein. Its mRNA is detected in all human tissues examined, but highly expressed in the human kidney, pancreas, heart, and human embryonic kidney cells as well as rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. Protein synthesis and relative cell size analyzed by flow cytometry studies indicate that overexpression of the novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in cultured rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. In contrast, the hypertrophic effects were reversed in renal proximal tubular cell lines expressing the novel gene in antisense orientation and its dominant negative mutant, which lacks last 101 amino acids in its carboxyl terminal tail. The hypertrophic effects are at least in part mediated via protein kinase B activation and cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip1 protein expression level in vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells, respectively. Moreover, angiotensin II could not stimulate cellular hypertrophy in renal proximal tubular cells expressing the novel gene in antisense orientation and its mutant. These findings may provide new molecular mechanisms to understand hypertrophic agents, such as angiotensin II-induced cellular hypertrophy.

Keywords: AT1 receptor; angiotensin II; hypertrophy; gene expression; vascular smooth muscle cells; renal proximal tubular cells.

Angiotensin II (Ang II)¹ elicits a wide range of physiological responses in a variety of cell types. This octapeptide hormone plays an important role in the regulation of cardiovascular and renal functions via diverse mechanisms (1), which include arteriolar vasoconstriction, stimulation of aldosterone production, and electrolyte homeostasis (2). Although its vasoactive effects were initially considered to be a unique feature for maintaining blood pressure, recent studies have demonstrated that Ang II exerts many other important actions on the cardiovascular and renal systems. For example, Ang II stimulates the growth of diverse cell types, such as vascular smooth muscle cells (VSMC), cardiac myocytes, and proximal tubular cells (3-6), and it increases the expression of enzymes that produce mediators of inflammation (7,8). These observations suggest that Ang II may play an important role in various cardiovascular and renal diseases associated with abnormal cell growth (cellular hypertrophy or cell proliferation) and inflammation, such as hypertension, congestive heart failure, atherosclerosis, postangioplastic restenosis, and renal failure. Clinical trials and animal studies demonstrated that angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and Ang II type 1 receptor blockers prevented vascular, left ventricular, and renal proximal tubular cell hypertrophy (9-13) supporting the importance of Ang II in the pathogenesis of cardiovascular and renal diseases. *In vitro*, Ang II has also been shown to stimulate the growth of VSMC and renal proximal tubular cells (hypertrophic effect), as well as cardiac myocytes and fibroblasts (hyperplastic action) (14-17).

The physiological actions of Ang II are mediated by two major subtypes of G-protein coupled receptors (GPCR), termed AT1 and AT2 (18-22). Most known actions of Ang II are believed to be mediated through AT1 receptors, whereas the function of AT2 receptors may be the opposite of AT1 receptors (23-26). Like most G-protein coupled receptors, the AT1 receptor exerts its function through its carboxyl terminal domain, in addition to its intracellular cytoplasmic loops. The carboxyl terminal domain of the AT1 receptor has been reported to directly interact with several

downstream effectors (10-16). Mutagenesis of this region has shown that discrete amino acids are required for receptor desensitization and internalization (27-34). As for many GPCRs, the carboxyl terminal domain of the AT1 receptor presumably interacts with G protein-coupled receptor kinases and arrestins, causing the functional desensitization of the receptor (31-33). Two novel proteins, ATRAP and ARAP1, have recently been isolated by us and another using the yeast two-hybrid system (35-37). ATRAP is a small protein that interacts specifically with the carboxyl terminal domain of the AT1 receptor (35). Overexpression of ATRAP causes a marked inhibition of the AT1 receptor mediated activation of phospholipase C. Further studies also demonstrated that ATRAP overexpression enhances AT1 receptor internalization and inhibits cell growth in VSMCs (36). On the other hand, ARAP1 is another protein that was found to interact with the carboxyl terminal domain of the AT1 receptor (37). Characterization of ARAP1 in HEK-293 cells has revealed that ARAP1 binds and promotes the AT1 receptor to the plasma membrane, indicating its role in the receptor recycling pathway.

The Ang II-induced hypertrophic effect is associated with increased expression of the proto-oncogenes *c-fos*, *c-myc*, and *c-jun* and autocrine growth factors PDGF-AA and bFGF, and activation of Erk1/2 MAP kinases in cultured VSMCs (38,39). Despite the activation of these proto-oncogenes and mitogenes, Ang II does not induce hyperplasia, but instead causes hypertrophy in confluent quiescent VSMCs in serum-free medium. Recent studies on the molecular mechanism(s) of Ang II-induced VSMC and mesangial cell hypertrophy showed they are mediated at least partially at the level of the molecular machinery regulating cell-cycle progression (40), protein kinase B (PKB) (41,42) and NADH/NADPH oxidase pathways (43). However, the precise molecular mechanisms of cellular hypertrophy remain poorly understood. In the present study, we describe the identification of a novel GDP/GTP exchange factor (GEF) like protein, GLP and the characterization of GLP gene on cell growth in cultured VSMCs and

immortalized renal proximal tubular cells (IRPTCs). We report here that GLP induces cellular hypertrophy in both VSMCs and IRPTCs overexpressing GLP gene.

Materials and methods

Materials - phospho-specific (Ser-473) antibody against Akt2 and antibody against Akt2 were purchased from Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA. p27Kip1 antibody was from Transduction Laboratories Inc., Mississauga, Ontario, Canada. Antibody against β -actin, Na₃VO₄, aprotinin, leupeptin, PMSF, pepstatin, and diphenylene iodonium (DPI) were purchased from Sigma, St-Louis, MO. 9E10 monoclonal antibody against Myc epitope tag and fetal bovine serum (FBS) were from Invitrogen. LY294002 was obtained from Calbiochem, San Diego, CA.

Yeast two-hybrid screening - The yeast two-hybrid system was carried out essentially as described previously (44). Briefly, the bait plasmid was pBTM116 expressing the carboxyl terminal 64 amino acid residues (295 to 359) of rat AT1A receptor in frame with the *lex* A DNA binding domain (pBTM116-AT1A). The L40 yeast strain was transformed with pBTM116-AT1A, and subsequently with a pVP16 10.5-day mouse embryo cDNA library.

Plasmids.- To overexpress GLP gene in VSMCs and IRPTCs, human GLP cDNA was subcloned into a retroviral vector, pLNCX (45,46), and pcDNA3, respectively. To facilitate detection by Western blot analysis, GLP was tagged with a Myc-epitope tag (MGREFEQKLISEEDLL) followed by the GLP sequence (pcDNA3-Myc-GLP). A dominant negative mutant of GLP, lacking last 101 amino acids, was created with an addition of stop codon at position of 429 (pcDNA3-Myc-GLP-M1). GLP in antisense orientation was also produced (pcDNA3-GLP-AS) to reverse the effects observed in GLP overexpression in IRPTCs. For cellular localization experiments, GLP was expressed as an enhanced green fluorescence protein (GFP) fusion protein in pcDNA3 vector (pcDNA3-GFP-GLP). To produce polyclonal antibodies against GLP, DNA fragment of human

GLP gene, which consists of the carboxyl terminal tail from 430 to 531 amino acids, was infused into pGEX-5X-1 vector (Pharmacia Biotech Inc.) as Glutathione S-transferase (GST) fusion protein. The epitope tags were integrated into the cDNAs encoding human GLP by oligonucleotide-directed mutagenesis with polymerase chain reaction methods, and sequences of the recombinant DNAs were confirmed by automatic sequencer.

Cells — VSMCs were prepared from 6-weeks male Brown Norway rats. IRPTCs (cell line #93-p2-1) produced in Dr. Julie R. Ingelfinger's laboratory as passage 11 to 18 were used in the present studies. These cells express the mRNA of renin-angiotensin system components including angiotensinogen, renin, angiotensin converting enzyme (ACE), and AT1 and AT2 receptors (47,48). HEK-293 cells were obtained from ATCC. VSMCs, HEK-293 and IRPTCs were grown in low glucose DMEM media with 10% fetal bovine serum (FBS), and 5% FBS at 37°C under 5% CO₂, respectively. To establish a VSMC line permanently overexpressing GLP gene, a retrovirus-based system was used. Briefly, the pLNCX-GLP plasmid DNA was transfected into ψ CRIP packaging cells with G418 (400 μ g/ml) selection. Recombinant viruses obtained from the packaging cells were then used to infect VSMCs. After G418 (400 μ g/ml) selection, positive VSMC lines were determined by Northern blot analysis. To establish IRPTCs stably overexpressing GLP gene in sense and antisense orientation, pcDNA3-Myc-GLP and pcDNA3-GLP-AS, and its mutant M1 (pcDNA3-Myc-GLLP-M1) were transfected into the cells with Electroporation method (BioRad). Briefly, 4 μ g DNA was added into 400 μ l of 10⁷ cells/ml in PBS buffer with the condition of 400 voltages and 500 μ F. Positive cell lines after two weeks of G418 (600 μ g/ml) selection were determined with either Western blot analysis (for GLP and GLP-M1) or a specific reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (for GLP-AS) as described below. To determine the cellular localization of GLP gene, an HEK-293 cell line stably expressing pcDNA3-GFP-GLP was used.

Northern blot analysis - Total RNA was extracted from different human tissues and cell lines by a modified version of the guanidinium thiocyanate procedure. PolyA+ mRNAs were then extracted with an Oligotex mRNA kit (Qiagen). Two μg of polyA+ mRNA were resolved by electrophoresis on a 1.2% agarose gel containing 1.8% formaldehyde, transferred to a Hybond-N membrane, fixed, and hybridized with a ^{32}P -labeled probe. Full-length human GLP cDNA was used as a probe. After exposition, the membrane was stripped and rehybridized with a GAPDH probe.

Microscopy analysis - HEK-293 cells expressing pcDNA3-GFP-GLP were grown on glass coverslips, and fixed in 4% paraformaldehyde. The cells were visualized and photographed under a Zeiss microscope with Kodak films.

[^3H] thymidine incorporation — To determine cell proliferation, DNA synthesis is measured as described previously (49). Briefly, 50-80% confluent cells were washed with PBS and incubated in serum-free medium for 48 hours for VSMCs and 24 hours for IRPTCs, respectively. Four hours before harvesting the cells, 0.25 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] thymidine were added into the medium. Cells were washed twice with PBS, fixed with ethanol/acetic acid (3 : 1, v/v), and the acid insoluble material was precipitated with ice-cold PCA. Then, the DNA was extracted in 1 ml of 0.5 N perchloric acid (PCA) at 80 oC. Supernatants were transferred to plastic tubes, and counted in a scintillation counter. The experiments were performed in triplicate and repeated at least 3 times.

[^3H] leucine incorporation — To determine cellular hypertrophy, [^3H] leucine incorporation was measured. Cells were grown in 24-well plates, made quiescent in serum-free medium for 48 hours for VSMCs or 24 hours for IRPTCs, respectively. Cells were pulsed with 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] leucine for 24 hours, then, washed three times with PBS. Cellular proteins were precipitated for 30 minutes at 4 oC with Trichloroacetic acid (TCA), and lipid fractions were solubilized by washing twice with ice-cold ethanol. Precipitated proteins were resuspended in 0.25 N NaOH, transferred

to plastic tubes, and counted in a scintillation counter. The experiments were performed in triplicate and at least repeated 3 times.

Flow cytometry analysis — For measurement of forward-angle light scatter (FALS), cells were harvested by trypsinization, fixed with 75% methanol, washed, and incubated with 100 $\mu\text{g/ml}$ Rnase, and 10 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI) in PBS for 1 hour at 37 oC. Samples were analyzed using standard methods on a FACScan flow cytometer (Beckton Dickinson). Data were computer analyzed with Cell Quest Pro software (Beckton Dickinson).

Western Blotting analysis — Cells were rinsed with PBS and lysed in ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris, pH7.4, 100 mM NaCl, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 1% Triton, 1 mM Na-orthovanadate, 10 $\mu\text{g/ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin and leupeptin). Lysates were centrifuged at 4 oC for 10 minutes in a microfuge at maximum speed, and the supernatant was taken for Western blot analysis. Thirty micrograms of protein were separated on denaturing sodium dodecyl sulfate/10% polyacrylamide gel electrophoresis, and proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-C; Amersham Biosciences). Phosphorylation of Akt2/PKB was detected by Western blotting with a phospho-specific antibody, and quantity of protein was normalized with total Akt2. p27Kip1 was detected with a specific antibody and quantity of protein was normalized with β -actin expression. To determine positive IRPTC lines expressing pcDNA-Myc-GLP and its mutant M1 (pcDNA3-Myc-GLP-M1), 9E10 monoclonal antibody which recognizes Myc epitope tag was used for Western blot detection. To detect endogenous GLP protein expression, rabbit polyclonal antibodies against GST-GLP fusion protein, which consists of 101 amino acid residues in the carboxyl terminal tail of GLP, were produced. Proteins were visualized by enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Biosciences). The relative densities of Akt2/PKB, p27Kip1, and β -actin bands were determined with a computerized laser densitometer. We analyzed the data quantitatively by applying a commercially available system (Kodak 1D image analysis software).

Cellular protein content — To assess the cellular protein content, the cells were rendered quiescent for 48 hours and then harvested with 0.05% EDTA. The number of cells per well was counted, lysed in 100 μ l 2M NaOH, and cellular protein content was determined by protein assay kit (Bio-Rad). BSA was used as a standard. Cellular protein content is an indicator of cellular hypertrophy, as shown by Mackovic-Basic et al. (50).

GLP mRNA expression — To determine GLP mRNA expression, a specific RT-PCR was performed using the following primer sets; 5'-TGGTGGATGTCCGAAAGTGGC-3' (sense) and 5'-ATGTGAGCCACAAGCTACTTC-3' (antisense), corresponding to the nucleotide sequences of +2 to +23 and +393 to +414 of human GLP cDNA, respectively. Total RNAs were extracted with TRIzol reagent (Life Technologies, Inc.) according to the protocol of the supplier and quantified by its absorbance at 260 nm, was used in RT-PCR to quantify the amount of GLP mRNA expressed in IRPTCs. PCR reactions were performed undergoing for 5 minutes at 95 oC for initial denaturing, follow by 32 cycles of 95 oC for 30 seconds, 54 oC for 45 seconds and 72 oC for 30 seconds and 72 oc for 5 minutes in the thermal cycler (MJ Research Inc. USA). The GLP mRNA expression was normalized with β -actin mRNA expression with the primer sets of 5'-ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC-3' (sense) and 5'-AGCATTGCGGTGCACGATGGAGGG-3' (antisense), corresponding to the nucleotide sequences of +155 to 139 of exon 3, and nucleotide sequences of +155 to +139 of exon 5 of the rat β -actin gene, respectively (51).

Statistical analysis - Three to thirteen separate experiments were performed, and each treatment group was assayed in triplicate unless indicated. The data were analyzed with the Student's *t*-test or analysis variance. A probability level of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

Identification of GLP gene - To identify proteins that interact with the carboxyl terminal domain of the AT1A receptor, a yeast two-hybrid screen was performed in a system which included the AT1A (residues 295 to 359) fused to the *lex* A DNA-binding domain and a mouse embryo cDNA library (37) fused to the VP16 transactivation domain. One positive clone, A8, which contained 162 amino acid residues of mouse GLP (residues 371 to 533) was isolated. Clone A8 was subsequently retested in the yeast two-hybrid assay with the truncated AT1A receptor (residues 295 to 318). Although the entire AT1A carboxyl terminus domain (residues 295 to 359) interacted with mouse clone A8, the truncated fragment AT1A-T318, consisting of residues 295 to 318, failed to do so. The result indicates that the region between residues 319 to 359 of AT1A is required for interaction with GLP gene in the yeast two-hybrid system. A total 23 clones were subsequently isolated from a λ gt11 human VSMC primary cDNA library employing mouse clone A8 as a probe. A 2.6-kb clone has a putative ATG start codon at position 228 and contains an open reading frame of 1593-bp encoding a hydrophilic protein of 531 amino acid residues with a calculated molecular mass of 58,564 Dalton (Figure 1A). The mobility of the *in vitro* translation product was in agreement with the molecular mass predicted for the 2.6-kb clone (data not shown). An amino acid sequence database search found a similar human cDNA from gene bank (accession numbers: AF334406; AJ319660; AK096654; AL833821; and NM_018191). There are three amino acid differences between the 2.6 kb clone and the published amino acid sequence from gene bank, valine239 is changed to phenylalanine, tyrosine242 to asparagine, and threonine245 to asparagine. Analysis of the 2.6 kb clone amino acid sequence revealed that it contains a motif of seven tandem repeats similar to that of RCC1 protein. RCC1 has been identified as a GEF for Ran small G protein (52-57). Figure 1B shows the amino acid comparison between the seven tandem repeats of GLP protein. We believe that the 2.6-kb clone is a novel GEF-like protein, and

putatively named the 2.6-kb clone as GLP. Comparison of GLP and RCC1 protein revealed that GLP protein has an additional carboxyl tail (amino acid residues 368 to 531), in addition to the seven tandem repeats motif (Figure 1C). We found that the amino acid residues between 371 and 531 of GLP protein are important for the interaction with the carboxyl terminal domain of the AT1 receptor. This may explain why GLP protein has an additional carboxyl tail, while RCC1 protein does not.

Tissue and cell distribution of GLP gene - Northern blot analysis showed that GLP mRNA is expressed in the human heart, brain, lung, liver, kidney, pancreas, skeletal muscle and placenta, but is particularly abundant in the kidney, pancreas, and heart (Figure 2A). GLP mRNA was detected in cultured rat VSMCs and IRPTCs, and human HEK-293 cells (Figure 2B). Only a single GLP transcript of about 4.0 kb was found in the human tissues and cell lines. The 4.0 kb size is in agreement with the human cDNA published in gene bank . This may explain why the 2.6 kb clone lacks both a polyadenylation signal AAUAAA sequence, as well as a poly(A) tail in the 3'-untranslated terminus. GLP protein expression was also detected in rat VSMCs and IRPTCs, and human HEK-293 cells analyzed by Western blotting with polyclonal antibody against last 101 amino acids of GLP (Figure 2C). The size of bands detected by Western blot analysis is about 58 kDa, which is similar molecular mass predicted from its protein sequence.

Cellular localization of GLP gene — To determine the intracellular localization of GLP gene, HEK-293 cells stably expressing pcDNA3-GFP-GLP were used. As shown in Figure 3, GFP-GLP protein was mainly localized in small vacuoles in the cytoplasm, and also clearly on the plasma membrane, but not in the nucleus.

Hypertrophic effects of GLP gene in VSMCs — Although several groups have reported the GLP sequence to the gene bank, little is known about the function of this novel gene. To determine the biological roles of GLP gene, VSMCs stably expressing pLNCX-GLP (GLP) and empty vector,

pLNCX (control) were established. Morphology of VSMCs expressing pLNCX or pLNCX-GLP after viral infection was not changed, still like wild VSMCs, but VSMCs expressing pLNCX-GLP (Figure 3C) seem to be larger than control cells expressing pLNCX alone (Figure 3B). Confluent, quiescent VSMCs were used to examine whether GLP regulates cell growth. Figure 4A shows that [3H] thymidine incorporation, an indicator of new DNA synthesis decreased by 32% in VSMCs overexpressing GLP gene compared to the control cells. However, [3H] leucine incorporation, a measure of protein synthesis and also an indicator of cellular hypertrophy, significantly increased by 238% in VSMCs overexpressing GLP gene when compared to the control cells (Figure 4B). The hypertrophic effects of GLP gene in VSMCs were further demonstrated by a rightward shift of the FALS, a relative measure of cell size on flow cytometry (data not shown). The relative cell size, as arbitrary units, increased by 178% in VSMCs overexpressing GLP gene compared to the control cells (Figure 4C). In parallel experiments, Ang II increased in relative cell size by only 112% in VSMCs stimulated with 100 nM Ang II for 48 hours (data not shown). As a third hypertrophic marker, total protein content was measured. Figure 4D shows that total protein content was 2.2 folds higher in VSMCs overexpressing GLP than in control cells. These results demonstrate that overexpression of GLP gene induces VSMC hypertrophy.

Effect of GLP gene on phosphorylation of Akt2 in VSMCs - Activation of Akt2/PKB has been shown to play an important role on cellular hypertrophy in VSMCs and mesangial cells. To explore the signaling pathways involved in GLP-induced VSMC hypertrophy, phosphorylation of Akt2/PKB was determined by Western blot analysis. As shown in Figure 5A, Akt2/PKB was significantly more activated in VSMCs overexpressing GLP gene than in the control cells. Activation of Akt2/PKB increased by 2.2 folds in VSMCs overexpressing GLP gene compared to the control cells (Figure 5B). Because cellular p27kip1 level, an inhibitor for cyclin-dependent kinase (cdk), has been demonstrated to be an indicator of cellular hypertrophy in VSMCs, and murine and rat proximal tubular cells, cellular

p27Kip1 levels were also determined by Western blot analysis (Figure 5C). Cellular p27Kip1 protein expression decreased by 12% in VSMCs overexpressing GLP gene compared to the control cells (Figure 5D). These data suggest that the activation of Akt2/PKB is involved in VSMC hypertrophy induced by GLP gene overexpression, but that cellular p27Kip1 is not.

Effects of a PI3 kinase inhibitor, LY294002 and NADH/NADPH oxidase inhibitor, DPI in VSMCs overexpressing GLP gene — Akt2/PKB is stimulated by a number of receptor tyrosine kinases, Ang II, and insulin, by activation of PI3 kinase. Interestingly, Akt2/PKB is also activated through a PI3 kinase-independent, but reactive oxygen species (ROS)—dependent pathway. To further explore upstream signaling events of activation of Akt2/PKB, VSMCs overexpressing GLP gene were treated with LY294002, a PI3 kinase inhibitor, and DPI, an NADH/NADPH oxidase inhibitor, then activation of Akt2/PKB and relative cell size were determined. As shown in Figure 6A, phosphorylated Akt2/PKB was significantly reduced in the cells treated with both inhibitors compared to the untreated cells, as examined by Western bolt analysis. Activation of Akt2/PKB was decreased by 72% in the cells treated with LY294002, and 50% with DPI, respectively, compared to the untreated cells (Figure 6B). Furthermore, relative cell sizes measured by flow cytometry were also decreased by 16% in the cells treated with LY294002, and 45% with DPI, respectively, compared to the untreated cells (Figure 6C).

Hypertrophic effects of GLP gene in IRPTCs - Immortalized renal proximal tubular cells (IRPTCs) have been used as in vitro model to examine the molecular mechanism on Ang II-induced cellular hypertrophy. To confirm the cellular hypertrophic effects of GLP gene observed in VSMCs, four IRPTC lines stably expressing pcDNA3 (control), pcDNA3-Myc-GLP (GLP), GLP deletion mutant pcDNA3-Myc-GLP-M1 (GLP-M1) and GLP in antisense orientation pcDNA3-GLP-AS (GLP-AS) were established. As shown in Figure 7A, IRPTCs expressing pcDNA3-Myc-GLP (GLP) and pcDNA3-Myc-GLP-M1 (GLP-M1) were determined by Western blotting with 9E10 monoclonal

antibody, which recognizes Myc epitope tag. IRPTCs expressing GLP in antisense orientation were determined by a specific RT-PCR as shown in Figure 7B. [3H] thymidine and [3H] leucine incorporation experiments were performed in these four IRPTC lines. As shown in Figure 8A, [3H] thymidine incorporation, a DNA synthesis indicator, was not significantly changed among these IRPTC lines either overexpressing GLP (GLP), GLP in antisense orientation (GLP-AS) and GLP mutant M1 (GLP-M1) compared to IRPTCs transfected with pcDNA3 vector (control). However, [3H] leucine incorporation, a measure of protein synthesis and a cellular hypertrophy indicator, was significantly increased only in IRPTCs expressing GLP gene (GLP) compared to IRPTCs transfected with vector (control) (Figure 8B). [3H] leucine incorporation was lower in IRPTCs expressing GLP in antisense orientation (GLP-AS) as well as GLP mutant (GLP-M1) compared to control (Figure 8B). The ratio of [3H] leucine/[3H] thymidine, a cellular hypertrophy indicator, increased by 1.6 folds in IRPTCs overexpressing GLP gene than in IRPTCs transfected with pcDNA3 (data not shown). The relative cell size measured by flow cytometry showed that IRPTCs expressing GLP were 17% larger than control IRPTCs, but no changes were observed in IRPTCs expressing GLP in antisense orientation (GLP-AS) and its mutant M1 (GLP-M1) compared to control cells as shown in Figure 8C. Moreover, total protein content, other cellular hypertrophy indicator, was significantly higher in IRPTCs expressing GLP than other three cells (Figure 8D). These data indicate that GLP overexpression also induces cellular hypertrophy in IRPTCs as well as in VSMCs. To explore the signaling pathways involved in IRPTC hypertrophy, Akt2/PKB activation and p27Kip1 protein expression were then determined in four different cell lines. As shown in Figure 9A and B, phosphorylated Akt2/PKB was not changed among these four cell lines. Interestingly, cellular p27Kip1 level was significantly higher in IRPTCs expressing GLP gene (GLP) than in other three cell lines (Figure 9C and D). These data demonstrate that overexpression of GLP gene induces cellular hypertrophy in both VSMCs and IRPTCs, but by

different mechanism(s), and the carboxyl terminal tail of GLP and GLP gene expression level play an important role in GLP-induced cellular hypertrophy in IRPTCs.

Effect of Ang II in different IRPTC lines — Ang II has been implicated to induce cellular hypertrophy in cultured RPTCs (15,58,59). To explore whether GLP plays an important role in Ang II-induced hypertrophy in IRPTCs, three IRPTC lines expressing pcDNA3 (control), GLP in antisense orientation (GLP-AS) and GLP mutant M1 (GLP-M1) were used, and [3H] leucine incorporation, relative cell size, and total protein content were studied. As shown in Figure 10A, Ang II increased [3H] leucine incorporation by 36% in control cells compared to unstimulated cells, but failed to increase [3H] leucine incorporation in the cells expressing GLP in antisense orientation (GLP-AS) and GLP mutant M1 (GLP-M1). Ang II also increased relative cell size by 8.9% analyzed by flow cytometry as well as total protein content by 46% in control cells, but failed to do so in IRPTCs expressing GLP in antisense orientation (GLP-AS) and GLP mutant M1 (GLP-M1). These data suggest that the carboxyl terminal tail of GLP is required for Ang II-induced cellular hypertrophy in IRPTCs, and GLP expression level is essential for Ang II-induced cellular hypertrophic effect in IRPTCs.

Ang II stimulates GLP mRNA expression in IRPTCs — we further explored whether Ang II regulates GLP gene expression in IRPTCs. IRPTCs were treated with 100 nM Ang II for indicated time periods, and GLP mRNA expression was determined by a specific RT-PCR and its expression was normalized with β -actin mRNA expression. As shown in Figure 11A and B, Ang II stimulated GLP mRNA expression in a time-dependent manner. The maximal expression of GLP mRNA was seen about 16 hours after Ang II stimulation. The GLP mRNA expression stimulated by Ang II is also a dose dependent as shown in Figure 11C and D. These data demonstrate that Ang II-induced cellular hypertrophy in IRPTCs may due to increase GLP gene expression. To determine which Ang II receptor involved in Ang II-stimulated GLP mRNA expression in IRPTCs, specific receptor antagonists, losartan and PD123319 (10^{-6} M) were added into medium with Ang II for 8 hours, GLP mRNA expression was examined. As shown in Figure 11E and F, losartan, but not PD123319, reversed Ang II-increased GLP mRNA expression, indicating that the AT1 receptor is specifically involved in the regulation of GLP

mRNA expression in IRPTCs.

Discussion

In this study, we identify a novel GEF-like protein, GLP gene, by a yeast two-hybrid screening with the carboxyl terminal domain of the AT1 receptor as bait. We demonstrate overexpression of GLP gene induces cellular hypertrophy in two different rat cell lines, VSMCs and IRPTCs by five parameters. 1) protein content of VSMCs and IRPTCs expressing GLP gene was significantly higher than the control cells, 2) relative cell size measured by flow cytometry was significantly bigger in VSMCs and IRPTCs overexpressing GLP gene than in the control cells, 3) the ratio of [3H] leucine/[3H] thymidine incorporation, a cellular hypertrophy indicator, was significantly higher in VSMCs and IRPTCs overexpressing GLP gene than in the control cells, and 4) a greater activation of Akt2/PKB was seen in VSMCs overexpressing GLP gene than in the control cells, and 5) cellular p27kip1 protein level significantly increased in IRPTCs overexpressing GLP gene compared to IRPTCs transfected with pcDNA3 alone. We also demonstrate that the carboxyl terminal tail of GLP gene (430 to 531 amino acids) not only plays an important role in GLP-induced IRPTC hypertrophy, but is also required for Ang II-induced IRPTC hypertrophy.

A amino acid sequence analysis revealed that GLP protein contains a motif similar to that of RCC1 gene which is a GEF for small G protein Ran (52-57). In addition to a seven tandem repeats motif, GLP has an extra carboxyl terminal tail which the RCC1 gene does not possess (See Figure 1C). The carboxyl terminal domain of GLP gene (residues 371 to 531 amino acids) was identified to interact with the carboxyl terminal domain of the AT1 receptor in the yeast two-hybrid system. The GFP-GLP fusion protein is localized in part in the plasma membrane, and the AT1 receptor has also been shown to localize in the plasma membrane. These data suggest that GLP protein may co-localize with the AT1 receptor and regulate receptor functions.

Because the carboxyl terminal domain of the AT1 receptor has been reported to play an important role on the receptor internalization, desensitization and phosphorylation (30-35), we examined

whether GLP regulates the receptor function in cultured HEK-293 cells and VSMCs. Our studies revealed that overexpression of GLP gene failed to change the receptor-ligand binding activity in both cell lines (data not shown). It also did not affect the AT1 receptor internalization and desensitization in VSMCs overexpressing GLP gene, and in HEK-293 cells co-transfected with the AT1 receptor and GLP gene (data not shown), suggesting that it may not regulate the receptor endocytosis process, but it may regulate downstream signaling pathways after the activation of the receptor.

We then investigated whether GLP gene regulates cell growth in VSMCs. It is well known that the activation of the AT1 receptor stimulates several key signaling molecules involved in cell growth, such as mitogen-activated protein (MAP) kinase, Erk-1/2, Akt2/PKB and the cell cycle machinery (38-43). In the present study, the activation of Erk1/2 was not changed in VSMCs and IRPTCs overexpressing GLP gene compared to the control cells (data not shown). However, Akt2/PKB was significantly activated in VSMCs overexpressing GLP gene (Figure 5A). Akt2/PKB is a serine/threonine protein kinase that contains a region homologous to a pleckstrin domain (PH) that is part of a slightly larger portion in the NH2 terminus, termed the Akt homology domain. The PI3 kinase product phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate binds *in vitro* directly to the PH domain and activates enzyme activity (60). Akt/PKB has been shown to be activated by factors that stimulate PI3 kinase, including IGF, NGF, PDGF, and VEGF (a number of receptor tyrosine kinases), Ang II (GPCR), and insulin (60-62). Interestingly, Ang II has recently been reported to activate Akt2/PKB in a PI3 kinase-independent, but arachidonic acid-dependent and redox sensitive signalling pathway (41,63-66). Taken together, these data suggest that activation of Akt2/PKB is not only dependent on PI3 kinase activation, but also on reactive oxygen species signaling pathways. In the present study, we found that both LY294002, a PI3 kinase inhibitor, and DPI, an inhibitor of NADH/NADPH oxidase, significantly decreased the relative cell size measured

by flow cytometry and Akt2/PKB phosphorylation in VSMCs overexpressing GLP gene (Figure 6), supporting that the activation of Akt2/PKB is not only dependent on PI3 kinase activation, but also on the NADH/NADPH oxidase signaling pathway. Akt2/PKB has diverse regulatory functions. It promotes glucose transport through translocation of GLUT1 and GLUT4 to the plasma membrane, and controls glycogen synthesis by an insulin-dependent phosphorylation. These data demonstrate that Akt2/PKB promotes cell growth by acting at multiple stages of the cell cycle. Overexpression of Akt2/PKB in VSMCs has been demonstrated to induce hypertrophy and polyploidization (42).

On the other hand, the cell cycle molecular machinery has also been implicated to play an important role in cellular hypertrophy in VSMCs and IRPTCs (40,67-69). Cell cycle entry and progression, the final common pathway of cell-growth response, depends on the carefully regulated expression and activation of certain proteins, termed cyclin-dependent kinases (cdk), and their regulatory subunits, the cyclins (40,70). For the G1-phase, cyclin D, cyclin E, and cyclin A play an important role (71). Cyclin D complexes with cdk4/cdk6, and regulates G1-phase progression; cyclin E/cdk2 or cyclin A/cdk2 is essential for the G1/S transition; and cyclin A/cdk1 or cyclin B/cdk1 or 2 initiates mitosis (72). Cdks are activated through phosphorylation and dephosphorylation at specific sites, and this activation is controlled by cdk inhibitors that bind to and inhibit the activation of the cdk/cyclin complex. In cellular hypertrophy, cell cycle entry takes place, but the progression through cell cycle toward DNA synthesis and mitosis is blocked. Among cdk inhibitors, p27kip1 has been shown to play an important role in cell cycle regulation. High levels of p27kip1 present in quiescent (G0) cells, have been shown to decline upon mitogen induction (73). This decrease in p27kip1 appears to be critical in enabling the cells to enter the cell cycle. Cellular p27kip1 level has been shown as an indicator of cellular hypertrophy in VSMCs (40), and murine and rat proximal tubular cells (63-65). Furthermore, p27Kip1 regulates growth arrest in response to

TGF β , rapamycin, and contact inhibition. Thus, studies of p27kip1 expression combined with assessment of relative cell size by flow cytometry and [3H] leucine incorporation will give a better assessment of the hypertrophic effect induced by GLP gene. Interestingly, cellular p27Kip1 level was not changed between VSMCs overexpressing GLP gene and the control cells, suggesting that the hypertrophic effect of GLP gene is independent of p27Kip1 expression in VSMCs. However, cellular p27Kip1 expression significantly increased in IRPTCs overexpressing GLP gene, indicating that, unlike in VSMCs, the hypertrophic effect of GLP gene is dependent of cell cycle regulation in IRPTCs. IRPTCs were chosen as a second *in vitro* model to investigate the hypertrophic effect of GLP gene in addition to VSMCs. The experiments are designed to eliminate the possibility of side effects due to retroviral proteins, which was used to infect VSMCs in order to deliver the plasmid DNA into the cells. Although the relative cell size of the control cells (pLNCX) measured by flow cytometry was the same as that of uninfected VSMCs (data not shown), the hypertrophy observed could not be completely ruled out as a viral or rival protein's side effect. The results obtained from RPTCs overexpressing GLP gene with increased [3H] leucine incorporation combined with a higher p27Kip1 expression clearly demonstrated that the cellular hypertrophic effect was dependent on GLP gene's overexpression. Because the mRNA components of the renin-angiotensin system, including angiotensinogen, rennin, ACE, and AT1 receptor are all expressed in murine (rat and mouse) proximal tubular cell lines, IRPTCs can be used to further investigate the molecular mechanisms of Ang II- or high glucose-induced hypertrophy. In the present study, we demonstrated that Ang II, as a hypertrophic agent, indeed significantly stimulates GLP mRNA expression in rat IRPTCs. Similar results were observed in rat VSMCs and kidney mesangial cells. These data indicate that GLP gene expression may be important in Ang II-induced cellular hypertrophy in cultured cells.

In summary, we have identified a novel GEF-like protein, GLP gene, that induces cellular hypertrophy in cultured VSMCs and IRPTCs. The signaling pathways involved in the cellular hypertrophic effect of GLP gene are different in these two cell types. In VSMCs, the activation of Akt2/PKB plays an important role, while in IRPTCs, cellular p27kip1 expression plays an important role. The activation of Akt2/PKB in VSMCs seems to be PI3 kinase- and reactive oxygen species- dependent. Furthermore, the carboxyl terminal tail of GLP plays an important role in GLP- as well as Ang II-induced cellular hypertrophy in IRPTCs.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MT-14726), the Heart and Stroke Foundation of Canada, the Canadian Foundation for Innovation (D.F.G.), the Kidney Foundation of Canada (J.S.D.C), and the Creative Research Group Fund (30121005) from National Foundation Committee of Natural Science of P.R.China (X.M.C.). D.F.G. was supported by a scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

References

1. Peach, M.J. (1977) *Physiol. Rev.* **57**, 313-370
2. Owens, G. K. (1989) *Am. J. Physiol.* **257**, H1755-H1765
3. Phillips, M.I. (1987) *Annu. Rev. Physiol.* **49**, 413-435.
4. Pratt, R.E., Dzau, V.J. (1993) in *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* (Raizada, M.K., Phillips, M.I., and Sumners, C., eds.) pp. 471-483
5. Metsarinne, K.P., Stoll, M., Falkenhahn, M., Gohlke, P., and Unger, T. (1994) in *Angiotensin Receptors* (Saavedra, J.M., and Timmermans, P.B.M.W.M., eds.) pp. 235-253
6. Berk, B.C., Vekshtein, V., Gordon, H.M., and Tsuda, T. (1989) *Hypertension* **13**, 305-314
7. Geisterfer, A.A., Peach, M.J., and Owens, G.K. (1988) *Circ. Res.* **62**, 749-756
8. Schlondorff, D., DeCandido, S., and Satriano, J.A. (1987) *Am. J. Physiol.* **253**, C113-C120
9. Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D. and Alexander, R.W. (1994) *Circ. Res.* **74**, 1141-1148
10. Wang, D.H. and Prewitt, R.L. (1990) *Hypertension* **15**, 68-77
11. Morton, J.J., Beattie, E.C. and MacPherson, F. (1992) *J. Vasc. Res.* **29**, 264-269
12. Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Mirsky, I. And Braunwald, E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3310-3314
13. Baker, K.M., Chernin, M.I., Wixson, S.K. and Aceto, J.F. (1990) *Am. J. Physiol.* **259**, H324-H332
14. Mizuno, K., Tani, M., and Hashimoto, S. (1992) *Life Sci.* **51**, 367-374
15. Wolf, G. and Neilson, E.G. (1990) *Am. J. Physiol.* **259**, F768-F777
16. Sadoshima, J. and Izumo, S. (1993) *Circ. Res.* **73**, 413-423
17. Schorb, W., Booz, G.W., Dostal, D.E., Conrad, K.M., Chang, K.C. and Baker, K.M. (1993) *Circ. Res.* **72**, 1245-1254

18. Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.M. and Smith, R.D. (1993) *Pharmacol. Rev.* **45**, 205-251
19. Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J.J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. and Inagami, T. (1991) *Nature* **351**, 230-232
20. Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, K.K., Runge, M.S. and Bernstein, K.E. (1991) *Nature* **351**, 232-233
21. Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R.E. and Dzau, V.J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24539-24542
22. Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T. and Inagami, T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24543-24546
23. Hughes, A.D. (1998) *J. Human Hyptention* **12**, 275-281
24. Ribeiro, A.B., Kohlmann, Jr. O., Saragoca, M.A., Marson, O. and Ramos, O.L. (1985) *Drugs* **30**, 6-12
25. Dinh, D.T., Frauman, A.G., Johnston, C.I. and Fabiani, M.E. (2001) *Clinical Sci.* **100**, 481-492
26. Zhang, J. and Pratt, R.E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15026-15033
27. Ali, M.S., Sayeski, P.P., Dirksen, L.B., Hayser, D.J., Marrero, M.B. and Bernstein, K.E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23382-23388
28. Ju, H., Venema, V.J., Marrero, M.B. and Venema, R.C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 24025-24029
29. Sano, T., Ohyama, K., Yamano, Y., Nakagomi, Y., Nakazama, S., Kikyo, M., Shirai, H., Blank, J.S., Exton, J.H. and Inagami, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23631-23636
30. Conchon, S., Peltier, N., Corvol, P. and Clauser, E. (1998) *Am. J. Physiol.* **274**, E336-E345
31. Tang, H., Guo, D.F., Porter, J.P., Wanaka, Y. and Inagami, T. (1998) *Circ, Res.* **82**, 523-531

32. Thomas, W.G., Thekkumkara, T.J., Motel, T.J. and Baker, K.M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 207-213
33. Hunyady, L., Bor, M., Balla, T. and Catt, K.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31378-31382
34. Oppermann, M., Freedman, N.J., Alexandre, R.W. and Lefkowitz, R.J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13266-13272
35. Daviet, L., Lehtonen, J.Y.A., Tamura, K., Griese, D.P., Masatsugu, H. and Dzau, V.J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 17058-17062
36. Cui, T., Nakagami, H., Iwai, M., Takeda, Y., Shiuchi, T., Tamura, K., Daviet, L. and Horiuchi, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **279**, 938-941
37. Guo, D.F., Chenier, I., Tardif, V., Orlov, S.N. and Inagami, T. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 1254-1265
38. Naftilan, A.J., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (1989) *J. Clin. Invest.* **83**, 1419-1424
39. Naftilan, A.J., Gilliland, G.K., Eldridge, C.S., and Kraft, A.S. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5536-5540
40. Braun-Dullaeus, R.C., Mann, M.J., Ziegler, A., von der Leyen, H.E., and Dzau, V.J. (1999) *J. Clin. Invest.* **104**, 815-823
41. Gorin, Y., Kim, N.H., Feliars, D., Bhandari, B., Choudhury, G.G., and Abboud, H.E. (2001) *FESEB J.* **15**, 1909-1920
42. Hixon, M.L., Muro-Cacho, C., Wagner, M., Obejero-Paz, C., Millie, E., Fujio, Y., Kureishi, Y., Hassold, T., Walsh, K., and Gualberto, A. (2000) *J. Clin. Invest.* **106**, 1011-1020
43. Zafari, A.M., Ushio-Fukai, M., Akers, M., Yin, Q., Shah, A., Harrison, D.G., Taylor, W.R., and Griendling, K.K. (1998) *Hypertension* **32**, 488-495
44. Xu, Y.R., Guo, D.F., Mavidson, M., Inagami, T., and Garpenster, G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13463-13466

45. Miller, A.D. and Rosman, G.J. (1989) *BioTechniques* **7**, 980-990
46. Danos, O. and Mulligan, R.C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6460-6464
47. Ingelfinger, J.R., Zuo, W.M., Fon, E.A., Ellison, K.E. and Dzau, V.J. (1990) *J. Clin. Invest.* **85**, 417-423
48. Tang, S.S., Jung, F.F., Diamant, D., Brown, D., Bachinsky, D., Hellman, P. and Ingelfinger, J.R. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, F435-F436
49. Solban, N., Jia, H.P., Richard, S., Tremblay, S., Devlin, A., Peng, J., Gossard, F., Guo, D.F., Morel, G., Hamet, P., Lewanczuk, R., and Tremblay, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 32234-32243
50. Mackovic-Basic, M. Fine, L.G. Normal, J.T. Cargoe, E.J. Kurtz, I. (1992) *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 1124-1130
51. Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z. and Yaffe, D. (1983) *Nucleic. Acids Res.* **11**, 1759-1771
52. Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., Kuma, K., Miyata, T., Fukushige, S., Murotsu, T., Matsubara, K., and Nishimoto, T. (1987) *Genes and Development.* **1**, 585-593.
53. Saitoh, H., and Dasso, M. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 10658-10663.
54. Cheng, Y., Dahlberg, J.E., and Lund, E. (1995) *Science* **267**, 1807-1810
55. Bischoff, F.R., and Ponstingl, H. (1995). *Methods Enzymol.* **257**, 135-144
56. Tachibana, T., Imamoto, N., Seino, H., Nishimoto, Y., and Yoneda, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24542-24545
57. Carazo-Salas, R.E., Guarguaglini, G., Gruss, O.J., Segref, A., Karsenti, E., and Mattaj, I.W. (1999) *Nature* **400**, 178-181

58. Wolf, G., Neilson, E.G., Goldfarb, S. and Ziyadeh, F.N. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 902-909
59. Wolf, G., Killen, P.D. and Neilson, E.G. (1991) *Cell Regul.* **2**, 219-227
60. Hemmings, B.A. (1997) *Science* **275**, 628-630
61. Fujio, Y. and Walsh, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16349-16354
62. Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J. and Roth, R.A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31372-31378
63. Downward, J. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 262-267
64. Saward, L. and Zahradka, P. (1997) *Circ. Res.* **81**, 249-257
65. Takahashi, T., Taniguchi, T., Konishi, H., Kikkawa, U., Ishikawa, Y. and Yokoyama, M. (1999) *Am. J. Physiol.* **276**, 1927-1934
66. Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Yin, Q., Fujio, Y., Walsh, K. and Griendling, K.K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22699-22704
67. Hannken, T., Schroeder, R., Stahl, R.A. and Wolf, G. (1998) *Kidney Int.* **54**, 1923-1933
68. Wolf, G. (1999) *Kidney Int.* **54**, 1262-1265
69. Zhang, S.L., Chen, X., Wei, C.C., Filep, J.G., Tang, S.S., Ingelfinger, J.R. and Chan, J.S.D. (2002) *Endocrinology* **143**, 4627-4635
70. Chellappan, S.P., Giordano, A. and Fisher, P.B. (1998) *Circulation* **98**, 82-89
71. Sherr, C.J. (1995) *Proc. Assoc. Am. Physicians.* **107**, 181-186
72. King, R.W., Jackson, P.K. and Kirschner, M.W. (1994) *Cell* **79**, 563-571
73. Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995) *Genes Dev.* **9**, 1149-1163

Figure legends

Figure 1. **A**, sequence of human GLP cDNA and its predicted amino acid sequence. **B**, comparison of seven tandem repeats motif with their amino acid sequences. **C**, structure comparison of human GLP and RCC1 genes. GLP contains a seven tandem repeats motif similar to that of RCC1 protein. RCC1 is a GEF for small G protein Ran, which belongs to the Ras small GTPase superfamily. Number of amino acids in each tandem repeat are indicated. Putative AT1 receptor binding site is also shown in the carboxyl terminal domain of GLP gene.

Figure 2. GLP mRNA expression in different human tissues (**A**) and cell types (**B**). GLP protein expression in different cell types (**C**).

Figure 3. Intracellular localization of GFP-GLP in HEK-293 cells expressing a pcDNA3-GFP-GLP fusion protein observed with a fluorescence microscope (**A**). GLP overexpression induces bigger cell size in VSMCs visualized with a light microscope. VSMCs infected with pLNCX (**B**), and pLNCX-GLP (**C**), magnification: X200.

Figure 4. GLP gene induces cellular hypertrophy in VSMCs. Sub-confluent VSMCs were serum-starved for 48 hours, then incubated with [^3H] thymidine or [^3H] leucine for 4 hours or 24 hours respectively, before harvesting the cells. Radioactive incorporation was counted. For [^3H] thymidine incorporation experiments (**A**), $n=6$; and [^3H] leucine incorporation experiments (**B**), $n=8$; $*p < 0.001$. Relative cell size determined by flow cytometry as described in Materials and Methods (**C**). Cell viability (assessed by PI staining) was greater than 90% in each experiment.

FSC was expressed as arbitrary units, and the histogram of mean average cell size are shown (n=8, *p< 0.001). Total protein content experiment is shown in **D** (n=5, *p< 0.001).

Figure 5. Effect of GLP gene on the phosphorylation of Akt2/PKB protein and cellular p27Kip1 protein expression in VSMCs. **A**, a representative Western blot of phosphorylated Akt2/PKB. All blots were independently repeated, and quantification was done by laser densitometry (**B**), n=8; *p<0.001. **C**, a representative Western blot of p27Kip1 protein expression; all blots were quantified by laser densitometry (**D**), n=4. All experiments were performed in duplicate.

Figure 6. Effect of LY294002 and DPI on phosphorylation of Akt2 and relative cell size in VSMCs overexpressing GLP gene. To determine upstream signaling pathways of activation of Akt2/PKB, a PI3 kinase inhibitor, LY294002, and an NADH/NADPH oxidase inhibitor, DPI, were used in VSMCs overexpressing GLP gene. **A** shows a representative Western blotting result of phosphorylation of Akt2/PKB. **B** shows a histogram of percentage decrease by LY294002 and DPI on phosphorylation of Akt2 in VSMCs overexpressing GLP gene, LY294002 (n=3, *p< 0.001), and DPI (n=3, **p< 0.001), respectively. **C** shows the effect of LY294002 and DPI on the relative cell size measured by flow cytometry, LY294002 (n=3, *p< 0.05) and DPI (n=3, **p< 0.001), respectively. All experiments were performed in duplicate.

Figure 7. Establishment of IRPTC lines stably expressing pcDNA3-Myc-GLP (GLP), GLP deletion mutant M1 pcDNA3-Myc-GLP-M1 (GLP-M1), and GLP in antisense orientation (GLP-AS). IRPTC lines expressing pcDNA3-Myc-GLP (GLP) and its mutant M1 (GLP-M1) were determined with Western blot analysis using 9E10 monoclonal antibody against Myc epitope tag

sequences (A). IRPTC lines expressing GLP in antisense orientation (GLP-AS) were determined by RT-PCR as described in Materials and Methods, GLP mRNA expression in control and GLP cells are also shown (B).

Figure 8. Effect of GLP gene on cellular hypertrophy in different IRPTC lines. Fifty percent confluent IRPTCs transfected with pcDNA3 (Control), pcDNA3-Myc-GLP (GLP), GLP in antisense orientation (GLP-AS), and GLP mutant M, pcDNA3-Myc-GLP-M1 (GLP-M1) were serum-starved for 24 hours, then incubated with [3H] thymidine or [3H] leucine for 4 hours or 24 hours, respectively before harvesting the cells. [3H] thymidine (A) and [3H] leucine (B) incorporation experiments were performed (n=5, *p< 0.01). Relative cell sizes were determined with flow cytometry (C) (n=4, *p< 0.05). Total protein content experiments were shown in D (n=4, *P<0.01).

Figure 9. GLP overexpression induces p27Kip1 protein expression, but not activation of Akt2/PKB in different IRPTC lines. A, a representative Western blot of phosphorylated Akt2/PKB in different IRPTC lines, pcDNA3 (control), pcDNA3-Myc-GLP (GLP), GLP in antisense orientation (GLP-AS), and GLP mutant M1 (GLP-M1); all blots were quantified by laser densitometry (B). C, a representative Western blot of p27Kip1 protein expression and all blots were quantified by laser densitometry (D). All experiments were performed four times and *p< 0.01.

Figure 10. Effect of Ang II-induced hypertrophy in different IRPTC lines. Three IRPTC lines were used, pcDNA3 (control), GLP in antisense orientation (GLP-AS), and GLP mutant M1 (GLP-M1). Semi-confluent IRPTCs were serum-starved for 24 hours, then incubated with or without 10⁻⁷ M Ang II for 24 hours. For [3H] leucine incorporation experiments, [3H] leucine was added at same

time when Ang II was added into medium (**A**), $n=4$; $*p < 0.05$. Relative cell size was determined by flow cytometry (**B**, $n=3$, $*p < 0.05$). Total protein content experiment is shown in **C** ($n=5$, $*p < 0.01$).

Figure 11. Ang II stimulates GLP mRNA expression in a time- and dose-dependent manner in IRPTCs. GLP mRNA was determined by specific RT-PCR. The GLP mRNA expression was normalized with β -actin mRNA expression. **A**, time course of Ang II on the regulation of GLP mRNA expression in IRPTCs. Cells were stimulated with 100 nM Ang II for indicated time periods. **B**, GLP mRNA expression was quantified by laser densitometry from 4 experiments. **C**, effects of different concentration of Ang II on the regulation of GLP mRNA in IRPTCs. Cells were stimulated with indicated concentration of Ang II for 16 hours. **D**, GLP mRNA expression was quantified by laser densitometry from 4 experiments. **E**, Ang II type 1 receptor, but not type 2 receptor, is specially involved in Ang II-stimulated GLP mRNA expression in IRPTCs. Cells were stimulated with 100 nM Ang II with subtype specific receptor antagonists, losartan and PD123319 for 8 hours. **F**, GLPmRNA expression was quantified by laser densitometry from 3 experiments ($*p < 0.05$ and $** p < 0.01$).

A

```

ctctctctctt ttcacattttt aaotcgtttat tttttttata ttagaaaaac attgctttta tcccttggtt agcaggaaac ggcctcagtg tgatctttt 100
tgtcagttttt cttctttttt cotcttaagt ttttttata atacattttt atacttttaa atgactata aagtagcttg ctgtctttta tgtctgtta 200
ttctcagtaa ctgcttgagg coagagcAT GGTGGATGC GAAAAGTGG CCATCTTCAC TCTACTCTCC CCTCAAGAGA TCGCTCTAT TCGGAAGTG 300
      M V D V G K W P I F T L L S P Q E I A S I R K V

TGTGCTTCG GCACCTCAGC CAGTGAAGCA CTGTACGTTA CTGACAATGA TGAGGTCTTT GTATTTGGAC TGAACATAG TAACGTCTA GGAACCTGGAG 400
C V F G T S A S E A L Y V T D N D E V F V F G L N Y S N C L G T G D

ATAACCAGAG TACACTTGA CCGAAAAAGC TAGAAGGCTT ATGTGGAAG AAGATTAATA GCCTCAGTTA CGGGAGTGA CCACATGTC TTCTCAGCAC 500
N Q S T L V P K K L E G L C G K K I K S L S Y G S G P H V L L S T

CGAAGATGGA GTGGTTTATG CCTGGGGCCA CAATGGATAT AGCCAGCTTG GGAATGGGAC GACCAACCAA GGCATTGCTC CGTCCAGGT CTGTACCAAT 600
E D G V V Y A W G H N G Y S Q L G N G T T N Q G I A P V Q V C T N

CTCTGATCA AGCAAGTGGT GGAAGTAGCT TGTGGCTCAC ATCATTCAAT GGCTCTGGCA GCTGATGGAG AGGTGTTTGC TTGGGGTTAT AACAACTGTG 700
L L I K Q V V E V A C G S H H S M A L A A D G E V F A W G Y N N C G

GCCAAGTGGG ATCAGTCTT ACAGCAAATC AACCAACTCC TCGAAAAATT ACAAACTGTT TACATATTA GAGGGTAGTT GGCATTGCCT GTGGTCAGAC 800
Q V G S G S T A N Q P T P R K V T N C L H I K R V V G I A C G Q T

TTGATCCMAG GCTGTTCTGG AGAATGGGCA GGTATATGGC TGGGGTTACA ATGGCAACGG TCAGCTGGGC TTGGAAACA ATGGCAACA GCTGACCCT 900
S S M A L D N G E V Y G W G Y N G N G L G N H L G N H L T P

GTGAGATGG CAGCTTTGCA CAGCGTGTGT GTGAACGAGA TTTTCTGGG TAACGGAGAT AATGACGAC TAACAGATGA GGGCTTCTG TATGCTGGG 1000
V R V A A L H S V C V M Q I F C G N A H N L A L T D E G L L Y A W G

GAGTAAACAG ATATGGGAG CTGGGAACTG GCAATAAAAA TAACCTGCTA AGCCAGCAC ACATCATGTT GGAGAAAGA AGGGTGTAG AGATTGACG 1100
A N T Y G Q L G T G N K N N L L S P A H I M V E K E R V V E I A A

CTGTGACTCT GCCCACGT CTGCAGCAA GACCGAGGT GGGCAGTGT ACATGTGGG CGATGCGGG GGTGCTCCG TGATCTCCG GCACCTACC 1200
C H S A H T S A A K T Q G G H V Y M W G Q C R G Q S V I L P H L T

CACTTCTCCT GCACCGACA CGTGTTCGC TGCCTTGCCA CTCGGCCCGT CTGCTGGCCG CTCCTGCTG TGGAGCATGA AGACTTTTA ACAGTTGACG 1300
H F S C T D D V F A C F A T P A V S W R L L S V E H E D F L T V A E

AGTCACTGAA GAAAGAATT GATAGTCAG AAACCTGCTA TCTGAAGTTT CGAATTGAT GAAATATAT TCATGTCCAT AAAGCTGTT TGAAAATCAG 1400
S L K K E F D S P E T A D L K F R I D G K Y I H V H K A V L K I R

GTGTGAGCAT TTTGATCCA TGTTCAGTC GTATTGGAAT GAAGACATGA AGGAAGTAT AGAATCGAT CAGTTTTCTT ACCCAGTGA TCGTGCTTT 1500
C E H F R S M F Q S Y W N E D M K E V I E I D Q F S Y P V Y R A F

CTCCAGTACC TCTACACAGA CAGAGTCGAC CTGGCCGAC AAGATGCTAT AGGTCTTCTG GATTTGGCGA CATCTTACTG TGAANAACA CTGAAAAAC 1600
L Q Y L Y T D T V D L P P E D A I G L L D L A T S Y C E N R L K K L

TTTTGCAGCA CATTATCAAG AGAGGAATTA CTGTGGAGAA TGCCTTTTCT CTATTCTCTG CTGCAGTCAG ATATGATGA GAGGATTAG AAGAATTCTG 1700
C Q H I I K R G I T V E N A F S L F S A A V R Y D A E D L E E F C

CTTTAAGTTT TGCATCAATC ATTTGACAGA AGTTACACAG ACTGCAGCAT TTTGGCAAT GGATGGCCCT CTGCTAAAG AATTCAATGC TAAAGCCAGT 1800
F K F C I N H L T E V T Q T A A F W Q M D G P L L K E F I A K A S

AAATGGGAG CCTTAAAGAA CTGAagcga aggotctggt gttctgtgtt agtctcttgg ggaotcttgg aggatgtctt cagttctgto totagotgat 1900
K C G A F K N
oppgtctgt gttctgag gtaaaagcc atcaggttgt tttttttaa atctgggaa oagttgtctt tgtaggaa taaoaaggtt gtaoggttt 2000
tottgagc attttaaaa aooottgttt oagataagt gtatttttaa tgtgaocttt ogttaatttg ggotggaaa gtaaaaggtt gtaaggttag 2100
tctttctgg tottttttto atctttgact aggaaact ctgaacttgg aaagggag ctggaogaaa otctootpgg ooaogtaoa aooctctot 2200
gaaagagga gaaagtag ctggggaatt gtgagtaga tggagagc ooatctgtaa taaagatgo tgaootpgg atctttagt gctgoottag 2300
ctgctgctt agtagcctta ctgtgagga acactaaga tcttctcaga atcttcttgg tctggcttgg ogttggatga ctctctaaa ctccagata 2400
aatcaagta atagcttaa acgtctctta aacctgtga atgataact atgtaagat aatctctta ggttagtaa gttctctctt aagttcttag 2500
tgcctaaaga atgtactct agaaactcc ctgaaagct gataatgaaa gaattctgct gaaggtcgaat atctctaaa ctgaactcc oactctctt 2600
oaaaggtct tctctctctt caaggttago ggaactc 2637
    
```

B

```

MVDVGKWP I F TLLSPQE I AS IRKVCVFGTS ASEALYVTDN DEVFVFLNY -S- 51
NCLGTGDNQS TLVPKKLEGL CGKKIKLSY GSGPHVLLST EDGVVYAWGH NGY 53
SQLGNGTTNQ GIAPVQVCTN LLIKQVVEVA CGSHHSMALA ADGEVFAWGY NNC 53
GQVGSSTAN QP I PRKVTNC LHIKRVVGI A CGQTSSMAVL DNGEVYWG Y NGN 53
GQLGLGNNGN QLT PVRVAA- LHSVCVNQ I F CGNAHNLA L T DEGLLYAWGA NTY 52
GQLGTGNKN L LSPAHIMVE KERVE IAAC HSAHTSAKT QGGHVMWQ CR- 52
GQSVILPHLT HFSC TDDVFA CFATPAVSMR LLSV E HEDFL TVAESLKEF DSP 53

Consensus GQLG.G...N Q..P.RV... L..K.V...A CG..H...T ..GEVY.WG. N..
    
```

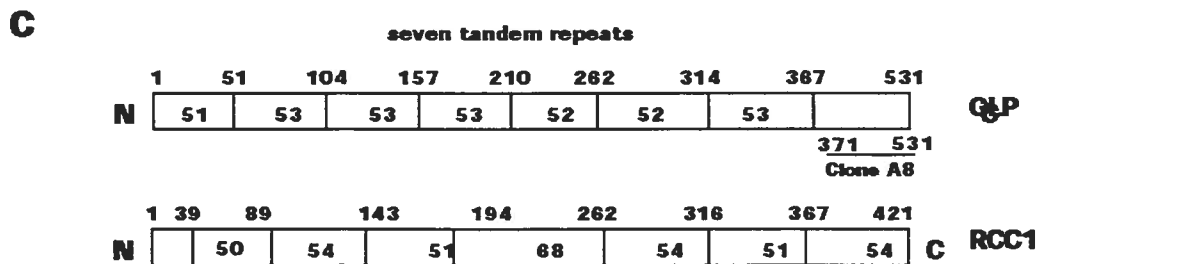


Figure 1

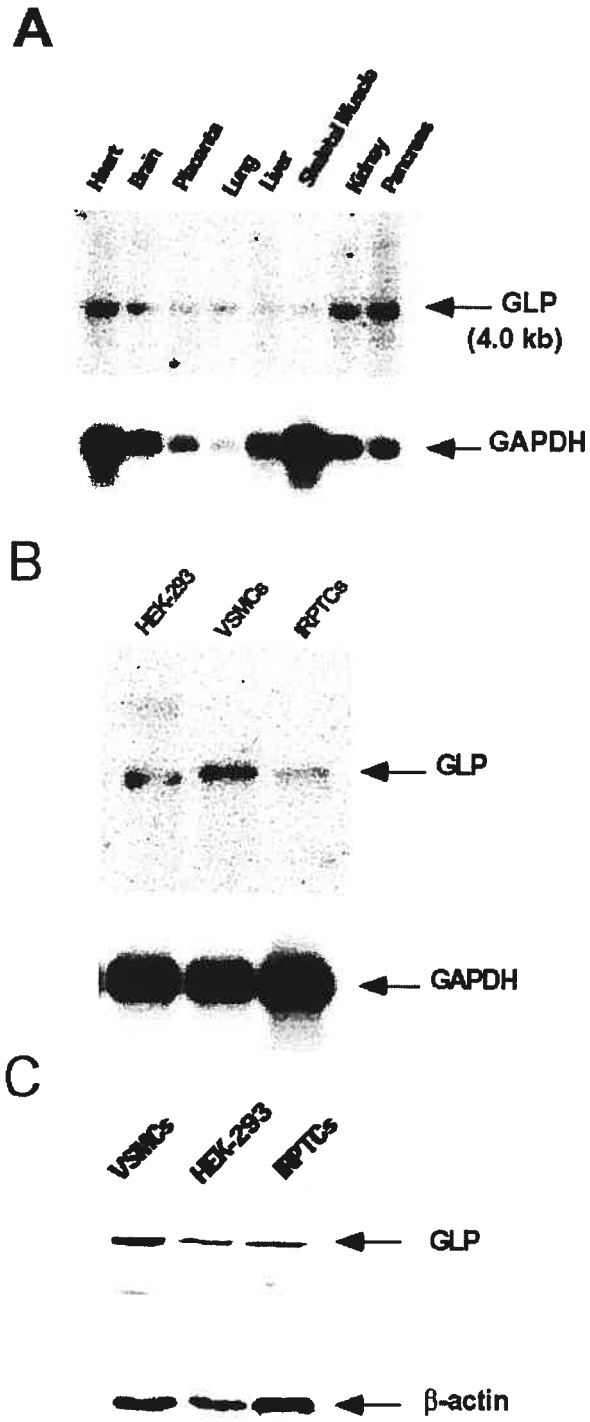


Figure 2

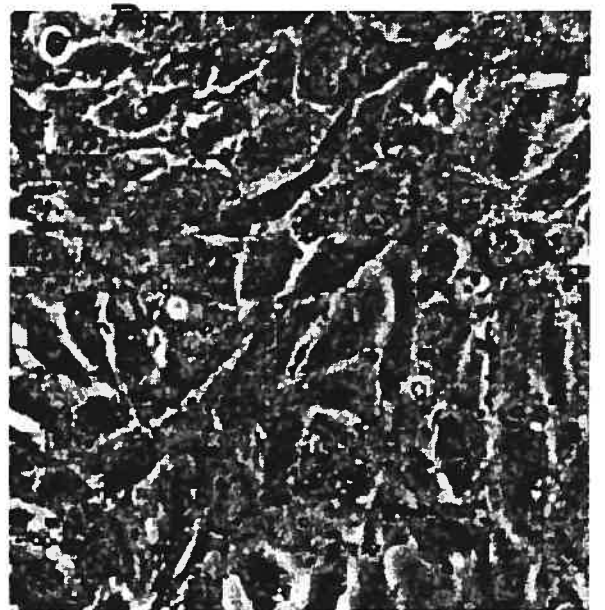
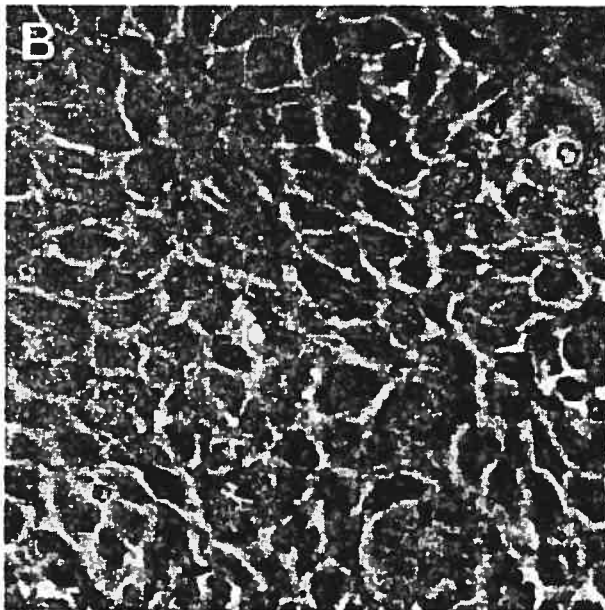
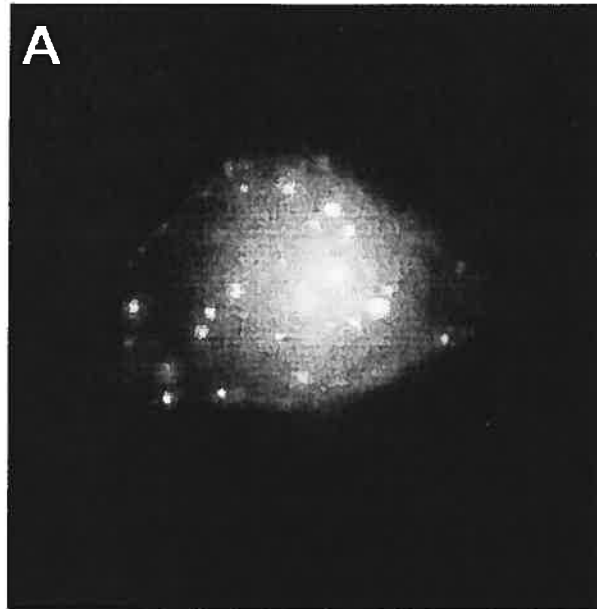


Figure 3

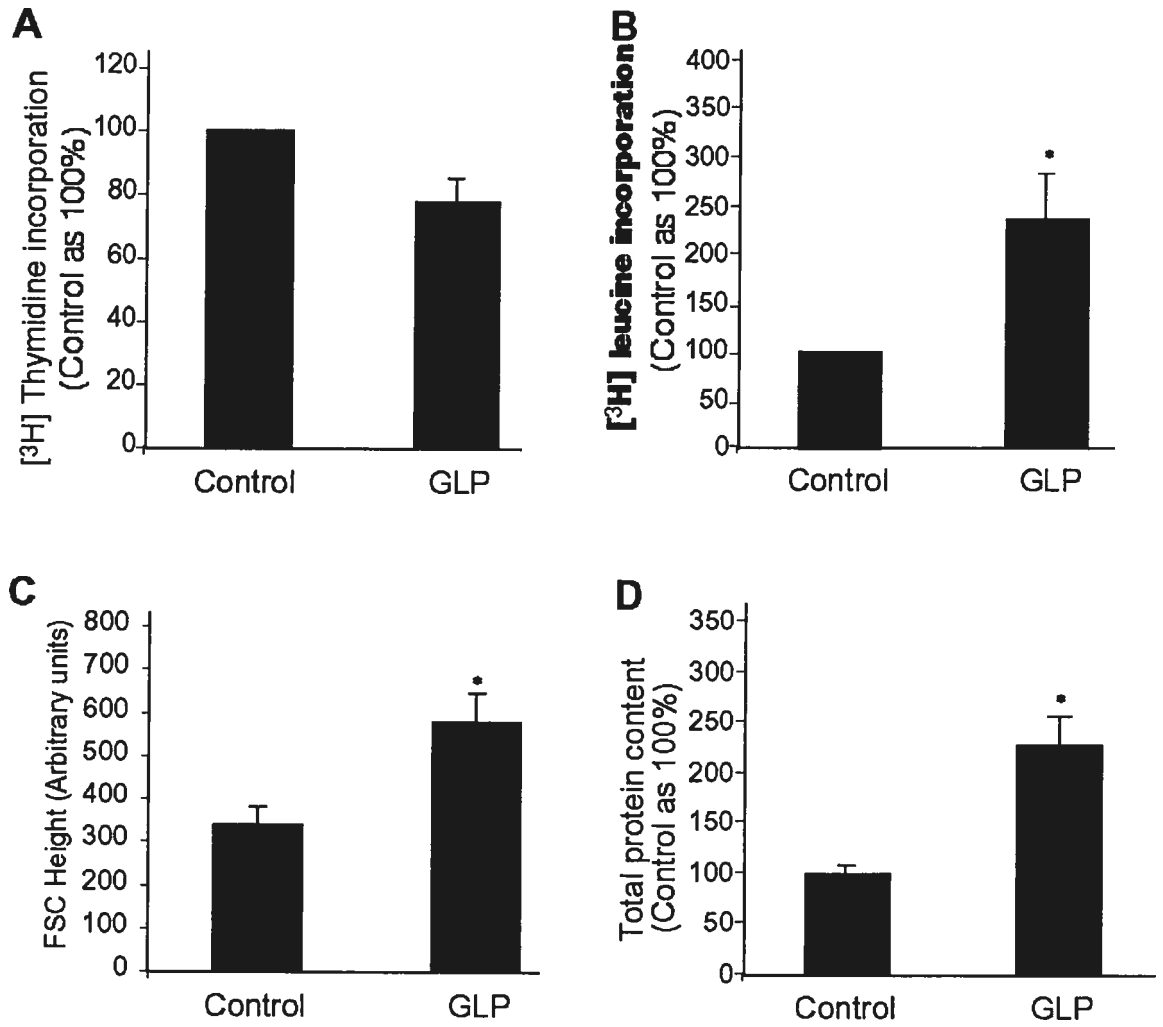


Figure 4

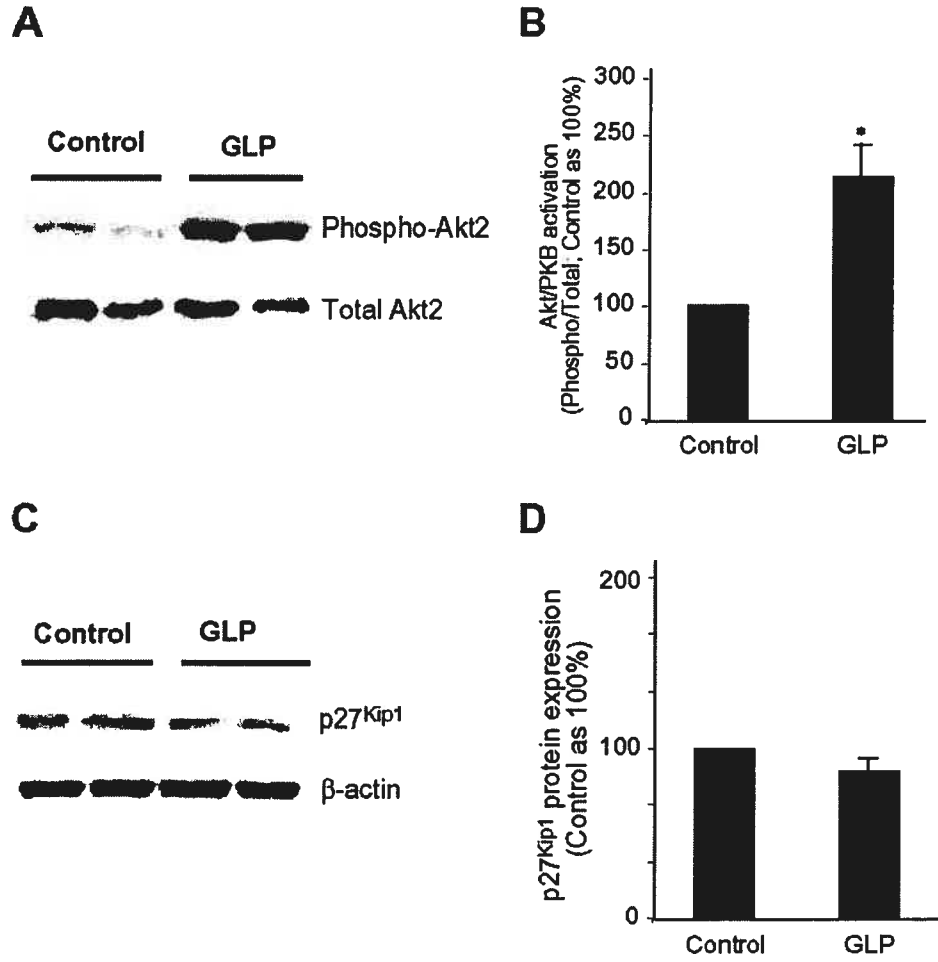


Figure 5

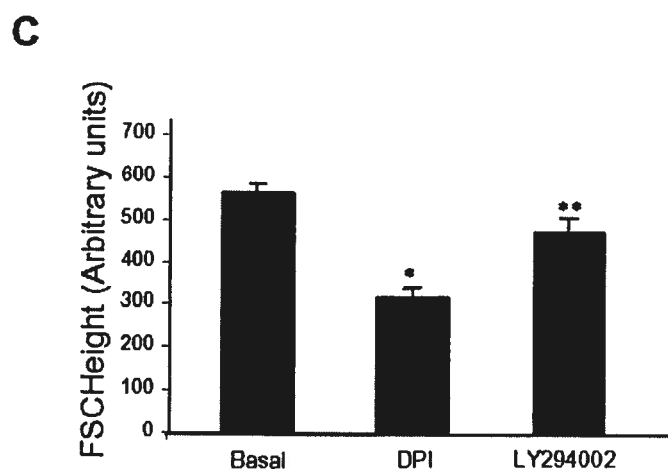
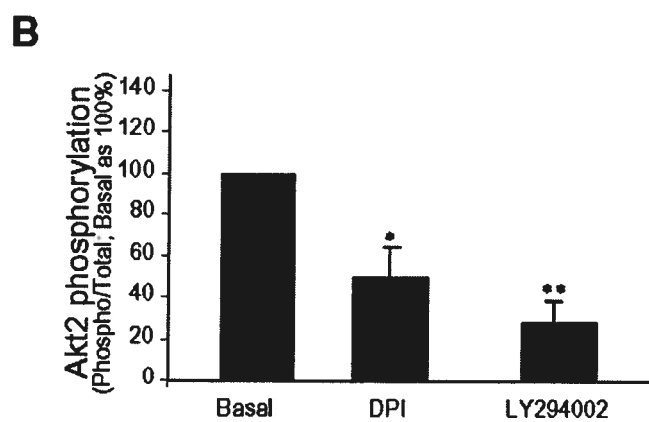
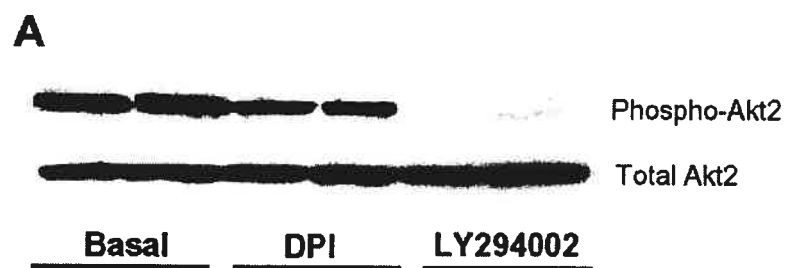


Figure 6

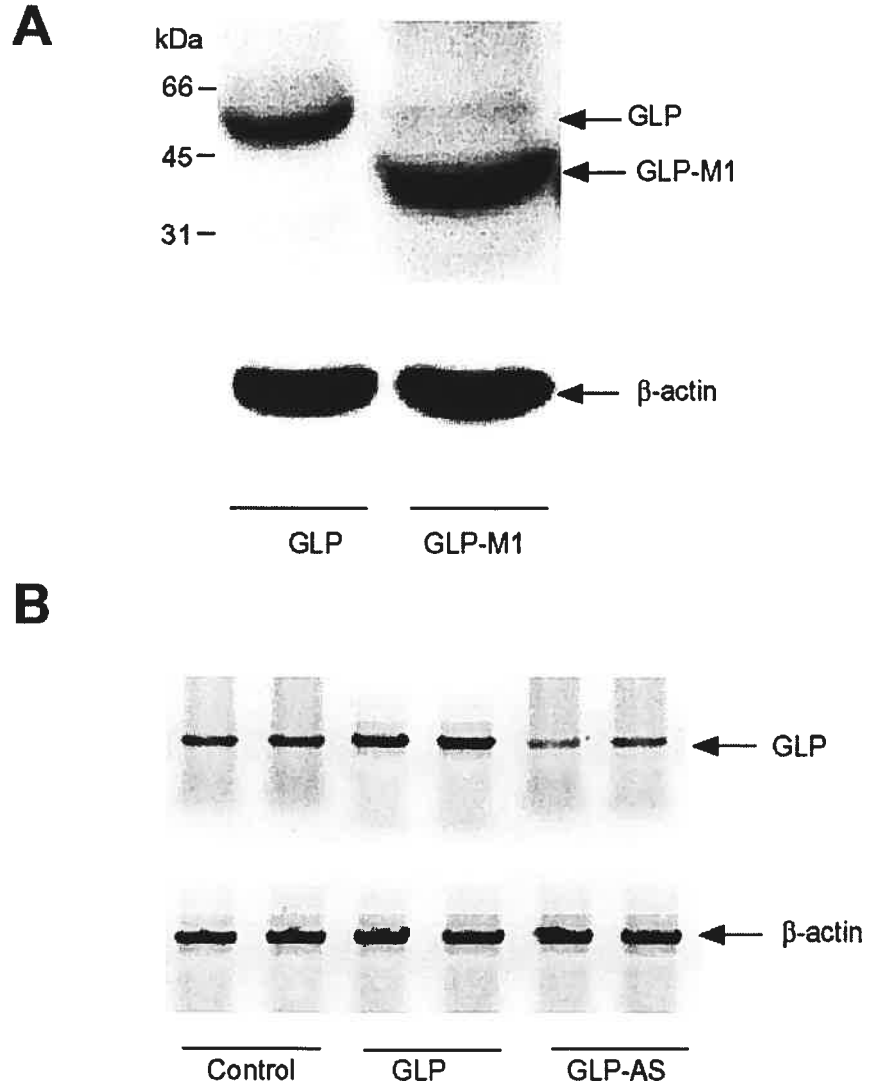


Figure 7

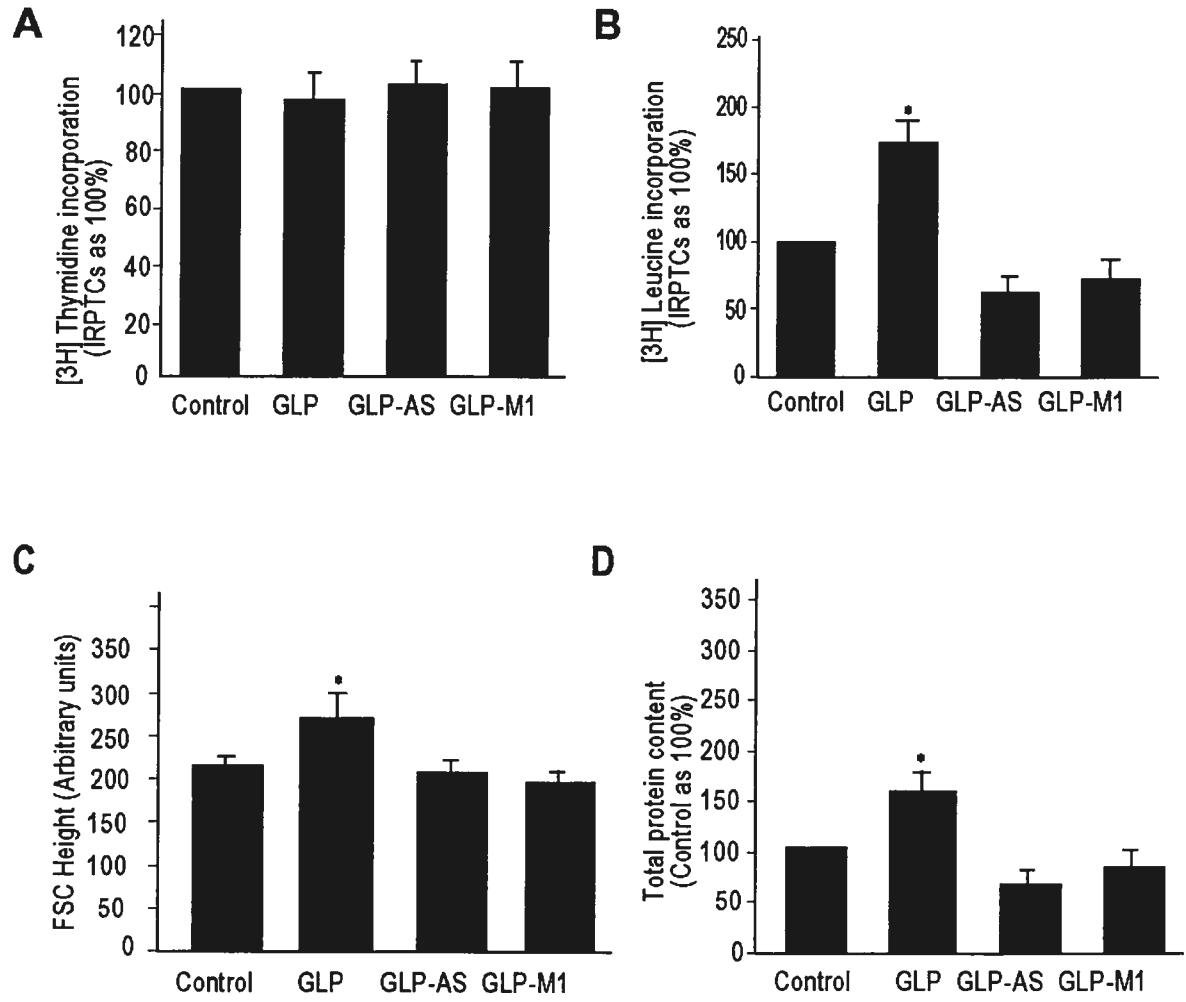


Figure 8

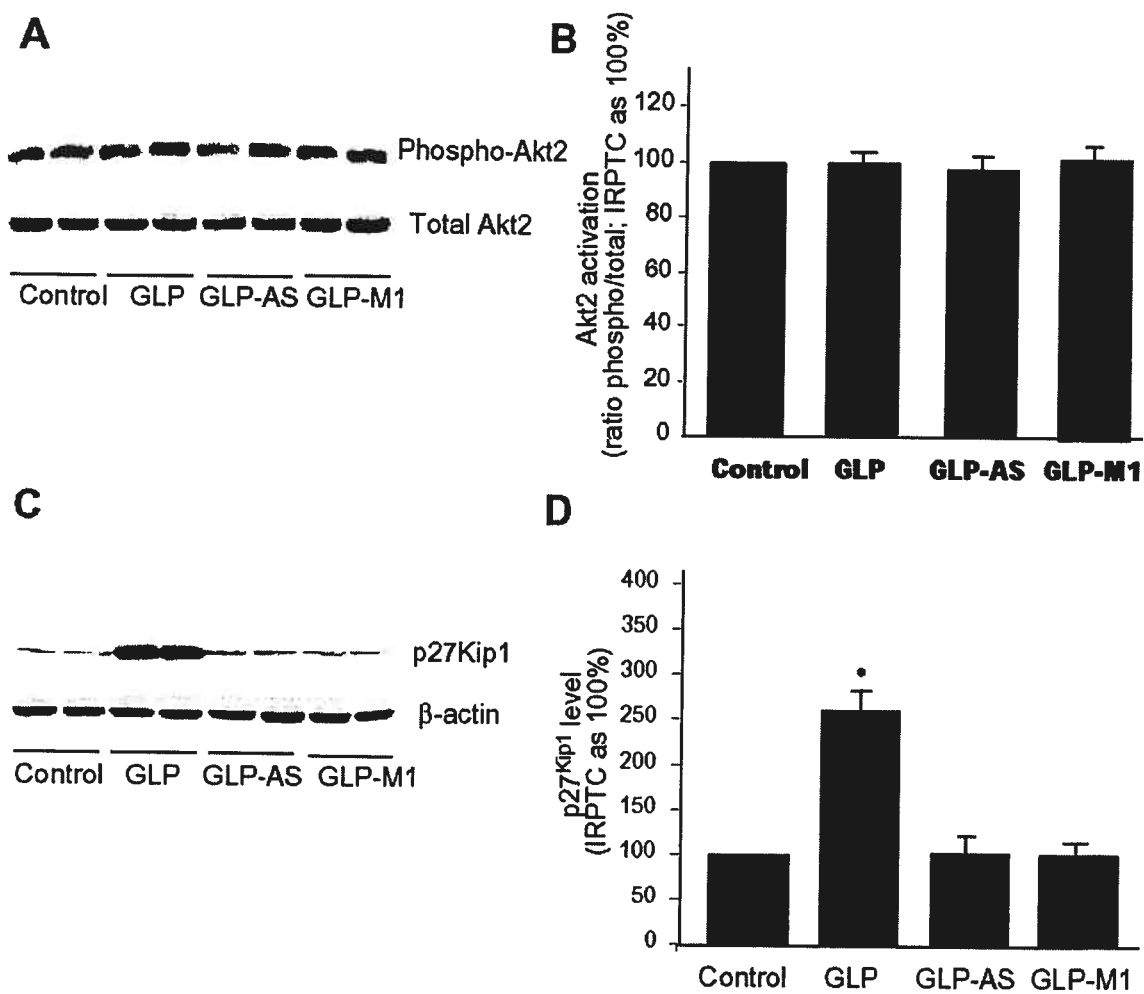


Figure 9

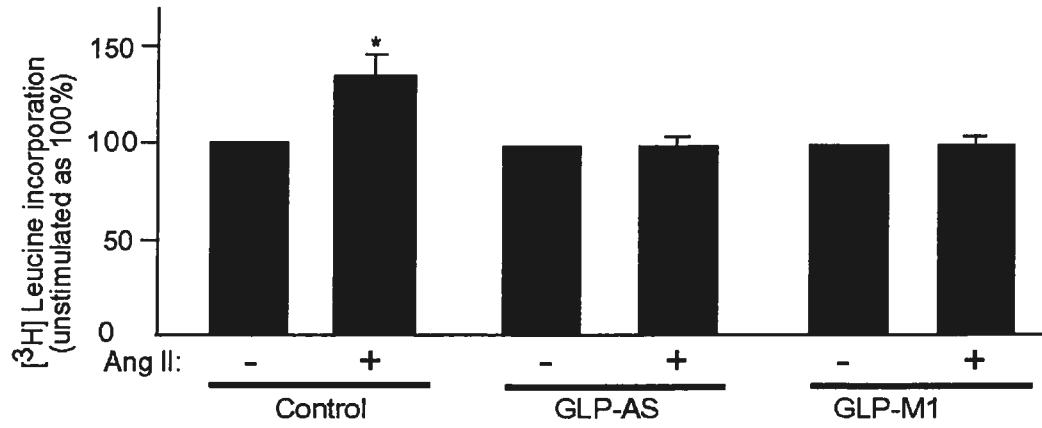
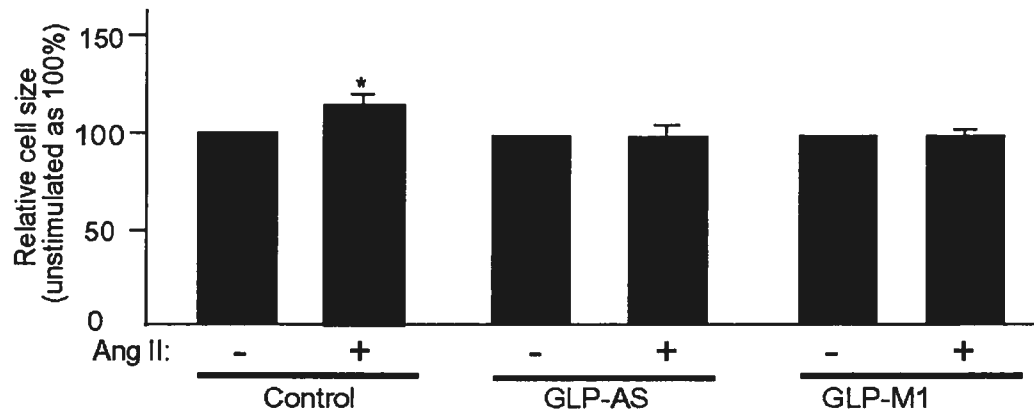
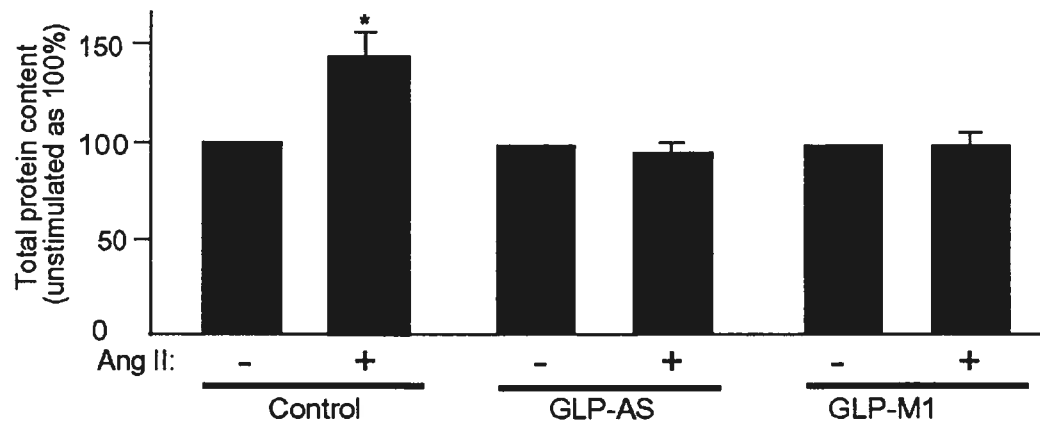
A**B****C**

Figure 10

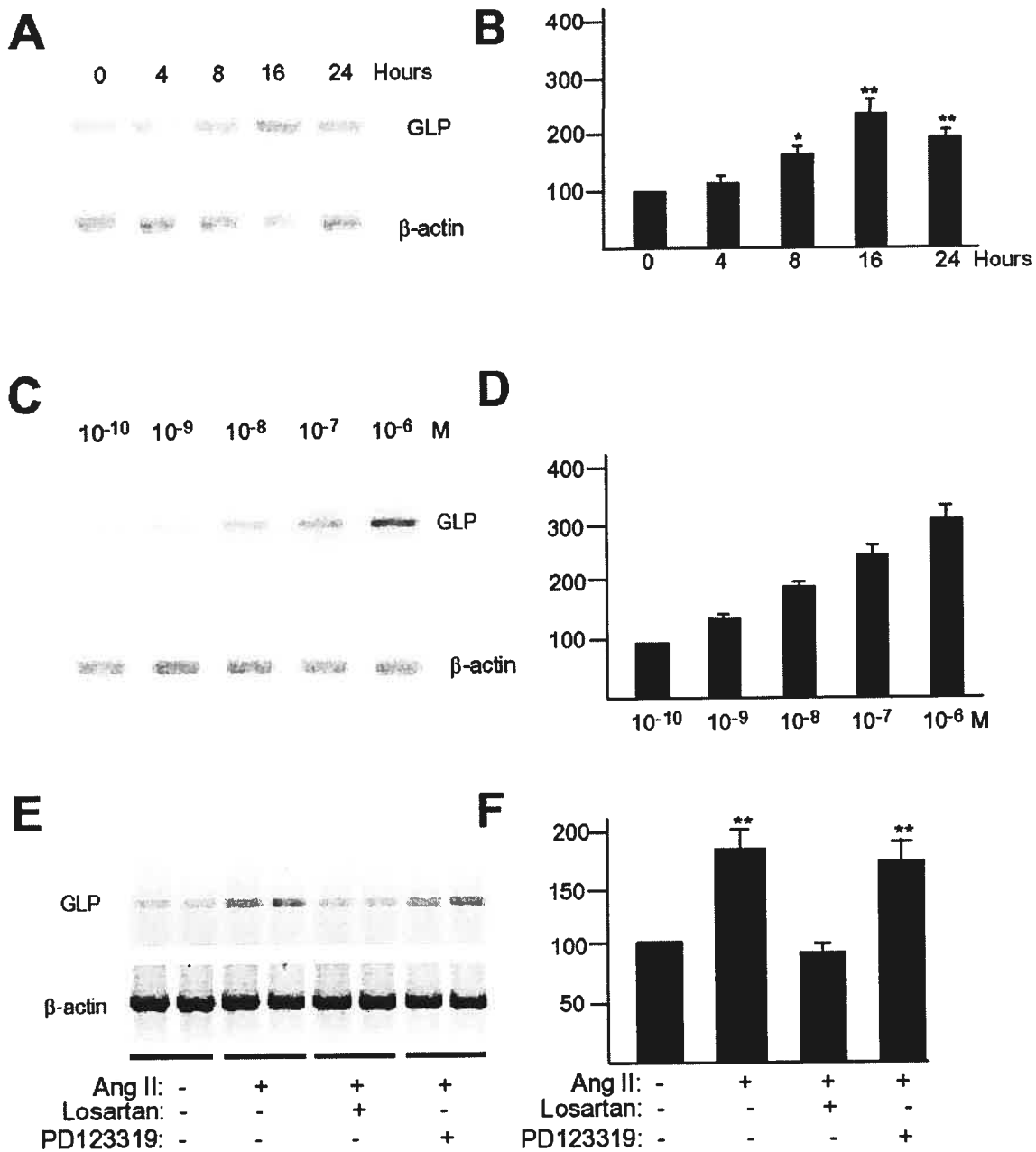


Figure 11

Chapitre 4

Article 2

Introduction

Il a été démontré dans le premier article que la surexpression du gène GLP induit de l'hypertrophie cellulaire dans les VSMCs et les IRPTCs. Le second article s'intéresse aux mécanismes moléculaires impliqués autant dans la régulation de l'expression de l'ARNm de GLP que dans l'induction, par GLP, d'hypertrophie cellulaire dans les IRPTCs. L'article suivant montre l'état de ces études.

Angiotensin II stimulates a novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein, GLP gene expression in rat kidney proximal tubular cells : mechanism of GLP-induced cellular hypertrophy.

Rôle des différents coauteurs

Dr. DengFu Guo m'a conseillé et dirigé sur les expériences à effectuer. Isabelle Chénier m'a conseillée et m'a apporté une aide technique importante. Karim Ghelima a fourni une aide importante en effectuant des expériences sur les IRPTCs donnant lieu à une figure dans l'article. Annick Desjardins a fourni une aide technique. Dr. John S. D. Chan a contribué par le biais de différentes discussions à la rédaction de l'article. Dre. Julie R. Ingelfinger nous a gracieusement fait don de la lignée d'IRPTC. Dre. XiangMei Chen a contribué par le biais de différentes discussions à la rédaction de l'article. Finalement, j'ai effectué la majorité des expériences concernant les IRPTCs.

Angiotensin II Stimulates a Novel Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein, GLP Gene Expression in Rat Kidney Proximal Tubular Cells: Mechanism of GLP-Induced Cellular Hypertrophy

VALERIE TARDIF, KARIM GHELIMA, ANNICK DESJARDINS, JULIE R INGELFINGER, ISABELLE CHENIER, XIANGMEI CHEN, JOHN S.D. CHAN and DENG-FU GUO

Department of Medicine (V.T., K.G., A.D., J.S.D.C, I.C., D.F.G.), University of Montreal and Research Center, CHUM-Hotel-Dieu Hospital, 3850, St-Urbain, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1T8; Harvard Medical School (J.R.I.), Massachusetts General Hospital, Pediatric Nephrology Unit, Boston, MA. U.S.A. 02114-3117; Department of Nephrology (X.M.C), General Hospital of the People Liberty Army, Beijing, China, 100853

Abbreviations: Ang II, angiotensin II; GLP, GEF-like protein; IRPTC, immortalized renal proximal tubular cell; ACE, angiotensin-converting enzyme; FBS, fetal bovine serum; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PBS, phosphate-buffered saline; TCA, trichloroacetic acid; GEF, GDP/GTP exchange factor; DPI, diphenylene iodonium chloride; EGF, epidermal growth factor; PI3 kinase, phosphatidylinositol 3 kinase; PDGF, platelet derived growth factor; PKC, protein kinase C; JAK, Janus kinase; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; PLC, phospholipase C; GPCR, G-protein coupled receptor; VAMC, vascular smooth muscle cells

Abstract

We have recently demonstrated that a novel angiotensin II (Ang II) type 1 receptor-associated protein, GLP induces cellular hypertrophy in rat immortalized renal proximal tubular cells (IRPTCs). The present studies investigated which signalling pathways are involved in Ang II stimulated GLP mRNA expression, as well as GLP-induced cellular hypertrophy in IRPTCs. Cellular GLP mRNA expression was determined by reverse transcription polymerase chain reaction. Ang II stimulated GLP mRNA expression in a time-, dose-, and AT1 receptor-dependent manner in IRPTCs. The maximal induction of GLP mRNA expression was observed about 16 hours after cells were exposed to Ang II. The effect of Ang II was blocked by epidermal growth factor receptor inhibitor, AG1478, PKC inhibitor, GF109203X, MAPK kinase inhibitor, PD98059, antioxidants, taurine and tiron, and NADH/NADPH oxidase inhibitor, DPI, whereas, no effects were observed on Ang II-induced GLP mRNA expression with p38 MAPK inhibitors, SB203580 and PD169316, and Janus kinase 2 inhibitor, AG490. IRPTCs stably expressing GLP gene significantly increased reactive oxygen species (ROS) generation compared to control IRPTCs analyzed by lucigenin assay. Furthermore, NADH/NADPH oxidase inhibitor, DPI, and antioxidants taurine and tiron inhibited GLP-induced total protein content and *de novo* protein synthesis. These studies demonstrated that the stimulatory action of Ang II on GLP mRNA expression in IRPTCs is mediated by multiple signal mechanisms, transactivation of EGF receptor and subsequent MAPK activation, PKC activation and ROS generation. Furthermore, the cellular hypertrophic effect of GLP gene in IRPTCs is mediated at least in part via ROS generation.

Keywords: AT1 receptor; angiotensin II; cellular hypertrophy; gene expression; renal proximal tubular cells; reactive oxygen species.

The pivotal role of glomerular hypertension and hyperfiltration in the pathogenesis of chronic renal failure has been intensively studied (1). A growing body of evidence indicates that angiotensin II (Ang II), besides other factors, may directly or indirectly play an important role on the adaptative alterations in glomerular haemodynamics after loss of functioning nephrons (2). On the other hand, the pivotal role of compensatory hypertrophy has been more recently recognized in the maladaptive processes associated with a reduction in renal tissue leading to fixed structural damage and progression towards end-stage renal failure (3,4). Enlargement of proximal tubular cells principally constitutes compensatory hypertrophy (5). Clinical trials and animal studies demonstrated that angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and Ang II receptor blockers prevented renal proximal tubular cellular hypertrophy (6-8), supporting the importance of Ang II in the pathogenesis of renal diseases. *In vitro*, Ang II has also been shown to stimulate cellular hypertrophy in different cell types including renal proximal tubular cells, glomerular mesangial cells and vascular smooth muscle cells (9-17).

The physiological actions of Ang II are mediated by two major subtypes of G-protein coupled receptors (GPCR), termed AT1 and AT2 (18-21). Most known actions of Ang II are believed to be mediated through AT1 receptors, whereas the function of AT2 receptors may be the opposite of AT1 receptors (22-26). AT1 receptor activation leads to cell growth, vascular contraction, inflammatory responses and salt and water retention, whereas AT2 receptor induces apoptosis, vasodilation and natriuresis (22). These effects are mediated via complex, interacting signaling pathways involving stimulation of phospholipase C (PLC) and Ca²⁺ mobilization; activation of protein kinase C (PKC), MAP kinases and NADH/NADPH oxidase, and stimulation of gene transcription (17,27,28). In addition, Ang II activates many intracellular tyrosine kinases that play a role in growth signaling and inflammation, such as Src, Pyk2, FAK and JAK/STAT (29-32). These events may be via direct or indirect transactivation of tyrosine kinase receptors, including epidermal growth factor (EGF) and platelet derived growth factor (PDGF) receptors (33,34).

We recently demonstrated that a novel AT1 receptor-associated protein, GLP, may play a pivotal role for the induction of cellular hypertrophy in IRPTCs and VSMCs (35). We reported that overexpression of GLP gene in the sense orientation, but not GLP gene in the antisense orientation, induces IRPTC hypertrophy. In the present studies, we investigated whether Ang II stimulates IRPTC hypertrophy via induction of GLP mRNA expression in IRPTCs. Subsequently, we studied which signal transduction pathway(s) are involved in Ang II-induced GLP mRNA expression and how GLP induces cellular hypertrophy in IRPTCs. We report here that transactivation of the EGF receptor, and subsequent activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) of MAPK, as well as PKC activation and reactive oxygen species (ROS) generation are important for Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. We also demonstrate that ROS generation may play an important role in GLP-induced IRPTC hypertrophy.

Materials and methods

Materials

Diphenylene iodonium chloride (DPI, an inhibitor of NADH/NADPH oxidase), taurine, an antioxidant, tiron, a superoxide scavenger, and lucigenin were purchased from Sigma, St-Louis, MO. Fetal bovine serum (FBS), restriction enzymes and Taq DNA polymerase were from Invitrogen Inc., Burlington, Ontario, Canada. AG490, an inhibitor of JAK2 kinase, AG1478, an inhibitor of EGF receptor, SB203580 and PD169316, inhibitors of p38 MAP Kinase, PD98059, an inhibitor of ERK1/2 MAPK kinase (MEK), and bisindolylmaleimide (GF109203X, an inhibitor of PKC) were obtained from Calbiochem, San Diego, CA.

Cell culture

IRPTCs at passage 11-18 were used in the present studies. Their characteristics have been described previously (35). These cells express the mRNAs of the renin angiotensin system components including angiotensinogen, renin, angiotensin converting enzyme (ACE), and AT1 and AT2 receptors (36,37). IRPTCs were grown in 100-mm plastic petri dishes (Sarstedt Inc.) in normal glucose (5mM glucose DMEM, pH 7.45) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Inc.). The cells were grown in a humidified atmosphere in 95% air/5% CO₂ at 37 OC and passaged three times a week by harvesting with trypsin/EDTA. Cells were synchronized for 24 hours in serum-free 5 mM DMEM medium at 75-80% confluence before the experiments.

Plasmid DNA

To establish IRPTCs stably overexpressing GLP gene in the sense orientation, pcDNA3-Myc-GLP, was constructed as described previously (35), and transfected into the cells by electroporation (BioRad). Briefly, 4 µg DNA were added into 400 µl of 10⁷ cells/ml in PBS buffer and pulsed at 400 volt and 500 µF for transfection. After two weeks of G418 (600 µg/ml) selection, positive cell lines were determined by Western blot analysis as described previously (35).

Measurement of GLP mRNA expression

To determine GLP mRNA expression, a specific RT-PCR was performed using the following primer set; 5'-AGTCATGGTGGATGTCCGAAA-3' (sense) and 5'-ATGTGAGCCACAAGCTACTTC-3' (antisense), corresponding to the nucleotide sequences of -4 to +17 and +393 to +414 of human GLP cDNA, respectively. Total RNAs were extracted with TRIzol reagent (Life Technologies, Inc.) according to the protocol of the supplier and quantified by its absorbance at 260 nm, and used in RT-PCR to quantify the amount of GLP mRNA expressed in IRPTCs. PCR reactions were performed as follows; 5 minutes at 95 °C for initial denaturation, followed by 32 cycles of 95 °C for 30 seconds, 56 °C for 45 seconds and 72 °C for 30 seconds with a final 5 minutes at 72 °C in the thermal cycler (MJ Research Inc. USA). The GLP mRNA expression was normalized with β -actin mRNA expression with the primer sets of 5'-ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC-3' (sense) and 5'-AGCATTGCGGTGCACGATGGAGGG-3' (antisense), corresponding to the nucleotide sequences +155 to 139 of exon 3, and nucleotide sequences +155 to +139 of exon 5 of the rat β -actin gene, respectively (38).

Measurement of ROS generation in IRPTCs

ROS production was determined by the lucigenin method (39) with minor modifications. Briefly, cells were trypsinized and collected by centrifugation, and the pellet was washed in modified Krebs buffer containing NaCl (130 mM), KCl (5 mM), MgCl₂ (1 mM), CaCl₂ (1.5 mM), K₂HPO₄ (1 mM), and HEPES (20 mM), pH 7.4. After washing, the cells were resuspended in Krebs buffer with 1 mg/ml BSA, and the cell concentration was adjusted to 1 × 10⁷ cells in 900 μ l buffer. To measure ROS production, the cell suspension was transferred into plastic tubes and assessed in a luminometer (LB 9507, Berthold, Wild-bad, Germany). Measurement was started by an injection of 100 μ l lucigenin (final concentration, 50 mM) and with or without 10⁻⁷ M Ang II.

Photon emission was counted every 1 min for up to 15 min. Modified Krebs buffer was used as a control (blank).

[3H] leucine incorporation

To determine cellular hypertrophy, [3H] leucine incorporation was measured. Cells were grown in 12-well plates, and made quiescent in serum-free medium for 24 hours. Cells were pulsed with 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ [3H] leucine for 24 hours, then, washed three times with PBS. Cellular proteins were precipitated for 30 minutes at 4 oC with Trichloroacetic acid (TCA), and lipid fractions were solubilized by washing twice with ice-cold ethanol. Precipitated proteins were resuspended in 0.25 N NaOH, transferred to plastic tubes, and counted in a scintillation counter. The experiments were performed in triplicate and repeated at least 3 times.

Western blotting analysis

Cells were rinsed with PBS and lysed in ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris, pH7.4, 100 mM NaCl, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 1% Triton, 1 mM Na-orthovanadate, 10 $\mu\text{g/ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin and leupeptin). Lysates were centrifuged at 4 oC for 10 minutes in a microfuge at maximum speed, and the supernatant was taken for Western blot analysis. Thirty micrograms of protein were separated on denaturing sodium dodecyl sulfate/10% polyacrylamide gel electrophoresis, and proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-C; Amersham Biosciences). Phosphorylation of ERK1/2 MAPK was detected by Western blotting with a phospho-specific antibody, and quantity of protein was normalized with total ERK1/2 MAPK protein expression. The relative densities of phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 MAPK bands were determined with a computerized laser densitometer. We analyzed the data quantitatively by applying a commercially available system (Kodak 1D image analysis software).

Cellular protein content

To assess the cellular protein content, the cells were rendered quiescent for 48 hours and then harvested with 0.05% EDTA. The number of cells per well was counted, lysed in 100 μ l 2M NaOH, and cellular protein content was determined by protein assay kit (Bio-Rad). BSA was used as a standard. Cellular protein content is an indicator of cellular hypertrophy, as shown by Mackovic-Basic et al. (40).

Statistical analysis

Three to eight separate experiments were performed, and each treatment group was assayed in triplicate unless indicated. The data were analyzed with the Student's *t*-test or analysis variance. A probability level of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

Amino acid sequence comparison of human and mouse GLP

We isolated human GLP cDNA from a human primary VSMC cDNA library. The predicted amino acid sequence revealed that GLP encodes a 531-amino acid protein with a calculated molecular mass of 58 kDa. A search in the Gene Bank database found that the mouse and rat GLP sequences have been reported. Mouse and rat GLP also encode a 531-amino acid protein, and have 96% and 94% similarity with human GLP, respectively. As shown in Figure 1, only 21- and 24-amino acid residues are different between human and mouse GLP, and human and rat GLP, respectively, indicating its high conservation in mammals. Analysis of the GLP protein sequence revealed that it contains a seven tandem repeats motif, which is similar to that of RCC1, a GEF for the small G-protein Ran (41-44). Each of the seven tandem repeats in GLP contains 51 to 53 amino acid residues, which, in order, are 51, 53, 53, 53, 52, 52 and 53 amino acids long from the starting codon of methionine.

Ang II stimulates GLP mRNA expression in IRPTCs

Our previous study has revealed that GLP overexpression induces cellular hypertrophy in cultured IRPTCs (35). Because GLP was identified as an AT1 receptor-associated protein and Ang II stimulates cellular hypertrophy in IRPTCs (35), we explored whether Ang II regulates GLP mRNA expression in IRPTCs. IRPTCs were treated with 100 nM Ang II for the indicated time periods, and GLP mRNA expression was determined by a specific RT-PCR and its expression was normalized with β -actin mRNA expression. As shown in Figures 2A and 2B, Ang II stimulated GLP mRNA expression in a time-dependent manner. Ang II significantly stimulated GLP mRNA expression 8 hours after cells were exposed to the agonist. The maximal expression of GLP mRNA was seen as a 1.8 folds increase 16 hours after Ang II stimulation compared to control cells. The GLP mRNA expression stimulated by Ang II is also dose dependent as shown in Figures 3A and 3B. These data clearly demonstrate that Ang II stimulates GLP mRNA expression in IRPTCs.

Ang II stimulates GLP mRNA expression via AT1 receptor, but not AT2 receptor signaling

To determine which Ang II receptor is involved in Ang II-stimulated GLP mRNA expression in IRPTCs, specific receptor antagonists, losartan (10^{-6} M) and PD123319 (10^{-7} M), were added into the medium with Ang II for 16 hours, and GLP mRNA expression was then examined. As shown in Figures 4A and 4B, losartan, but not PD123319, completely reversed Ang II-increased GLP mRNA expression, indicating that the AT1 receptor is specifically involved in the regulation of GLP mRNA expression in IRPTCs.

Transactivation of EGF receptor is involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs

In vitro evidence suggests that AT1-induced EGF receptor transactivation and cross-talk between AT1 and EGF receptor signalling cascades are important for some of the trophic effects

of Ang II. Ang II induced EGF receptor, Shc phosphorylation, and associated ERK1/2 MAPK activation are downstream signaling events of transactivated EGF receptor. As shown in Figures 5A and 5B, the EGF receptor specific inhibitor, AG1478 completely blocked Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs, suggesting that the transactivation of the EGF receptor is important for Ang II-induced GLP mRNA expression. To further determine the downstream event(s) of the transactivation of the EGF receptor signaling pathway, the ERK1/2 MAPK kinase (MEK) inhibitor, PD98059 was used, and it completely inhibited Ang II-induced GLP mRNA expression, indicating that subsequent activation of ERK1/2 MAPK is involved in Ang II's effect on GLP mRNA expression in IRPTCs.

PKC and ROS generation are involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs

It is well documented that Ang II evokes PKC activation via PLC and DAG in many cell types including IRPTCs (10,45). We then investigated whether the activation of PKC is involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. Cells were treated with PKC inhibitor, GF109203X, and GLP mRNA expression was determined. As shown in Figures 6A and 6B, GF109203X significantly, but not completely, inhibited Ang II-induced GLP mRNA expression.

Recent studies have shown that Ang II also activates ROS generation at least in part via the NADH/NADPH oxidase pathway (46,47). We further studied whether ROS generation is involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. DPI, an inhibitor of NADH/NADPH oxidase (10⁻⁶ M) was added in the cells with Ang II (10⁻⁷ M) for 16 hours. As shown in Figures 6A and 6B, DPI significantly, but not completely, inhibited Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. Tiron (10⁻⁴ M), a superoxide scavenger and taurine (5 × 10⁻³ M), an antioxidant, also partially inhibited Ang II-stimulated GLP mRNA expression. These results suggest that the activation of the PKC and ROS generation pathways are at least in part involved in Ang II-stimulated GLP mRNA expression in IRPTCs.

p38 MAPK and JAK2 are not involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs

Finally, we investigated whether the p38 MAPK and JAK-STAT pathways are involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. SB203580 and PD169316, inhibitors of p38 MAPK, and AG490, an inhibitor of JAK2 kinase were used. As shown in Figures 7A and 7B, these inhibitors did not affect Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. These findings indicate that perhaps the p38 MAPK and JAK2 kinase pathways are not involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs.

ROS generation is involved in GLP-induced IRPTC hypertrophy

In previous studies, we demonstrated that overexpression of GLP in the sense orientation induces IRPTC hypertrophy with increasing expression of p27Kip1 protein (35). However, the precise mechanism of how GLP induces IRPTC hypertrophy is still unknown. Since oxidative stress has been shown to be a common manifestation and a mediator of cardiovascular, neurological and numerous other complications of chronic renal failure, we then investigated whether GLP overexpression increases ROS generation in IRPTCs. As shown in Figure 8, IRPTCs stably expressing GLP gene significantly increased ROS generation by 2.2 folds compared to control IRPTCs. These data clearly demonstrate that GLP overexpression increases ROS generation in IRPTCs.

We further investigated whether the activation of ERK1/2 MAPK is involved in GLP-induced IRPTC hypertrophy. A phospho-specific antibody against ERK1/2 MAPK was used to determine the phosphorylated state of ERK1/2 MAPK in IRPTCs expressing GLP gene in the sense orientation and control cells. As shown in Figure 9, no significant change of the phosphorylation ERK1/2 MAPK was observed. This result indicates that the transactivation of the EGF receptor and subsequent activation of ERK1/2 MAPK pathway is not involved in GLP-induced IRPTC hypertrophy.

Inhibition of GLP-induced IRPTC hypertrophy by antioxidant agents

We then studied whether antioxidant agents block GLP-induced IRPTC hypertrophy. IRPTCs expressing GLP gene was treated with DPI (10^{-6} M), an inhibitor of NADH/NADPH oxidase, taurine (5×10^{-3} M), an antioxidant and tiron (10^{-4} M), a superoxide scavenger for 24 hours and protein synthesis was measured by [3 H] leucine incorporation assays. Protein synthesis was significantly inhibited with DPI, tiron and taurine as shown in Figure 10A. Similar results were obtained with a total protein content assay as shown in Figure 10B. These findings support that ROS generation may play an important role in GLP-induced IRPTC hypertrophy.

Discussion

In the present studies we demonstrated that Ang II stimulates GLP mRNA expression in a time-, dose-, and AT1 receptor-dependent manner in IRPTCs. We identified that transactivation of the EGF receptor, PKC activation and ROS generation play an important role in Ang II-stimulated GLP mRNA expression in IRPTCs. Furthermore, we observed that ROS generation plays a pivotal role in GLP-induced IRPTC hypertrophy. Since Ang II, as a single hypertrophic agent responsible for IRPTC hypertrophy, stimulates GLP gene expression in renal tubular cells, and GLP gene induces tubular cell hypertrophy, we speculate that a positive feedback mechanism exists between Ang II and GLP function on cellular hypertrophy of renal proximal tubular cells. These studies may provide a novel molecular mechanism of how Ang II induces cellular hypertrophy in renal proximal tubular cells.

An increasing number of studies suggest that structure changes in the tubularinterstitial architecture are a major determinant in the progression of renal disease (47). Quiescent tubular cells can either undergo hyperplasia or hypertrophy, two totally different growth responses (48,49). Hyperplasia of the tubular cells is defined as the mitotic regeneration of tubular cells with stimulated DNA synthesis and subsequent mitosis. In contrast, hypertrophic cells increase their size, their protein and RNA contents, but normally do not duplicate their set of chromosomes (5,50,51). Compensatory renal enlargement following chronic loss of nephrons is a classical example of tubular hypertrophy (5,50). In addition to the compensatory mechanism of tubular hypertrophy, a variety of vasoactive peptides such as Ang II have been reported to be major growth factors responsible for tubular cell hypertrophy (5,52). For example, osmotic minipump infusion of Ang II into animals for 14 days induces hypertrophy of the proximal tubule (53).

One of the major signal transduction pathways that links the activation of the AT1 receptor to nuclear events necessary for cell growth is the MAPK cascade (33,54,55). The classical MAP kinase cascade involves growth factor-induced activation of Raf-1 kinase, a serine/threonine kinase

that phosphorylates and activates the MAPK kinases, MEK-1/2, a dual-specificity kinase that activates the 44- and 42-kDa isoforms of ERK-1/2 MAPK, by phosphorylation on specific threonine and tyrosine residues. Activated ERK-1/2 can then translocate to the nucleus where it phosphorylates a number of transcription factors, including serum responsive element (SRE) binding factors, leading to enhanced transcription of multiple genes. Several studies have shown that cross communication between the AT1 and EGF receptor is required for the activation of the MAPK cascade (33). The biological significance of the transactivation of the EGF receptor by Ang II has been shown to be important for Ang II-induced VSMC hypertrophy. Inhibition of the EGF receptor function attenuates the activation of ERK1/2 MAPK and phosphoinositide 3-kinase (PI3) pathway, subsequently suppresses eukaryotic translation initiation factor 4E and 4E binding protein 1 phosphorylation, and reduces protein synthesis. In the present study, we demonstrated that the transactivation of the EGF receptor signaling cascade is important for Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs, but not for GLP-induced IRPTC hypertrophy. Taken together, these findings suggest that the transactivation of the EGF receptor by Ang II may indirectly have an effect on cellular hypertrophy in IRPTCs via increasing expression of GLP gene product.

It is well documented that Ang II evokes PKC activation via PLC and DAG in VSMCs and IRPTCs (10,57,58). PKC is a complex family of at least 11 isoenzymes classified into 3 groups: classic PKCs (PKC- α , - β I, - β II and γ), which require diacylglycerol (DAG), phospholipids, and Ca²⁺ for full activity; novel PKCs (PKC- δ , - ϵ , - η , and - θ), which are phospholipid- and DAG-dependent, but Ca²⁺-independent; and atypical PKCs (PKC- ζ , - λ and - μ), which require only phospholipids (59-62). Among those, 9 are activated by the lipid second messenger DAG. GF109203X is a specific PKC inhibitor of both Ca²⁺-dependent and -independent isoforms. It partially inhibited Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCS, suggesting that the activation of PKC may play an important role in the regulation of GLP gene expression. The studies are underway in our laboratory on which sub-type of PKC isoforms is important for Ang II

induced GLP mRNA expression using IRPTCs expressing dominant negative mutants of these PKC isoforms.

At present, we do not know the exact molecular mechanism(s) for the stimulatory effect of Ang II (that is, the downstream pathways after the activation of PKC, ROS and EGF receptor) on the expression of rat GLP mRNA in IRPTCs. Searching the Gene-bank database revealed that human GLP gene is located on chromosome 13q14, and its putative promoter sequence was found in the human DNA sequence from clone RP11-185C18 (Gene-bank access number AI139321). We analyzed about 4 kb of genomic sequence of the 5'-flanking region of human GLP gene from Gene-bank database, and found that the GLP gene promoter is TATA box-less, but contains a GC box. Further analysis revealed that the GLP gene promoter contains two SRF (serum responsive factor) binding sites located at positions 772 and 792, two NF- κ B (nuclear factor) binding sites located at positions 235 and 744, and one AP-1 (activator protein-1) binding site at position 1266 bp upstream of the GC box, respectively. Modulation of gene expression by oxidative stress occurs primarily through the redox-regulation of transcription factors, such as NF- κ B and AP-1 (63,64). We are subcloning the putative GLP promoter DNA and studies are ongoing in our laboratory to explore which transcription factors are responsible for the stimulatory effect of Ang II on the expression of GLP mRNA in IRPTCs.

Normally, ROS are contained by a wide array of antioxidant enzymes and endogenous and dietary antioxidants. The excess production of ROS or impaired antioxidant defense capacity leads to oxidative stress, in which uncontained ROS cause tissue damage and dysfunction. The primary ROS produced in the body is superoxide (O_2^-), which is converted to hydrogen peroxide by superoxide dismutases. Hydrogen peroxide is, in turn, reduced to water by either catalase or glutathione peroxidase. Generation of ROS and subsequent activation of redox-sensitive pathways are common end-points of many signalling pathways. The major source of oxygen intermediates in the vascular wall and proximal tubule is nonphagocytic NADH/NADPH oxidase, which is regulated by Ang II (65). The best characterized system in vascular smooth muscle cells

is the Ang II-stimulated NADH/NADPH oxidase mediated generation of O₂⁻ radical, which appears to be involved in cellular hypertrophy (66-68). Activation of this oxidase by Ang II involves c-Src, arachidonic acid metabolites and PLD-mediated phosphatidylcholine hydrolysis (69). In the present study, we demonstrated that IRPTCs stably expressing GLP gene significantly increase ROS generation compared to control IRPTCs, and that NADH/NADPH oxidase inhibitor and anti-oxidants significantly blocked GLP-induced cellular hypertrophy in IRPTCs. These results suggest for the first time that ROS generation plays an important role in GLP-induced IRPTC hypertrophy. At present, we do not know the exact molecular mechanism(s) of how GLP activates ROS generation in IRPTCs. One possibility is that the overexpression of GLP gene may mediate an increase in the activity of membrane-bound NADH/NADPH oxidase, a key enzyme in one pathway of O₂⁻ generation. Ang II, as a single hypertrophic agent, indeed significantly stimulates GLP mRNA expression in rat IRPTCs.

Taken together, our model of how Ang II stimulates GLP mRNA expression in IRPTCs and how GLP induces IRPTC hypertrophy is proposed in Figure 11. EGF receptor transactivation, subsequent activation of ERK1/2 MAPK, activation of PKC and ROS generation are involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. The NADH/NADPH oxidase pathway is at least in part involved in GLP-induced cellular hypertrophy in IRPTCs. There is a feedback mechanism between GLP mRNA expression and GLP-induced cellular hypertrophy. These data indicate that GLP gene expression may be important in Ang II-induced cellular hypertrophy in cultured IRPTCs.

In summary, we have demonstrated that Ang II stimulates GLP mRNA expression in a time-, dose-, and AT1 receptor-dependent manner in IRPTCs. We have also found that the transactivation of the EGF receptor, PKC activation and ROS generation play an important role in Ang II-stimulated GLP mRNA expression in IRPTCs. Furthermore, we have demonstrated that ROS generation is at least in part involved in GLP-induced cellular hypertrophy in IRPTCs. Given that tubular hypertrophy may promote subsequent development of interstitial fibrosis, administering oxygen radical scavengers may be a therapeutic tool to counteract Ang II-

dependent remodelling of renal tubular cells. These data may also provide a novel molecular target to develop therapeutic drugs to treat patients with Ang II-dependent renal diseases.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Deng-Fu Guo, Research Centre, CHUM-Hotel-Dieu Hospital, 3850, Saint Urbain Street, Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8. E-mail: guod@magellan.umontreal.ca.

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MT-14726), the Heart and Stroke Foundation of Canada, the Canadian Foundation for Innovation (D.F.G.), the Kidney Foundation of Canada, the Canadian Institutes of Health Research (MOP 13420) (J.S.D.C.), and MOP 62920 (J.S.D.C. and D.F.G.), the Main State Basic Research Development Program of the People's Republic of China (G200057003), and the Creative Research Group Science Fund of the Natural Science Foundation of China (30121005) (X.M.C).

References

1. **Brenner B.** 1985 Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol* 249:F324-F337
2. **Pelayo JC, Quan AH, Shanley PF.** 1990 Angiotensin II control of the renal microcirculation in rats with reduced renal mass. *Am J Physiol* 258:F414-F422
3. **Fries JWU, Sandstrom DJ, Meyer TW, Rennke HG.** 1989 Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab Invest* 60:205-218
4. **Yoshida Y, Fogo A, Ichikawa I.** 1989 Glomerular hemodynamic changes vs. hypertrophy in experimental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 35:654-660
5. **Wolf G, Neilson EG.** 1991 Molecular mechanisms of tubulointerstitial hypertrophy and hyperplasia. *Kidney Int* 39:401-420
6. **Wolf G, Wenzal U, Hannken T, Stahl RAK.** 2001 Angiotensin II induces p27Kip1 expression in renal tubules in vivo: role of reactive oxygen species. *J Mol Med* 79:382-389
7. **Brewster UC, Perazella MA.** 2004 The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 116:263-272
8. **Vaziri ND.** 2004 Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:93-99
9. **Wolf G, Neilson EG.** 1993 Angiotensin II as a hypertrophy cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int [Suppl 39]* 43:S100-S107
10. **Wolf G, Neilson EG.** 1990 Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. *Am J Physiol* 259:F768-F777
11. **Mori T, Cowley AW Jr.** 2004 Role of pressure in angiotensin II-induced renal injury, chronic servo-control of renal perfusion pressure in rats. *Hypertension* 43:752-759

12. **Nishiyama A, Seth DM, Navar LG.** 2003 Angiotensin II type 1 receptor-mediated augmentation of renal interstitial fluid angiotensin II in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertension* 21:1897-1903
13. **Touyz RM.** 2003 Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:165-174
14. **Gorin Y, Kim NH, Feliers D, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE.** 2001 Angiotensin II activates Akt/protein kinase B by an arachidonic acid/redox-dependent pathway and independent of phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J* 15:1909-1920
15. **Gooch J, Barnes JL, Garcia s, Abboud HE.** 2002 Calcineurin is activated in activated in diabetes and is required for glomerular hypertrophy and ECM accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F114-F115.
16. **Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK.** 1998 Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32:488-495
17. **Sabri A, Govindarajan G, Griffin TM, Byron KL, Samarel AM, Lucchesi PA.** 1998 Calcium- and protein kinase C-dependent activation of the tyrosine kinase PYK2 by angiotensin II in vascular smooth muscle. *Circ Res* 83:841-851
18. **Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T.** 1991 Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type 1 receptor. *Nature* 351:230-232
19. **Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE.** 1991 Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351:232-233
20. **Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ.** 1993 Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven transmembrane receptors. *J Biol Chem* 268:24539-24542

21. **Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T.** 1993 Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 268:24543-24546
22. **Gasparo MD, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger TH.** 2000 International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472
23. **Hughes AD.** 1998 Molecular and cellular mechanisms of action of angiotensin II (AT1) receptors in vascular smooth muscle. *J Hum Hypertens* 12: 275-281
24. **Ribeiro AB, Kohlmann O Jr, Saragoca MA, Marson O, Ramos OL.** 1985 The renin-angiotensin system in the control of systemic arterial pressure. *Drugs* 30:6-12
25. **Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani MF.** 2001 Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci* 100:481-492
26. **Zhang J, Pratt RE.** 1996 The AT2 receptor selectively associates with G α 2 and G α 3 in the rat fetus. *J Biol Chem* 272:23382-23388
27. **Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK.** 1998 p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. *J Biol Chem* 273:15022-15029
28. **Dimmeler S, Zeiher AM.** 2000 Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis on response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regulatory peptides* 90:19-25
29. **Haendeler J, Berk BC.** 2000 Angiotensin II mediated signal transduction important role of tyrosine kinases *Regulatory Peptides* 95:1-7
30. **Bernstein KE, Marrero MB.** 1996 The importance of tyrosine phosphorylation in angiotensin II signaling. *Trends Cardiovasc Med* 6:179-187
31. **Venema RC, Ju H, Venema VJ, Schieffer B, Harp JB, Ling BN, Eaton DC, Marrero MB.** 1998 Angiotensin II-induced association of phospholipase C γ 1 with the G protein-coupled AT1 receptor. *J Biol Chem* 273:7703-7708

32. **Venema RC, Venema VJ, Eaton DC, Marrero MB.** 1998. Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 1 is regulated by Janus-activated kinase 2 and Fyn kinase and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J Biol Chem* 273:30795-30800
33. **Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Mastumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T.** 1998 calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced nitrogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273:8890-8896
34. **Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA.** 1995 Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270:12563-12568
35. **Guo DF, Tardif V, Ghelima K, Chan JSD, Ingelfinger JR, Chen XM, Chenier I.** 2004 A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. *J Biol Chem* 279:21109-21120
36. **Ingerfinger JR, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ.** 1990 In situ hybridization evidence for angiotensinogen mRNA in the rat proximal tubule. A hypothesis for the intrarenal renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 85:417-423
37. **Tang SS, Jung FF, Diamant D, Brown D, Hellman P, Ingerfinger JR.** 1995 Temperature-sensitive SV40 immortalized rat proximal tubule cell line has functional renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 268:F435-F436
38. **Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D.** 1983 The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic β -actin gene. *Nucleic Acids Res* 11:1759-1771
39. **Hsieh TJ, Zhang SL, Filep, JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JSD.** 2002 High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 143:2975-2985

40. **Mackovic-Basic M, Fine LG, Normal JT, Cargoe R, Kurtz I.** 1992 Stimulation of Na⁺/H⁺ exchange is not required for induction of hypertrophy of renal cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 3:1124-1130
41. **Cheng Y, Dahlberg JE, Lund E.** 1995 Diverse effects of the guanine nucleotide exchange factor RCC1 on RNA transport. *Science* 267:1807-1810
42. **Bischoff FR, Ponstingl H.** 1995 Catalysis of guanine nucleotide exchange of Ran by RCC1 and stimulation of hydrolysis of Ran-bound GTP by Ran-GAP1. *Methods Enzymol* 257:135-144
43. **Tachibana T, Imamoto N, Seino H, Nishimoto Y, Yoneda Y.** 1994 Loss of RCC1 leads to suppression of nuclear protein import in living cells. *J Biol Chem* 269:24542-24545
44. **Carazo-Salas RE, Guarguaglini G, Gruss OJ, Segref A, Karsenti E, Mattaj IW.** 1999 Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* 400:178-181
45. **Wolf G, Zahner G, Mondorf U, Schoeppe W, Stahl RAK.** 1993 Angiotensin II stimulates cellular hypertrophy of LLC-PK1 cells through the AT1 receptor. *Nephrol Dial Transplant* 8: 128-133
46. **Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW.** 1994 Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148
47. **Wolf G.** 1995 Cellular mechanisms of tubular hypertrophy and hyperplasia in renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 21:303-316
48. **Toback FG.** 1992 Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney Int* 41:226-246
49. **Bacallao R, Fine LG.** 1989 Molecular events in the organization of renal tubular epithelium: From nephrogenesis to regeneration. *Am J Physiol* 257:F913-F924
50. **Fine LG.** 1986 The biology of renal hypertrophy. *Kidney Int* 29:619-634
51. **Wolf G.** 1993 Regulation of factors of renal tubular hypertrophy. *Clin Invest* 71:867-870

52. **Ong ACM, Fine LG.** 1994 Loss of glomerular function and tubulointerstitial fibrosis: Cause or effect? *Kidney Int* 45:345-351
53. **Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, pritzl P, Floege J, Schwartz SM.** 1992 Renal injury angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 19:464-474
54. **Li X, Lee JW, Graves LM, Earp HS.** 1998. Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway. *EMBO J* 17:574-2583
55. **Sadoshima J, Izumo S.** 1993 Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca²⁺-dependent signaling. *Circ Res* 73:413-423
56. **Anderson KM, Murahashi I, Dostal DE, Peach MJ.** 1993 Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 264:C179-C188
57. **Brock TA, Rittenhouse SE, Powers CW, Ekstein LS, Gimbrone MA, Alexander RW.** 1995 Phobol ester and 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol inhibit angiotensin activation of phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 260:14158-14166
58. **Tang H, Shirai H, Inagami T.** 1995 Inhibition of protein kinase C prevents rapid desensitization of type 1B angiotensin II receptor. *Circ Res* 77:239-248
59. **Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K.** 1994 PKC ϵ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 269:6140-6148
60. **Stabel S, Parker PJ.** 1991 Protein kinase C. *Pharmacol Ther* 51:71-95
61. **Nishizuka Y.** 1988 The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334:661-665

62. **Ruf S, Piper HM, Schluter KD.** 2001 Specific role for the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II- but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Pflugers Arch* 443:483-90
63. **Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M.** 2000 Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 20:2175-2183
64. **Haddad JJ.** 2002 Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal* 28:1362-1369
65. **Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Dominiczak AF.** 2000 An investigation into the sources of superoxide production in human blood vessels: Ang II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *101:2206-2212*
66. **Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL.** 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* 90:1205-1213
67. **Griendling KK, Ushio-Fukai M.** 1997 NADH/NADPH oxidase and vascular function. *Trends Cardiovasc Med* 7:307-310
68. **Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M.** NADPH oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501
69. **Touyz RM, Schiffrin EL.** 2001 Increased generation of superoxide by angiotensin II is mediated via PLD-dependent, NADPH oxidase-sensitive pathways in vascular smooth muscle cells from hypertension patients. *J Hypertens* 19:1245-1254

Figure legends

Figure 1. shows the amino acid sequence comparison between human, mouse and rat GLP proteins. Different amino acid residues are indicated.

Figure 2. Ang II stimulates GLP mRNA expression in a time-dependent manner in IRPTCs. GLP mRNA was determined by specific RT-PCR. The GLP mRNA expression was normalized with β -actin mRNA expression. Cells were stimulated with 10^{-7} M ang II for different time periods. **A**, time course of Ang II on the regulation of GLP mRNA expression in IRPTCs. **B**, GLP mRNA expression was quantified by laser densitometry from 4 experiments. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

Figure 3. Ang II stimulates GLP mRNA expression in a dose-dependent manner in IRPTCs. Cells were stimulated with different concentrations of Ang II for 16 hours. **A**, effect of different concentrations of Ang II on the regulation of GLP mRNA expression in IRPTCs. **B**, GLP mRNA expression was quantified by laser densitometry from 5 experiments. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

Figure 4. Ang II stimulates GLP mRNA expression via AT1, but not AT2 receptor in IRPTCs. **A**, Cells were stimulated with 10^{-7} M Ang II with subtype specific receptor antagonists, losartan (10^{-6} M) and PD123319 (10^{-7} M) for 16 hours. **B**, GLP mRNA expression was quantified by laser densitometry from 6 experiments (** $p < 0.01$).

Figure 5. Transactivation of the EGF receptor signaling pathway is involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. **A**, AG1478 (10^{-4} M), an inhibitor of EGF receptor, and PD98059 (10^{-5} M), an inhibitor of MEK, were added into the medium 30 minutes before cells were stimulated by 10^{-7} M Ang II for 16 hours. GLP mRNA expression was determined by semi-quantitative RT-PCR

and its expression was normalized by β -actin mRNA expression as an internal control. **B**, GLP mRNA expression was quantified by laser densitometry from 4 experiments (** $p < 0.01$).

Figure 6. Activation of PKC and ROS generation are partially involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. **A**, GF109203X (10⁻⁶ M), an inhibitor of PKC, DPI (10⁻⁶ M), an inhibitor of NADH/NADPH oxidase, tiron (10⁻⁴ M) and taurine (5 x 10⁻³ M), antioxidants, were added into the medium 30 minutes before cells were stimulated by 10⁻⁷ M Ang II for 16 hours. GLP mRNA expression was determined by semi-quantitative RT-PCR and its expression was normalized by β -actin mRNA expression as an internal control. **B**, GLP mRNA expression was quantified by laser densitometry from 4 experiments (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

Figure 7. p38 MAP and JAK2 kinase pathways are not involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. **A**, SB203580 (10⁻⁶M) and PD169316 (10⁻⁶ M), inhibitors of p38 MAP kinase and AG490 (10⁻⁶M), an inhibitor of JAK2 kinase, were added into the medium 30 minutes before cells were stimulated by 10⁻⁷ M Ang II for 16 hours. GLP mRNA expression was determined by semi-quantitative RT-PCR and its expression was normalized by β -actin mRNA expression as an internal control. **B**, GLP mRNA expression was quantified by laser densitometry from 4 experiments (** $p < 0.01$).

Figure 8. ROS generation signalling pathway is involved in GLP-induced IRPTC hypertrophy. **A**, ROS generation was measured by the lucigenin assay in IRPTCs stably expressing GLP gene as well as control cells, with or without 10⁻⁷ M Ang II stimulation as described in materials and methods. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, 4 experiments).

Figure 9. Activation of ERK1/2 MAPK signaling pathway is not involved in GLP-induced IRPTC hypertrophy. A representative Western blot of phosphorylated ERK1/2 MAPK. All blots were independently repeated three times, and quantification was done by laser densitometry.

Figure 10. Inhibition of ROS generation blocks GLP-induced IRPTC hypertrophy. Semi-confluent IRPTCs stably expressing GLP gene in the sense orientation were serum-starved for 24 hours, then incubated with 10^{-6} M DPI, tiron (10^{-4} M) or taurine (5×10^{-3} M) for 24 hours for [3 H] leucine incorporation, or 48 hours for total protein content experiments, respectively. [3 H] leucine was added at the same time as when the inhibitors were added into the medium (**A**), $n=5$; $*p < 0.05$. Total protein content experiment is shown in **B** ($n=4$, $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$).

Figure 11. Model of signaling pathways involved in Ang II-stimulated GLP mRNA expression and GLP-induced cellular hypertrophy in IRPTCs. EGF receptor transactivation, subsequent activation of ERK1/2 MAPK, activation of PKC and ROS generation are involved in Ang II-induced GLP mRNA expression in IRPTCs. The NADH/NADPH oxidase pathway is at least in part involved in GLP-induced cellular hypertrophy in IRPTCs. There is a feedback mechanism between GLP mRNA expression and GLP-induced cellular hypertrophy.

Human:	MVDVGKWP	IF	TLLSPQEI	AS	IRKACVFG	T	ASEALYV	TDN	DEVFVGL	NY	SNCLGTG	DNQ	60
Mouse:	-----	-----	-----AG-	-----	-----	-----	-N--I-	-----	-----	-----	-----	-----	
Rat:	-----	-----	-----TG-	-----	-----I-	-----	-----I---	-----S	-----	-----	-----	-----	
	STLVPK	LEG	LCGKKIK	SLS	YGSGPH	VLLS	TEDGVV	YAWG	HNGYSQ	LNG	TTNQGI	APVQ	120
	-----	-----	-----A	-----	-----	-----T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	-----	-----	-----A	-----R	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----I-	
	VCTNLL	IKQV	VEVACG	SHHS	MALAAD	GEVF	AWGYNN	CGQV	GSGSTAN	QPT	PRKVTN	CLHI	180
	-----	-----	-----I	-----	-----	-----L-	-----	-----	-----	-----	-----	-----T	
	-----	-----	-----V	-----	-----	-----L-	-----	-----	-----	-----	-----	-----T	
	KRVVGI	ACGQ	TSSMAV	LDNG	EVYGW	YNGN	GQLGLG	NNGN	QLTPVR	VAAAL	HSVCVN	QIVC	240
	-----	-----	-----N	-----	-----S-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GM-	
	-----	-----	-----K-N	-----	-----S-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-	
	GYAHTL	LALTD	EGLLYA	WGAN	TYGQL	GTGNK	NNLLSP	AHIM	VEKERV	VEIA	ACHSAH	TSAA	300
	-----	-----	-----	-----	-----	-----S-	-----	-----TQ--	-----	-----I--	-----	-----T-	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----S-	-----	-----TQ--	-----	-----I--	-----	-----T-	
	KTQGGH	VYMW	GQCRGQ	SVIL	PHLTHF	SCTD	DVFACF	FATPA	VSWRLS	SVEH	EDFLT	VAESL	360
	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-	-----	-----G-	-----	-----	-----	-----	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----VS	-----	-----	
	KKEFDS	PETA	DLKFR	IDGKY	IHVHK	AVLKI	RCEHFR	SMFQ	SYWNED	MKEV	IEIDQF	SYPV	420
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	YRAFLO	YLYT	DTVDL	PPEDA	IGLLD	LATS	CENRLK	KLCQ	HIIKRG	ITVE	NAFSLF	SAAV	480
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----R-	-----	-----	-----	-----	-----	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----R-	-----	-----	-----	-----	-----	
	RYDAED	LEEF	CFKFC	INHLT	EVTQT	AAFWQ	MDGPLL	KEFI	AKASKC	GAFK	N		
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Figure 1

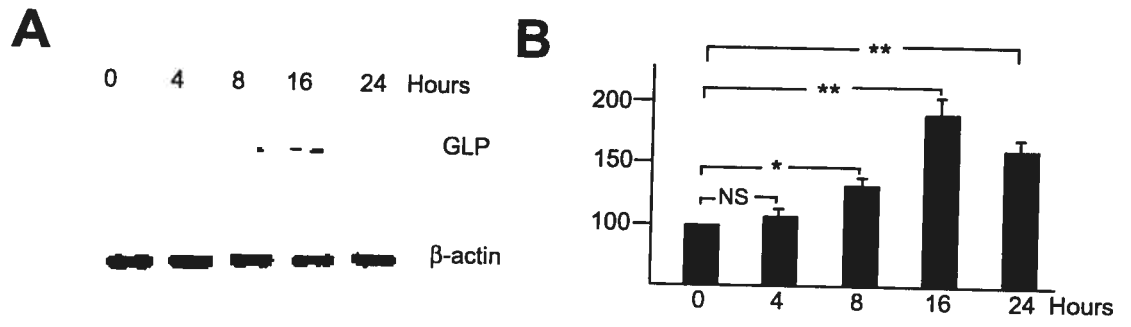


Figure 2

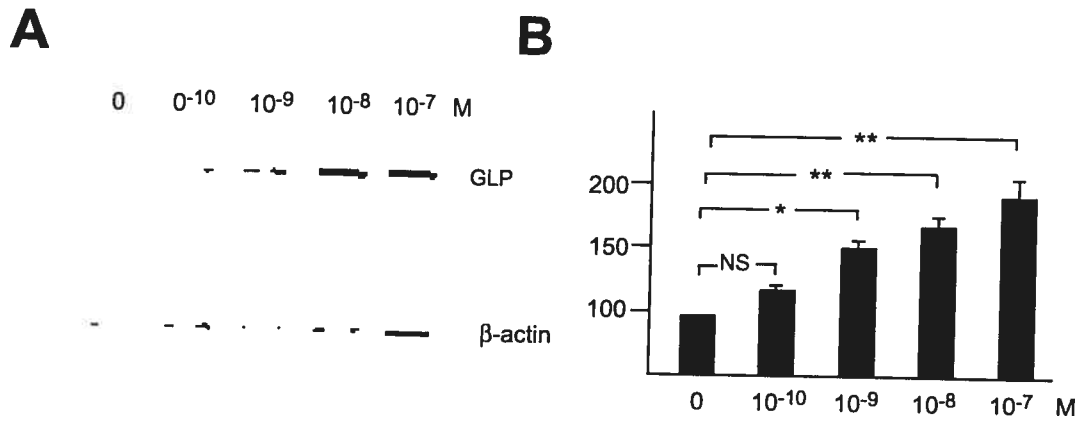


Figure 3

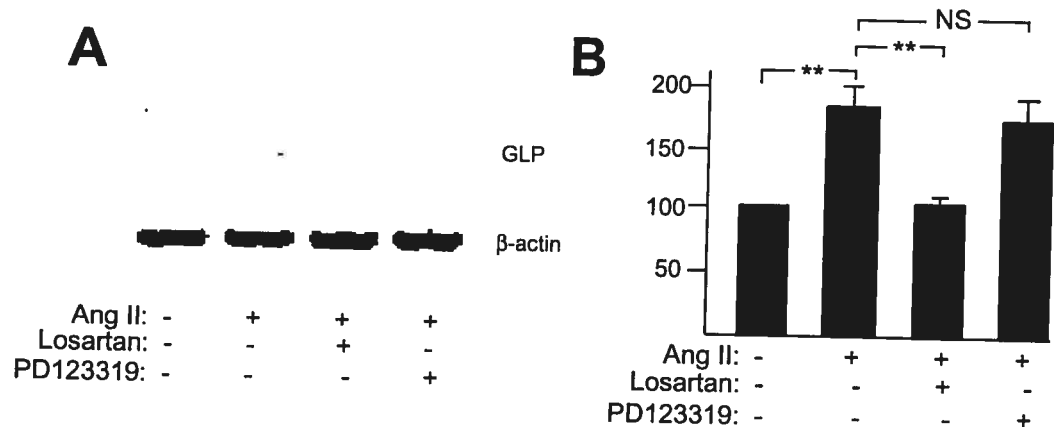


Figure 4

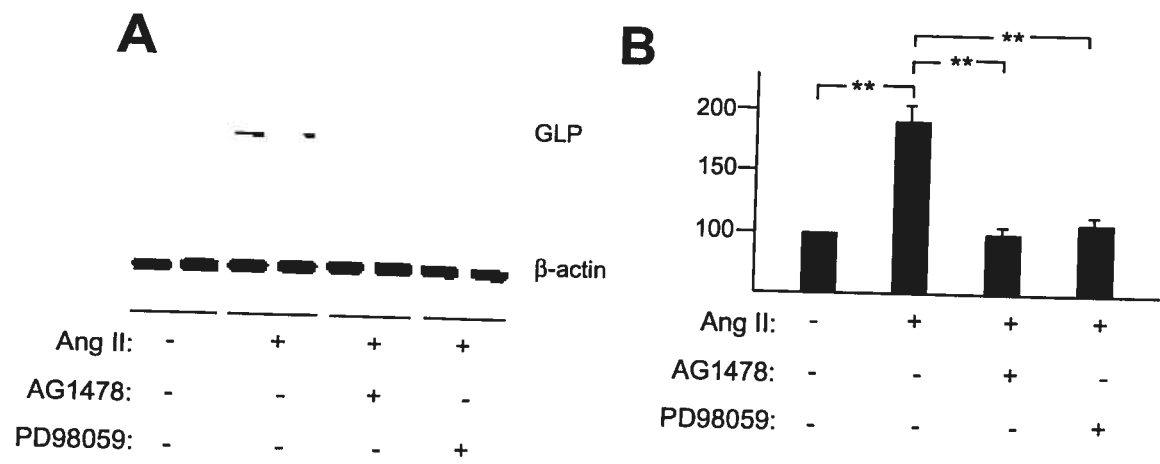


Figure 5

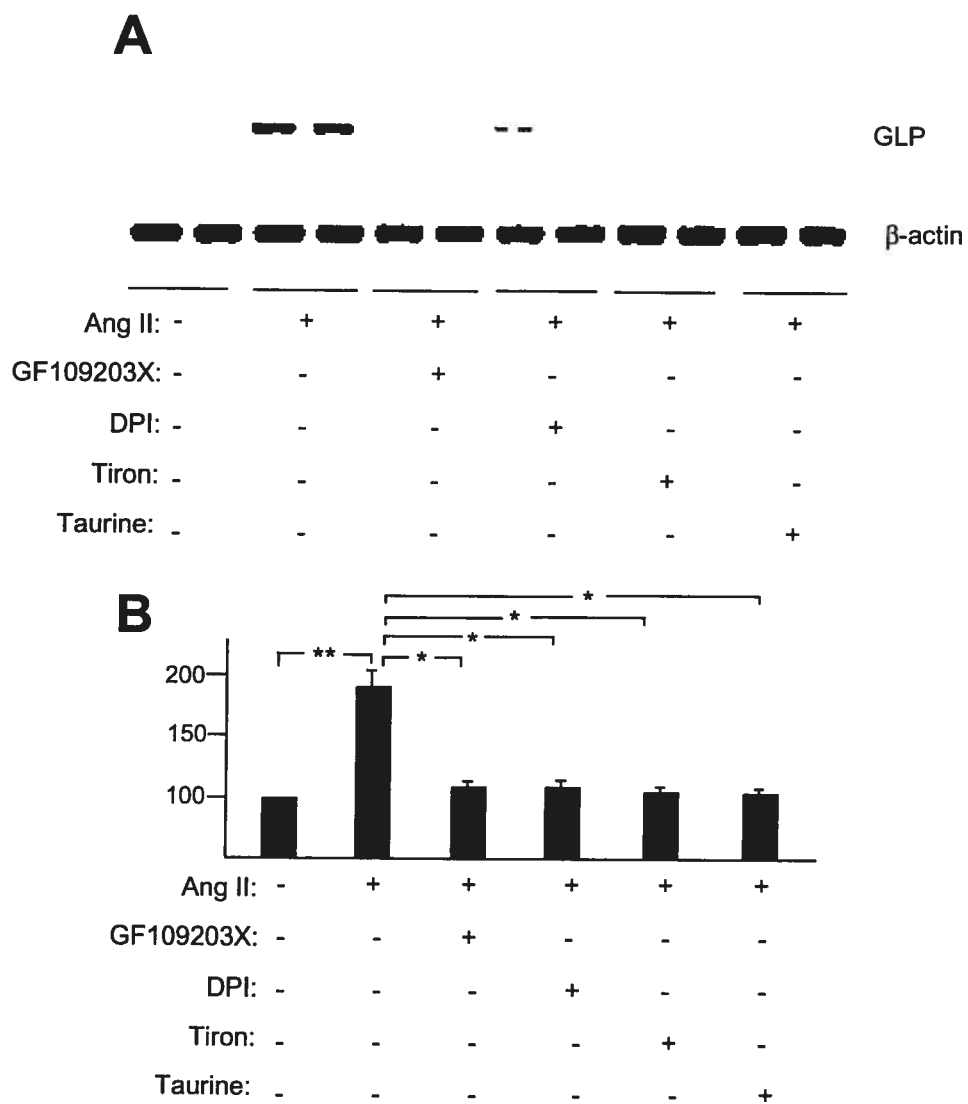


Figure 6

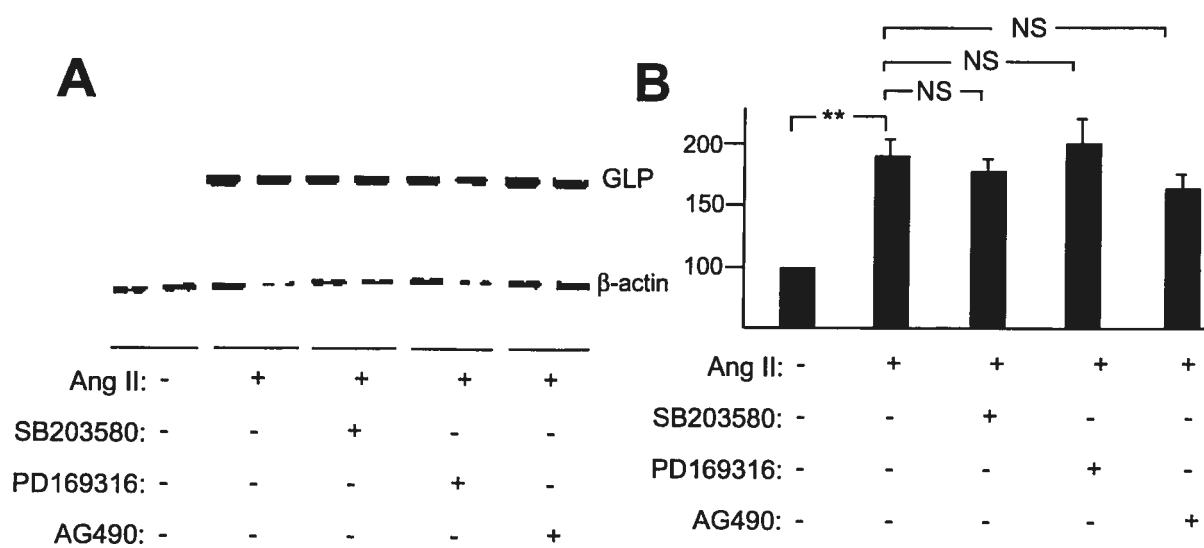


Figure 7

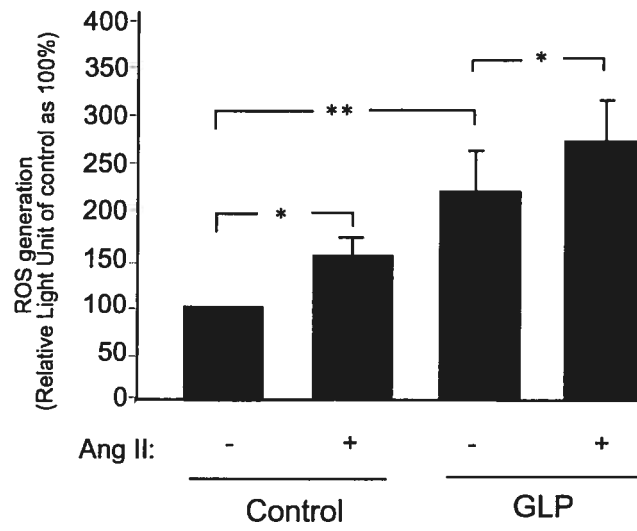


Figure 8

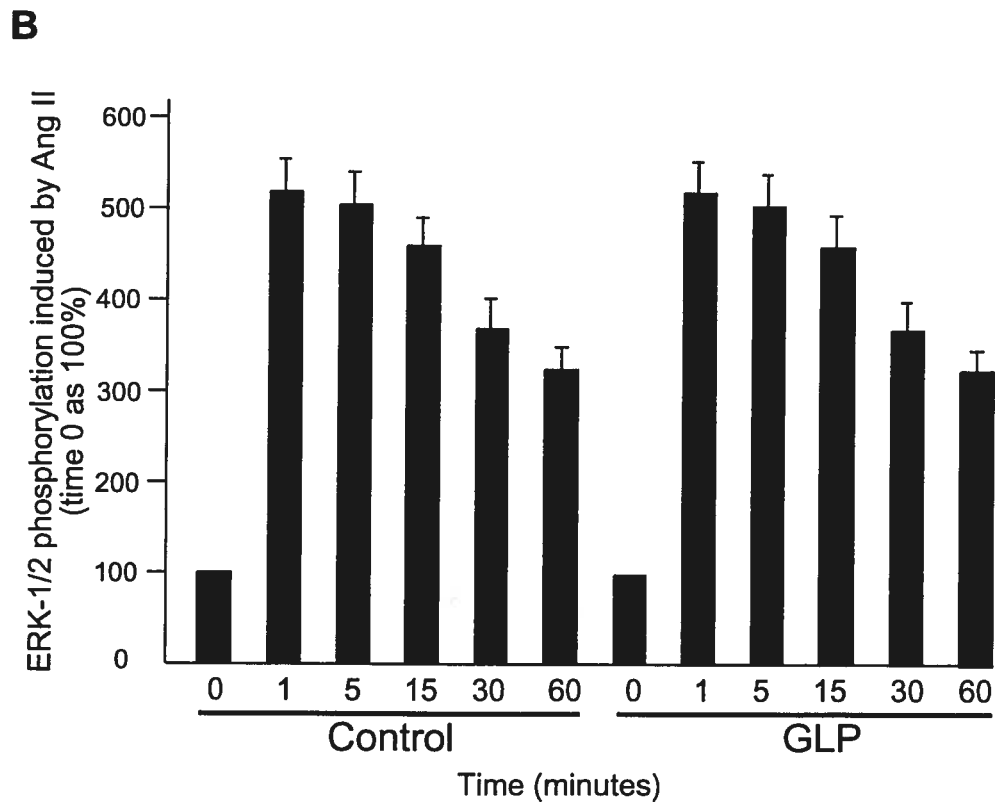
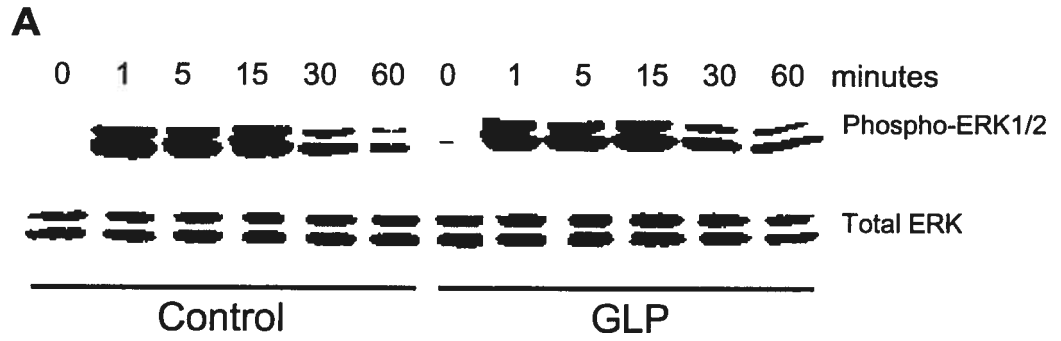


Figure 9

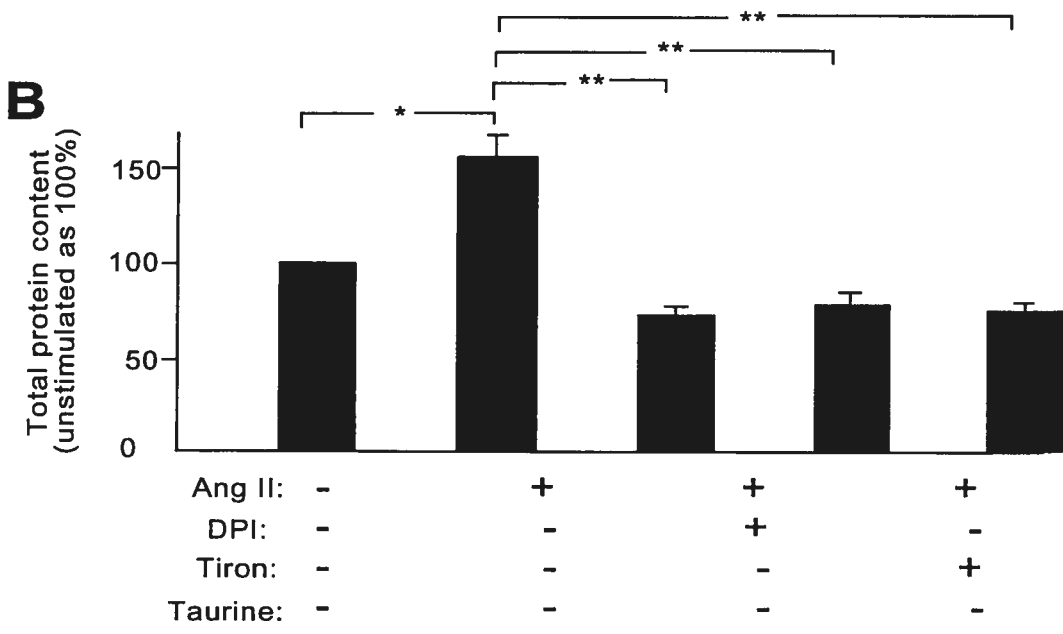
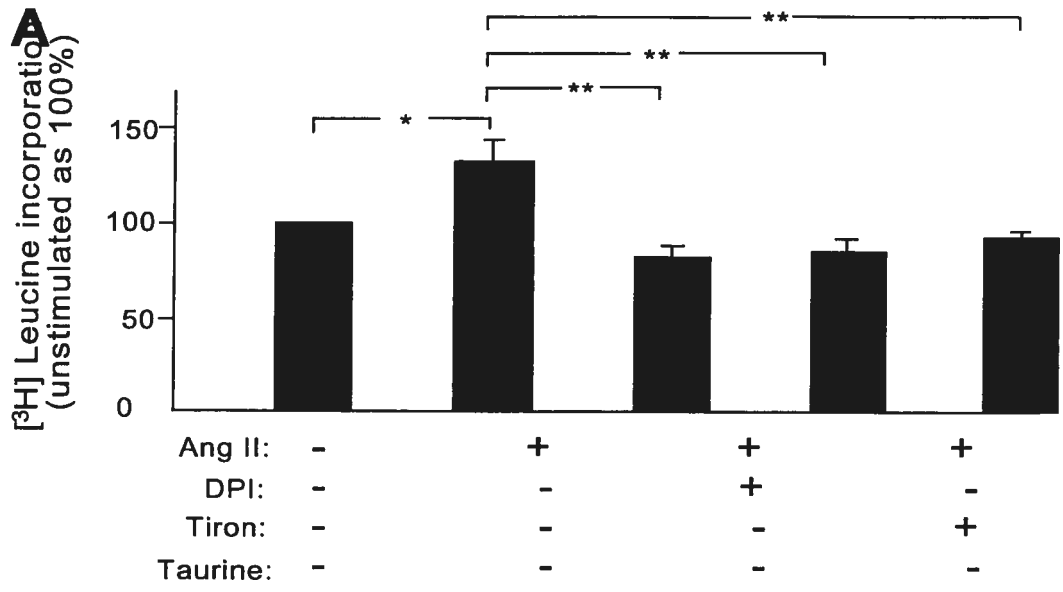


Figure 10

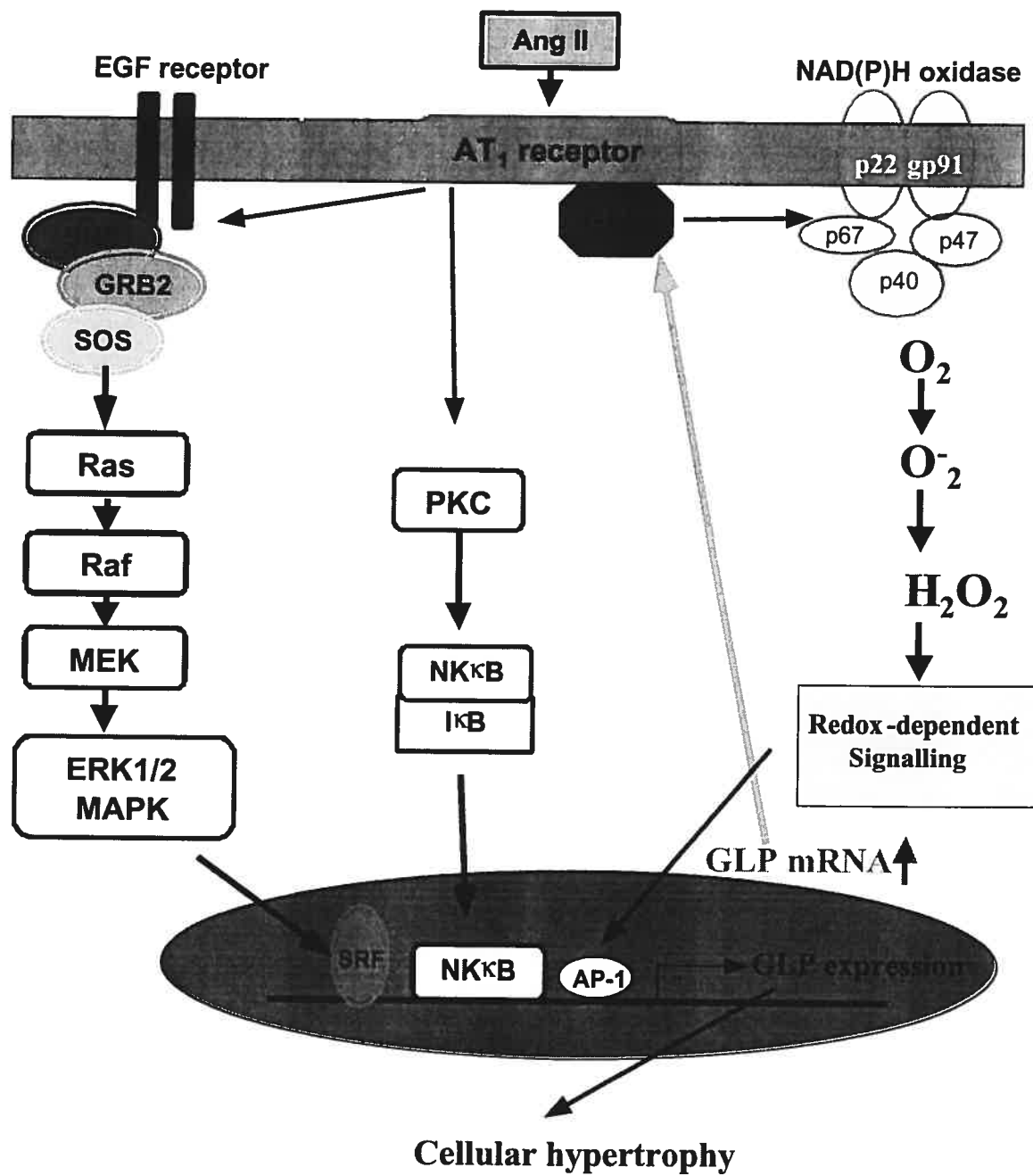


Figure 11

Chapitre 5
Discussion

Discussion

Nous avons identifié GLP, une nouvelle protéine associée au récepteur AT1, par la méthode des deux hybrides chez la levure. Cette protéine interagit avec la région carboxyl-terminale du récepteur AT1A. La séquence du gène permet de déterminer la séquence d'acides aminés correspondante. Cette séquence contient un motif de sept séquences répétées en tandem (figure 1B; article 1) similaire à celui observé chez la protéine RCC1. RCC1 est reconnue comme étant une GEF, un facteur d'échange GDP/GTP (GDP/GTP exchange factor), pour la petite protéine G Ran (13;123;124). Nous croyons que cette nouvelle protéine est une protéine «GEF-like», d'où son nom GLP. En comparant les protéines RCC1 et GLP, nous observons une différence. GLP possède une extrémité carboxyl-terminale supplémentaire (acides aminés de 368-531) en plus du motif de sept séquences répétées en tandem (figure 1C ; article 1). Puis, nous avons trouvé que ces résidus d'acide aminé, de 371-531, sont importants pour l'interaction de la protéine avec le domaine carboxyl-terminal du récepteur AT1 dans le système des deux hybrides chez la levure. Cette information permet d'expliquer la présence de cette extrémité carboxyl-terminal supplémentaire chez la protéine GLP (Figure 1 article 1). Le gène GLP est assez bien conservé entre les espèces (humains, rat et souris) (figure 1; article 2).

Nous avons ensuite déterminé la distribution tissulaire et cellulaire du gène GLP. Par l'analyse d'hybridation Northern, il a été démontré que l'ARNm de GLP est retrouvé dans tous les tissus testés, soit le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, le foie, les muscles squelettiques, les reins et le pancréas (figure 2A; article 1). Cependant, il est surtout présent dans le cœur, les poumons, les reins et le pancréas. L'ARNm de GLP est également détecté dans les VSMCs, les IRPTCs et dans les cellules embryonnaires de rein (HEK-293). Bref, nous avons retrouvé de l'ARNm de GLP dans des cellules vasculaires et des cellules rénales. Nous avons aussi regardé si la protéine GLP était exprimée dans ces cellules, et effectivement, une bande d'environ 58 kDa est retrouvée par l'analyse d'un immunobuvardage avec un anticorps polyclonal spécifique pour GLP. Le poids de la bande semble similaire à celui estimé selon la séquence d'acides aminés.

La localisation cellulaire du gène GLP fut déterminée grâce à une lignée cellulaire stable de HEK-293 exprimant GLP couplé à la protéine verte fluorescente (green fluorescent protein

(GFP)). Ce couplage permet de visualiser rapidement la présence de la protéine GLP en microscopie de fluorescence. La protéine GFP-GLP a été trouvée dans de petites vacuoles dans le cytoplasme et aussi sur la membrane plasmique, mais non pas dans le noyau (figure 3A; article 1). La localisation de la protéine GLP laisse supposer sa présence auprès du récepteur AT1 ou leur co-localisation, autant à la membrane plasmique que dans les vacuoles puisque le récepteur AT1 est aussi retrouvé dans des endosomes lors de l'internalisation du complexe ang II-récepteur AT1 (34;43;107). Il existe aussi une autre explication de la présence de la protéine GFP-GLP dans des vacuoles. En effet, lorsque la protéine GFP-GLP est surexprimé dans des cellules HEK-293 où il y absence du récepteur AT1, elle se retrouve en abondance et sans partenaire, il est donc possible d'en avoir une accumulation dans des vacuoles.

Afin de découvrir le(s) rôle(s) biologique(s) de GLP, nous avons produit différentes lignées cellulaires stables surexprimant GLP. Les VSMCs étant difficiles à transfecter nous le savons infectées à l'aide d'un vecteur rétroviral, pLNCX, contenant le gène GLP. Les IRPTCs et les HEK-293 ont plutôt été transfectées avec le vecteur pcDNA3 contenant MYC-GLP. Après avoir remarquer au microscope que les cellules infectées ou transfectées avec GLP semblaient, à la vue du moins, être plus grosses (figure 3C; article 1), nous avons testé et démontré que la surexpression du gène GLP induit effectivement de l'hypertrophie cellulaire.

L'hypertrophie cellulaire est définie comme étant une augmentation de la taille cellulaire (116), et du contenu en ARN et en protéines, mais sans la réplication de l'ADN (36;93;125). Cette réponse hypertrophique est caractérisée par une augmentation de l'incorporation de [³H]-leucine dans les protéines précipitées (73) et d'une inhibition de la réplication de l'ADN, ou de prolifération, tel que mesuré par l'incorporation de [³H]-thymidine (72). Ces paramètres ont été mesurés dans deux lignées cellulaires différentes, soit les VSMCs et les IRPTCs. Les VSMCs et les IRPTCs surexprimant le gène GLP démontrent bien une augmentation de la taille cellulaire relative comparativement aux cellules contrôles. Les VSMCs (figure 4C; article 1) montrent toutefois une augmentation beaucoup plus importante de la taille que les IRPTCs (figure 8C; article 1). Wolf et *al* ont pourtant montré que dans des cellules murines du tubule proximal, l'hypertrophie cellulaire est à son point maximal avec une augmentation de seulement 15-20% par FACS ou

cytométrie de flux (120). Le pourcentage d'augmentation de la taille ou d'hypertrophie des IRPTCs surexprimant GLP est de 17% et concorde bien avec les valeurs obtenues par Wolf et *al* (120). L'écart des valeurs obtenues pour les VSMCs et les IRPTCs est probablement dû à leur fonctions physiologiques différentes ou encore à un effet secondaire de l'infection par le rétrovirus lors de la transfection des VSMCs. Cette possibilité ne peut être éliminée puisque qu'un seul clone a été obtenu pour les VSMCs.

Nous avons utilisé une autre méthode reconnue comme marqueur d'hypertrophie cellulaire et de synthèse protéique, il s'agit de l'incorporation de [³H]-leucine (73). L'incorporation de [³H]-thymidine est au contraire un marqueur de prolifération cellulaire et de réplication d'ADN (72). Autant dans le cas des VSMCs que celui des IRPTCs, il y a une augmentation significative de l'incorporation de [³H]-leucine (figures 4B, 8B ; article 1) et une diminution non significative de l'incorporation de [³H]-thymidine (figures 4A, 8A; article 1). Ces données montrent une hypertrophie cellulaire dans les deux types cellulaires surexprimants GLP, comparativement aux cellules contrôles.

Une troisième approche, le contenu en protéines totales, détermine aussi une hypertrophie cellulaire car on observe une augmentation significative dans les deux lignées cellulaires, les VSMCs et les IRPTCs (figures 4D, 8D; article 1).

Les résultats obtenus indiquent bien que les cellules, VSMCs et IRPTCs, surexprimants le gène GLP sont hypertrophiques comparativement aux cellules contrôles car elles répondent bien à la définition d'hypertrophie cellulaire. Effectivement, elles ont une taille relative supérieure aux contrôles, elles ont une synthèse protéique accrue et une réduction de leur synthèse d'ADN et, enfin, elles ont un contenu en protéines totales augmenté comparativement aux cellules contrôles.

Les cellules hypertrophiques ont aussi la caractéristiques d'être arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire afin d'augmenter leur taille et leur synthèse protéique (36;93;125). Le cycle cellulaire joue donc un rôle important dans l'hypertrophie cellulaire. En fait, les cellules entrent dans le cycle cellulaire et progressent d'une phase à l'autre. Cette progression dépend, comme il a été présenté à la section 1.6, de l'expression régulatrice et de l'activation de protéines spécifiques nommées les kinases cycline-dépendantes (CdKs) et de

leurs sous-unités régulatrices, les cyclines. Les CdKs sont activés à travers la phosphorylation et déphosphorylation de sites spécifiques (10;36;62;113), alors que d'autres protéines inhibent les complexes cycline-CdKs (CKIs). Ces inhibiteurs contrôlent l'activation des complexes cyclines-CdKs (9;113). Les CKIs sont responsables de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et, de ce fait, de l'inhibition de la prolifération. L'inhibiteur p27^{Kip1}, en particulier, serait la clé du processus de la progression du cycle cellulaire (49;126). Un haut niveau de p27^{Kip1} arrête le cycle cellulaire menant alors à l'hypertrophie cellulaire (113). Les niveaux cellulaires de p27^{Kip1} seraient donc un indicateur d'hypertrophie cellulaire pour les VSMCs et les IRPTCs. Les taux de p27^{Kip1} furent alors mesurés pour les deux types cellulaires. Les résultats observés montrent une différence flagrante entre les cellules aortiques et les cellules rénales. Les VSMCs surexprimant le gène GLP indiquent une diminution de la protéine p27^{Kip1} (figures 5C, 5D; article 1), montrant que l'hypertrophie est indépendante de la protéine p27^{Kip1} ou bien que le cycle cellulaire ne serait pas impliqué dans l'hypertrophie observée. Par contre, les IRPTCs surexprimant le gène GLP montrent une augmentation de la protéine p27^{Kip1} (figures 9C, 9D; article 1), indiquant que la protéine p27^{Kip1} et le cycle cellulaire seraient impliqués dans l'hypertrophie observée. De plus, il est reconnu que la sérine/thréonine kinase AKT/PKB apparaît jouer un rôle dans l'hypertrophie cellulaire et la synthèse protéique (6). L'activation d'AKT/PKB peut être dépendante de la PI3-kinase et provoquer plusieurs réponses cellulaires dont l'hypertrophie cellulaire (117). Toutefois, AKT/PKB peut aussi dépendre de la voie des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les niveaux d'AKT/PKB furent donc aussi testés pour les VSMCs et les IRPTCs. Dans ce cas, contrairement à l'expression de la protéine p27^{Kip1}, seules les VSMCs surexprimant le gène GLP présentent une augmentation significative de la phosphorylation d'AKT/PKB comparativement aux cellules contrôles (figures 5A, 5B; article 1). Puis, des inhibiteurs ont été testés sur les VSMCs surexprimant le gène GLP afin de découvrir si cette hypertrophie emprunte la voie de la PI3-K ou bien celle des ROS. Le DPI, un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase et donc des ROS et le LY294002, un inhibiteur de la PI3-K, ont indiqué qu'autant la taille relative (figure 6C; article 1) que la phosphorylation d'AKT/PKB (figures 6A, 6B; article 1) sont réduites dans les VSMCs surexprimant le gène GLP comparativement aux contrôles et cela pour les deux inhibiteurs. Ces données prouvent que les VSMCs surexprimant le gène GLP empruntent la voie AKT/PKB dépendante, non seulement de la PI3-K, mais aussi des ROS.

Donc, dans les VSMCs et les IRPTCs, GLP emprunte des voies différentes et utilisent des mécanismes distincts pour induire l'hypertrophie.

Afin de démontrer l'importance et la nécessité de l'expression du gène GLP dans l'hypertrophie observée dans les IRPTCs et l'effet de l'ang II sur ces cellules, différentes lignées cellulaires d'IRPTCs ont été établies (figures 7A, 7B; article 1). Deux lignées cellulaires stables supplémentaires, l'une surexprimant GLP en orientation antisens (GLP-AS) afin de contrecarrer l'ARNm endogène et l'autre surexprimant un mutant tronqué du gène GLP (GLP-M1) montrant que cette région est importante pour l'induction d'hypertrophie, ont été étudiées. Ces lignées ont montré autant par la mesure de la taille cellulaire relative (figure 8C; article 1), l'incorporation de [³H]-leucine (figure 8B; article 1) et [³H]-thymidine (figure 8C; article 1), que par le contenu en protéines totales (figure 8D; article 1) que le gène GLP joue un rôle important dans l'hypertrophie observée dans les IRPTCs surexprimant le gène GLP. En effet, une diminution marquée de tous ces paramètres est observée. L'expression de la protéine p27^{Kip1} montre une diminution dans les lignées GLP-AS et GLP-M1, comparativement aux IRPTCs surexprimant le gène GLP (figures 9C, 9D; article 1). La phosphorylation d'AKT/PKB demeure, quant à elle, inchangée dans toutes les lignées cellulaires d'IRPTCs étudiées (figures 9A, 9B; article 1).

Il est maintenant connu que l'ang II est un facteur de croissance stimulant l'hypertrophie de plusieurs tissus et cellules, dont les cellules du tubule proximal (127;128). Les différentes lignées d'IRPTCs peuvent permettre de découvrir les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertrophie induite par l'ang II. Dans les IRPTCs contenant seulement le gène GLP endogène, l'ang II induit une hypertrophie cellulaire mesurable par la taille cellulaire relative (figure 10B; article 1), l'incorporation de [³H]-leucine (figure 10A; article 1), et par le contenu en protéines totales (figure 10C; article 1). Le gène GLP semble toutefois jouer un rôle important dans l'hypertrophie observée dans les IRPTCs exposées à l'ang II. Effectivement, autant les cellules GLP-AS que les cellules GLP-M1 ne montrent pas d'augmentation comparativement aux cellules non-stimulées. Ces données montrent que l'hypertrophie induite par l'ang II semble requérir la protéine GLP.

Il a déjà été montré que l'expression de p27^{Kip1}, dans des cellules du tubule proximal de souris, semble être un prérequis nécessaire, mais que toutefois, l'hypertrophie survient

seulement après des traitements à l'ang II. Cette observation peut suggérer que d'autres facteurs comme TGF- β («transforming growth factor- β ») sont induits par l'ang II et s'avèrent nécessaires au développement de l'hypertrophie (23). Dans les cellules du tubule proximal de lapin, un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, donc l'induction d'hypertrophie, est associé avec le TGF- β (23). Il pourrait, dans ce cas, être intéressant d'examiner la régulation de l'expression de l'ARNm de GLP par TGF- β .

Ensuite, nous avons montré que l'ang II stimule l'expression de l'ARNm de GLP d'une manière dépendante du temps (figures 11A, 11B; article 1 et 2A, 2B; article 2) et de la dose (figures 11C, 11D; article 1 et 3A, 3B; article 2). En fait, une réponse maximale est remarquée à 16 heures. Puis, on a examiné lequel des récepteurs de l'angiotensine est employé par l'ang II dans l'induction de l'hypertrophie cellulaire nécessitant la présence de la protéine GLP. Grâce à des antagonistes des récepteurs AT1 (Losartan) et AT2 (PD123319), nous avons constaté que l'ang II agit par le récepteur AT1 pour induire l'hypertrophie cellulaire des IRPTCs (figures 11E, 11F; article 1 et 4A, 4B; article 2). La stimulation du récepteur AT1 mène à la croissance cellulaire et l'hypertrophie, l'angiogénèse, la vasoconstriction, la fibrose interstitielle et le remodelage cardiaque alors que la stimulation du récepteur AT2 cause des effets inverses (105). Ces données démontrent que l'expression du gène GLP semble être importante dans l'hypertrophie cellulaire induite par l'ang II dans les IRPTCs.

L'ang II seul est un agent hypertrophique induisant de l'hypertrophie des cellules dans les tubules proximaux (127;128) et de manière dépendante de la dose (127). Il serait donc possible que l'ang II stimule l'expression du gène de GLP dans les cellules rénales, puis que GLP induise de l'hypertrophie cellulaire dans les tubules. Un mécanisme de rétro-activation pourrait exister entre l'ang II et GLP, menant à une hypertrophie des cellules du tubule proximal. Un bon exemple de mécanisme compensatoire est l'hypertrophie tubulaire. Des dommages chroniques résultent souvent d'un processus d'adaptation hémodynamique et structural associé à la réduction dans le nombre des néphrons. L'adaptation des néphrons restants, dans lesquels l'hypertrophie joue un rôle crucial, cause ultimement une détérioration irréversible de la fonction rénale, qui est morphologiquement caractérisée par des changements fixes de glomérulosclérose et de fibrose tubulointerstitielle. La croissance

adaptatrice rénale joue donc un rôle majeur dans la progression des maladies rénales. Les dommages aux néphrons résultent souvent dans l'hypertrophie compensatrice du reste de la structure du rein. Tous les constituants structuraux du néphron sont impliqués dans l'hypertrophie, mais les cellules du tubule proximal comptent pour le composant principal. Les mécanismes induisant l'hypertrophie cellulaire du tubule proximal ne sont pas complètement compris, et fondamentalement différents, par définition, de l'hyperplasie cellulaire, qui advient après une nécrose tubulaire intense (56;85;92;129-131). L'hypertrophie initiale est adaptative, mais par la suite, elle devient maladaptative (56;75;85;132). Il est d'ailleurs bien connu que, sans égard de la première cause de défaillance rénale, la maladie rénale chronique mène souvent à la fibrose rénale et au stade terminal de la maladie rénale (116). Dans des cultures primaires de cellules du tubule proximal humain, Chatterjee *et al* rapportent que le losartan inhibe la synthèse protéique et d'ADN induite par l'ang II et ceci est dépendant de l'inhibition de l'adénylate cyclase. Le losartan peut alors être considéré comme un médicament de choix lorsqu'il y a hypertension avec une fonction rénale compromise (132).

Des études plus poussées ont été entreprises afin d'élucider les voies de signalisation empruntées lors de ce nouveau mécanisme de l'ang II menant à l'hypertrophie cellulaire. Étant donné l'importance de l'hypertrophie tubulaire, plusieurs voies de signalisation semblent jouer un rôle. La transactivation de EGFR, l'activation de PKC et la génération des ROS semblent avoir une influence importante dans l'expression de l'ARNm de GLP induit par l'ang II. Il fut aussi observé que la génération des ROS joue un rôle crucial dans l'hypertrophie des IRPTCs induite par GLP.

Il existe plusieurs voies de signalisation liées au récepteur AT1. L'une d'elles est la voie des MAPKs, déjà présentée en détail à la section 1.5.3. Cette famille d'enzymes joue un rôle important dans la croissance anormale (101) comme l'hypertrophie cellulaire. Les MAPKs transduisent les signaux de la membrane cellulaire au noyau en réponse aux facteurs de croissance (89). ERK1/2, une MAPK, est activée par la cascade Ras, qui active Raf qui, à son tour active MEK et ensuite ERK1/2 (45;89). Il est d'ailleurs reconnu que l'ang II active ERK1/2 (40). Il a aussi été montré que l'ang II stimule la phosphorylation de ERK1/2 via la transactivation de EGFR par le récepteur AT1 (106). L'ang II transactive EGFR, démontrant que ce dernier est une cible en aval des récepteurs AT1 (45). Des études *in vitro*

montrent que la transactivation de EGFR par le récepteur AT1 est considérable pour plusieurs effets de l'ang II (45;94). Dans le cas présent, il a été montré que des inhibiteurs de la MAPK, ERK1/2 (PD98059), et de EGFR (AG1478) diminuent l'expression de l'ARNm de GLP suite à une stimulation de l'ang II (figure 5; article 2). Ces résultats indiquent une implication notable de EGFR et, subséquemment de ERK1/2, dans l'expression de l'ARNm de GLP dans les IRPTCs. Quoique Voisin et *al* ont rapporté que l'activation de EGFR est nécessaire à l'augmentation du niveau de la synthèse protéique (13), il ne semble pas que cette cascade soit impliquée dans l'hypertrophie des IRPTCs induite par GLP. En fait, des données obtenues par immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour ERK1/2 ne montrent aucune augmentation de la phosphorylation dans les IRPTCs surexprimant le gène GLP comparativement aux contrôles, indiquant que cette MAPK n'est pas impliquée dans l'hypertrophie observée. Les résultats obtenus concernant la voie de EGFR et de ERK1/2 peuvent suggérer que la transactivation de EGFR par l'ang II peut augmenter la production du gène de GLP, ayant alors un effet indirect sur l'hypertrophie cellulaire des IRPTCs.

Les voies de signalisation des kinases, p38 MAPK et JAK/STAT n'ont montré aucune diminution de l'expression de l'ARNm de GLP lors de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (figure 7; article 2). Les inhibiteurs de p38 MAPK (SB203580 et PD169316) et de JAK/STAT (AG490) indiquent que toutes deux ne sont pas impliquées dans la régulation de l'expression de l'ARNm de GLP dans les IRPTCs, non plus que dans l'hypertrophie induite par GLP dans les IRPTCs.

L'une des autres voies de signalisation analysée est la voie de PKC. La PKC comporte plusieurs isoformes et est activée suite à la stimulation du récepteur AT1 par l'ang II. Le récepteur couplé à la protéine G activé génère du DAG et de l'IP3 par la PLC (93). Le second messenger IP3 produit certains des effets de l'ang II, comme la vasoconstriction (122), tandis que le DAG, un autre second messenger, active la PKC (93). Cette voie est bien reconnue pour agir sur la régulation de l'expression génique et des MAPKs. L'activation de PKC mène alors à une augmentation globale de la synthèse protéique (13;133). Grâce aux données recueillies suite à l'utilisation de l'inhibiteur de PKC (GF109203X) dans les IRPTCs, il a été démontré que l'expression de l'ARNm de GLP est partiellement inhibé (figure 6; article 2), dès lors suggérant que l'activation de PKC peut jouer un rôle important

dans la régulation de l'expression du gène de GLP. Toutefois, des recherches plus avancées pourraient être effectuées afin d'identifier les isoformes de PKC impliqués dans la régulation du gène de GLP. Plusieurs isoformes se retrouvent dans les tubules proximaux, les isoformes hautement exprimés sont PKC α et β , mais il a aussi été retrouvé PKC δ et ϵ dans les tubules proximaux de rats (134). Ces travaux pourraient employer des mutants dominants négatifs des divers isoformes de PKC et démontrer leur importance respective dans l'expression de l'ARNm de GLP induit par l'ang II dans les IRPTCs.

Finalement, la voie de signalisation des ROS fut examinée. Les ROS dérivent de l'oxygène qui, par diverses réductions et réactions, génère de l' O_2^- qui est ensuite converti en H_2O_2 par la SOD. Le H_2O_2 est réduit en eau par la catalase ou par la glutathion peroxydase (21). La section 1.8 présente en détail ces enzymes, appelées antioxydantes, qui protègent l'hôte des dommages occasionnés par les ROS. L'une des sources principales de la génération de ROS est la NAD(P)H oxydase (14;135). Cette enzyme transfère les électrons du NADH ou NADPH à la molécule d' O_2 , générant de l' O_2^- (45). Des études ont montré que l'activation du récepteur AT1 par l'ang II mène à une activation/surrégulation de la NAD(P)H oxydase (21). De ce fait, l'ang II augmente les ROS. Les résultats observés avec l'inhibiteur de la NAD(P)H oxydase, le DPI, suite à une stimulation de l'ang II, indiquent une diminution significative montrant que la régulation de l'expression de l'ARNm de GLP implique la NAD(P)H oxydase (figure 6; article 2). Le tiron, un chélateur de ROS (94), et la taurine, un antioxydant endogène dans le rein (18) amènent aussi une diminution significative de l'ARNm de GLP. Ces résultats sont en accord avec les études préalables rapportant que les antioxydants, les chélateurs de superoxyde et les inhibiteurs de l'oxydation mitochondriale préviennent la formation de ROS dans une variété de lignées cellulaires, par exemple les VSMCs, les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et les cellules du tubule proximal (93). L'expression de l'ARNm de GLP serait donc modulée par les ROS, du moins en partie.

De plus, l'essai lucigénine est une méthode qui permet de mesurer la luminescence de différentes sortes de ROS. Cette méthode est fréquemment utilisée. Des résultats obtenus par des essais lucigénine ont d'ailleurs démontré que les IRPTCs surexprimant le gène GLP possèdent une concentration de base en ROS supérieure aux cellules contrôles. L'ang II augmente les ROS dans les IRPTCS surexprimant le gène GLP, tout autant que dans les cellules contrôles (figure 8; article 2). Ces résultats paraissent indiquer que la surexpression

du gène GLP augmente la concentration de ROS. Des études ont déjà rapporté que l'hypertrophie cellulaire induite par l'ang II est provoquée par les ROS (89). En effet, il apparaît que l'ang II, en stimulant la NAD(P)H oxydase à produire plus de ROS, mène à l'hypertrophie cellulaire. Il semblerait que l'activité de la NAD(P)H oxydase soit requise pour l'induction d'hypertrophie et qu'une inhibition de cette voie enzymatique par le DPI inhibe aussi l'hypertrophie induite par l'ang II (89;105;136). L'utilisation de DPI, tiron et taurine, pour réduire les niveaux dans les IRPTCs surexprimant le gène GLP, empêche l'hypertrophie induite par l'ang II (figure 10; article 2). La voie des ROS semble donc jouer un rôle majeur dans l'hypertrophie induite par GLP dans les IRPTCs.

Le facteur de transcription NF- κ B se trouvant, sous forme inactivée, dans le cytoplasme est transloquer vers le noyau lorsqu'il est activé. NF- κ B est une importante molécule cible dans l'intervention pharmacologique, depuis qu'il est régulé par une grande variété de gènes contrôlant les réponses immunitaire et inflammatoires (137;138), la pathogénèse du sida et cancer (138). Il a été postulé, par plusieurs chercheurs, que les ROS peuvent agir de seconds messagers menant à l'activation du facteur nucléaire NF- κ B (138). D'ailleurs, une accumulation nucléaire de NF- κ B en réponse au peroxy-nitrite a été détectée (137). En fait, certaines sortes de composés avec des propriétés antioxydantes peuvent bloquer l'activation de NF- κ B. Puis, la plupart, sinon tous, les agents activant NF- κ B sont connus pour déclencher la formation de ROS. L'activation de NF- κ B peut être induit par un traitement avec H₂O₂ dans certaines lignées cellulaires. Toutefois, la contribution de la régulation rédox dans l'activation de NF- κ B est un sujet de débats intenses (138). Par contre, plusieurs chercheurs ont rapporté que le H₂O₂ induisant l'activation de NF- κ B est hautement dépendant du type de cellules. En fait, son activation ne semble pas avoir une réponse universelle au stress oxydatif. Dans certains types de cellules, NF- κ B est activé par le traitement avec du H₂O₂, alors que dans un autre type cellulaire, le H₂O₂ ne l'active pas. Les données démontrent clairement que les ROS endogènes produits ne provoquent pas l'activation de NF- κ B comme second messenger (138). Toutefois, les ROS produits à travers Rac/NADPH oxydase ne provoque pas la signalisation de NF- κ B, mais diminue la magnitude de cette activation (138). Auparavant, les ROS était vu comme des messagers généraux à l'activation de NF- κ B. Tandis que certains croient que les ROS ne sont pas des activateurs mais plutôt des inhibiteurs de NF- κ B. En effet, à un certain niveau d'activité,

les ROS peuvent oxyder les sous-unités de NF- κ B et diminuer la liaison de l'ADN et les activités transcriptionnelles de NF- κ B. Les ROS sont des activateurs potentiels pour JNK par l'inactivation oxydative des inhibiteurs endogènes de JNK, tel que la JNK phosphatases. Les ROS peuvent agir comme bloqueur entre NF- κ B et JNK par l'inhibition d'un mais la promotion de l'autre, créant une nouvelle forme d'interaction entre ces deux importants systèmes de réponse au stress. Alors que dans des cellules normales, la génération de ROS est limitée, le blocage de l'activation de NF- κ B est considéré comme une stratégie rationnelle dans le contrôle des maladies inflammatoires. Si l'accumulation de ROS est la principale raison pour une activation soutenue de JNK, n'importe quelle mesure qui réduit le stress oxydatif devrait être efficace dans la protection des cellules d'une mort par la nécrose ou l'apoptose (139).

L'étude effectuée comporte évidemment quelques limitations, le choix de cellules immortalisées en est une. Il est certain que des cellules immortalisées peuvent ou ne pas exprimer des facteurs ou enzymes retrouvés dans les cellules normales car il est possible que le plasmide SV40 transfecté dans ces cellules modifie ces facteurs ou enzymes. Certaines caractéristiques sont perdues dans les cellules tumorales comme l'inhibition de contact. Les IRPTCs peuvent être utilisés pour étudier comme les voies de signalisation, mais par la suite il est important d'effectuer ces mêmes expériences sur des cellules primaires soit non-transfectées et sur des animaux afin d'en vérifier les résultats. Une autre limitation serait l'utilisation d'ARNm lors des analyses des voies de signalisations testées avec leurs inhibiteurs spécifiques, plutôt que la mesure des niveaux de protéines. Cependant, l'étude présente donne tout de même de bonnes indications sur la direction qui pourrait être prise dans les projets futurs concernant la protéine GLP.

Ces études concernant de nouvelles protéines permettent de mieux connaître et comprendre les différents composants impliqués dans les voies de signalisation. Mieux comprendre la physiologie et ces intervenants aide à pointer de nouvelles cibles thérapeutiques. Il est très important de poursuivre leur découverte afin de développer des médicaments plus spécifiques et diminuant les effets secondaires. Cette nouvelle protéine, GLP, pourrait donc être, un jour, une nouvelle cible thérapeutique et c'est pourquoi il est nécessaire de poursuivre ces recherches.

Beaucoup de gens essaient de nouveaux traitements comme les antioxydants. En effet, plusieurs formes d'hypertension, dont celles associées aux hauts niveaux d'ang II, sont accompagnées par une production de superoxyde (O_2^-) (111). Il est montré qu'un traitement avec des antioxydants normalise la production de O_2^- et atténue ainsi l'hypertension (109). L'une des méthodes qui pourrait être employée afin de contrer les effets des ROS serait donc les antioxydants. Les vitamines E et C sont des antioxydants facilement disponibles et ont été considérés lors de dommages rénaux chroniques et autres désordres. La vitamine E, en supplément, a généralement été associée avec l'amélioration du stress oxydatif et de l'anémie chez les patients se trouvant au stade terminal de la maladie rénale (103). Toutefois, les résultats d'études chez l'humain sont généralement négatives (107). L'une des raisons possibles pour cette inefficacité est que les chélateurs, tel que la vitamine E, peuvent servir non seulement comme antioxydants, mais aussi comme pro-oxydants. Par exemple, la vitamine E réagit avec les radicaux et subséquemment génère les radicaux tocophéroxyls. Aussi, en fortes doses, la vitamine C peut potentiellement aggraver le stress oxydatif en devenant elle-même un pro-oxydant et en catalysant la conversion du fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}), un événement favorisant la formation du radical hydroxyl, un ROS. De fortes doses de vitamine C devraient donc être évitées. En plus du manque de cohérence des bases biologiques et donc, de l'efficacité limitée, l'utilisation de hautes doses d'un antioxydant donné peut perturber la balance du système de défense antioxydant. Un tel déséquilibre peut, paradoxalement, intensifier les dommages oxydatifs dans les compartiments cellulaire ou tissulaire où l'antioxydant donné et ainsi cette forme de radicaux libres se trouve plus concentré (103).

Cependant, un problème de la thérapie antioxydante reste, dont le manque de méthodes sensibles et directes afin d'évaluer le stress oxydatif *in vivo* (107). Ainsi, la plupart des études déterminent les niveaux de vitamines antioxydantes, mais non pas les niveaux de base de ROS ou les changements dans les niveaux de ROS obtenus avec le traitement afin d'indiquer si le but de la thérapie a été atteint ou non (101).

De récents rapports ont révélé que les statines peuvent inhiber la production de ROS dans les cellules vasculaires, probablement via l'inhibition de l'activation de la NAD(P)H oxydase induite par l'ang II (107). De plus, plusieurs études cliniques montrent que les

statines préviennent le déclin de la fonction rénale. Le mécanisme de l'activation dépendante de PKC de la NAD(P)H oxydase vasculaire peut être une nouvelle cible de la thérapie antioxydante pour prévenir, entre autre, les complications diabétiques vasculaires (107).

Finalement, en contraste aux dommages tubulaires aigües où la croissance accélérée est désirable, l'hypertrophie rénale compensatoire, associée à une défaillance rénale chronique, peut ultimement mener à une perte irréversible de la fonction rénale et au développement de fibrose interstitielle. Conséquemment, les voies interférant avec cette croissance maladaptive peuvent offrir des opportunités thérapeutiques futures afin de prévenir la progression de la maladie rénale (89). Une diète contenant des portions généreuses de fruits et légumes frais en plus d'une activité physique modérée représente la stratégie la plus sécuritaire et efficace pour relancer le système de la défense antioxydante (103).

Conclusion

En conclusion, notre laboratoire a identifié une nouvelle protéine associée au récepteur AT1, GLP. Cette protéine est retrouvée dans plusieurs tissus dont le cœur et les reins. Deux lignées cellulaires, les VSMCs et les IRPTCs, montrent lorsque GLP est surexprimé, de l'hypertrophie cellulaire. Plusieurs méthodes dont le FACS, l'incorporation de [³H]-leucine et de [³H]-thymidine, ainsi que le contenu en protéines totales ont été utilisées pour mesurer l'hypertrophie. Il a aussi été montré que les différents types cellulaires n'utilisent pas les mêmes voies de signalisations. Les résultats obtenus semblent montrer que GLP pourrait être le lien entre le récepteur AT1 et l'initiation d'hypertrophie cellulaire. Nous avons démontré que l'ang II stimule l'expression de l'ARNm de GLP dans les IRPTCs d'une manière dépendante du temps et de la dose. Puis, avec l'aide d'inhibiteurs spécifiques nous avons constaté que l'expression de l'ARNm de GLP est stimulée par l'ang II qui agit principalement à travers le récepteur AT1. La voie de signalisation EGFR, suivie de la MAPK ERK1/2, est aussi impliquée. La voie de la PKC semble aussi avoir un effet. Les ROS semblent de plus jouer un rôle important autant sur la régulation de l'expression de l'ARNm de GLP que dans l'hypertrophie induite par GLP dans les IRPTCs. Donc, GLP et les ROS pourraient être de bonnes cibles pour le développement de nouveaux médicaments dans le traitement des patients souffrant de maladies cardiovasculaires et rénales.

Bibliographie

1. **Brewster UC, Perazella MA** 2004 The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 116:263-272
2. **Joffres MR, Ghadirian P, Fodor JG, Petrasovits A, Chockalingam A, Hamet P** 1997 Awareness, treatment, and control of hypertension in Canada. *Am J Hypertens* 10:1097-1102
3. www.cybersciences.com/cyber/3.0/n868.asp. 2004.
4. **Michel J.B.** 2004 Système rénine-angiotensine et remodelage vasculaire. *Medecine Sciences* 20:409-413
5. **Wolf G** 1995 Angiotensin as a renal growth promoting factor. *Adv Exp Med Biol* 377:225-236
6. **Navar LG, Nishiyama A** 2004 Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:107-115
7. **Han HJ, Park SH, Lee YJ** 2004 Signaling cascade of ANG II-induced inhibition of alpha-MG uptake in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F634-F642
8. **Ingelfinger JR, Jung F, Diamant D, Haveran L, Lee E, Brem A, Tang SS** 1999 Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40 DNA: autocrine ANG II feedback. *Am J Physiol* 276:F218-F227
9. **Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H** 2002 Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* 39:316-322
10. **Nishiyama A, Seth DM, Navar LG** 2003 Angiotensin II type 1 receptor-mediated augmentation of renal interstitial fluid angiotensin II in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens* 21:1897-1903
11. **Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK** 1998 p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 273:15022-15029
12. **Haendeler J, Berk BC** 2000 Angiotensin II mediated signal transduction. Important role of tyrosine kinases. *Regul Pept* 95:1-7
13. **Guo DF, Tardif V, Ghelima K, Chan JS, Ingelfinger JR, Chen X, Chenier I** 2004 A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular

hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. *J Biol Chem* 279:21109-21120

14. **Funakoshi Y, Ichiki T, Takeda K, Tokuno T, Iino N, Takeshita A** 2002 Critical role of cAMP-response element-binding protein for angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 277:18710-18717
15. **Ruperez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J** 2003 Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am J Pathol* 163:1937-1947
16. **Kim S, Iwao H** 2000 Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52:11-34
17. **Touyz RM, Berry C** 2002 Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 35:1001-1015
18. **Park SH, Han HJ** 2002 The mechanism of angiotensin II binding downregulation by high glucose in primary renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F228-F237
19. **Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, Ardiles L, Justo P, Ortiz A, Egido J** 2003 Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int Suppl*S21-S26
20. **Inagami T, Eguchi S** 2000 Angiotensin II-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling. *Braz J Med Biol Res* 33:619-624
21. **Wolf G, Wenzel U, Hannken T, Stahl RA** 2001 Angiotensin II induces p27(Kip1) expression in renal tubules in vivo: role of reactive oxygen species. *J Mol Med* 79:382-389
22. **Wolf G** 1993 Regulating factors of renal tubular hypertrophy. *Clin Investig* 71:867-870
23. **Wolf G, Jablonski K, Schroeder R, Reinking R, Shankland SJ, Stahl RA** 2003 Angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells requires p27Kip1. *Kidney Int* 64:71-81
24. www.e-cardiologie.com/maladies/ma-hyperartadu.shtml. 2004.
25. www.paramed-prepa.com/infosresultat.php3?num=38. 2004.
26. www.rein.ca/publications/brochures/hypertension/hypertension.htm. 2004.

27. **Marieb EN, Laurendeau G** 1993 Anatomie et physiologie humaines. ERPI, Montreal, Canada
28. www.dr_fortinsante.org/fr/newsdet_f.asp?vid=169&vtile=11. 2004.
29. www.pulsus.com/CARDIOL/17_08/hsff_ed.htm. 2004.
30. [www.hypertension.qc.ca/\(swmvhvixdbasaeulclg4ed45/Public.aspx](http://www.hypertension.qc.ca/(swmvhvixdbasaeulclg4ed45/Public.aspx). 2004.
31. **Kotchen TA, Kotchen JM, Grim CE, George V, Kaldunski ML, Cowley AW, Hamet P, Chelius TH** 2000 Genetic determinants of hypertension: identification of candidate phenotypes. *Hypertension* 36:7-13
32. **Hamet P, Pausova Z, Adarichev V, Adaricheva K, Tremblay J** 1998 Hypertension: genes and environment. *J Hypertens* 16:397-418
33. **Hamet P** 1999 Genes and hypertension: where we are and where we should go. *Clin Exp Hypertens* 21:947-960
34. **Carey RM, Siragy HM** 2003 The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab* 14:274-281
35. **Guyton AC, Hall JE** 2000 Textbook of medical physiology. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A., tenth edn
36. **Navar LG** 2004 The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. *Kidney Int* 65:1522-1532
37. **Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME** 2004 ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab* 15:166-169
38. **Danilczyk U, Eriksson U, Oudit GY, Penninger JM** 2004 Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2. *Cell Mol Life Sci* 61:2714-2719
39. **Warner FJ, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ** 2004 Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective. *Cell Mol Life Sci* 61:2704-2713
40. **Nishiyama A, Seth DM, Navar LG** 2002 Renal interstitial fluid angiotensin I and angiotensin II concentrations during local angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Am Soc Nephrol* 13:2207-2212
41. **Hollenberg NK** 2002 AT(1)-receptor blockade and the kidney: importance of non-ACE pathways in health and disease. *J Hum Hypertens* 16 Suppl 3:S59-S63

42. **Sequeira Lopez ML, Gomez RA** 2004 The role of angiotensin II in kidney embryogenesis and kidney abnormalities. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:117-122
43. **Kobori H, Prieto-Carrasquero MC, Ozawa Y, Navar LG** 2004 AT1 receptor mediated augmentation of intrarenal angiotensinogen in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 43:1126-1132
44. **Cheng HF, Becker BN, Harris RC** 1996 Dopamine decreases expression of type-1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *J Clin Invest* 97:2745-2752
45. **Guo DF, Chenier I, Tardif V, Orlov SN, Inagami T** 2003 Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 310:1254-1265
46. **Navar LG, Kobori H, Prieto-Carrasquero M** 2003 Intrarenal angiotensin II and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 5:135-143
47. **Licea H, Walters MR, Navar LG** 2002 Renal nuclear angiotensin II receptors in normal and hypertensive rats. *Acta Physiol Hung* 89:427-438
48. **Zhuo JL, Imig JD, Hammond TG, Orengo S, Benes E, Navar LG** 2002 Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT(1) receptor. *Hypertension* 39:116-121
49. **Wang CT, Navar LG, Mitchell KD** 2003 Proximal tubular fluid angiotensin II levels in angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Hypertens* 21:353-360
50. **Poggioli J, Karim Z, Paillard M** 1998 [Effect of angiotensin ii on Na⁺/H⁺ exchangers of the renal tubule]. *Nephrologie* 19:421-425
51. **Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG** 2001 Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 37:1329-1335
52. **Kobori H, Nishiyama A, Harrison-Bernard LM, Navar LG** 2003 Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension. *Hypertension* 41:42-49
53. **Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Aros CA, Caorsi I, Vio CP, Ruiz-Ortega M, Egido J** 2003 Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* S64-S70
54. **Thurman JM, Schrier RW** 2003 Comparative effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on blood pressure and the kidney. *Am J Med* 114:588-598

55. **Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO** 2003 The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 93:3-13
56. **Inagami T, Senbonmatsu T** 2001 Dual effects of angiotensin II type 2 receptor on cardiovascular hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med* 11:324-328
57. **Wolf G** 2002 Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 9:48-51
58. **Wolf G** 2003 Growth factors and the development of diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep* 3:485-490
59. **de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T** 2000 International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472
60. **Clauser E** 1998 [Molecular structure and function of angiotensin ii receptors]. *Nephrologie* 19:403-410
61. **Conchon S, Monnot C, Teutsch B, Corvol P, Clauser E** 1994 Internalization of the rat AT1a and AT1b receptors: pharmacological and functional requirements. *FEBS Lett* 349:365-370
62. **Unger T** 2002 The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 89:3A-9A
63. **Cervenka L, Horacek V, Vaneckova I, Hubacek JA, Oliverio MI, Coffman TM, Navar LG** 2002 Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension* 40:735-741
64. **McGinn S, Saad S, Poronnik P, Pollock CA** 2003 High glucose-mediated effects on endothelial cell proliferation occur via p38 MAP kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E708-E717
65. **Wolf G, Harendza S, Schroeder R, Wenzel U, Zahner G, Butzmann U, Freeman RS, Stahl RA** 2002 Angiotensin II's antiproliferative effects mediated through AT2-receptors depend on down-regulation of SM-20. *Lab Invest* 82:1305-1317
66. **Bonnet F, Candido R, Carey RM, Casley D, Russo LM, Osicka TM, Cooper ME, Cao Z** 2002 Renal expression of angiotensin receptors in long-term diabetes and the effects of angiotensin type 1 receptor blockade. *J Hypertens* 20:1615-1624
67. **Campbell NA, Mathieu R** 1995 *Biologie*. ERPI, Montreal, Canada

68. **Shankland SJ, Wolf G** 2000 Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F515-F529
69. **Wolf G, Wenzel UO** 2004 Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension* 43:693-698
70. **Remuzzi G, Ruggenti P, Perico N** 2002 Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Ann Intern Med* 136:604-615
71. **Raij L** 2003 Recommendations for the management of special populations: renal disease in diabetes. *Am J Hypertens* 16:46S-49S
72. **Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN** 1993 Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 92:1366-1372
73. **Wolf G, Neilson EG** 1990 Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. *Am J Physiol* 259:F768-F777
74. **Wolf G, Neilson EG** 1991 Molecular mechanisms of tubulointerstitial hypertrophy and hyperplasia. *Kidney Int* 39:401-420
75. **Wolf G, Neilson EG** 1993 Angiotensin II as a hypertrophogenic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int Suppl* 39:S100-S107
76. **Ziyadeh FN, Wolf G** 2003 Why should an angiogenic factor modulate tubular structure in diabetic nephropathy? Some answers, more questions. *Kidney Int* 64:758-759
77. **Joles JA, Koomans HA** 2004 Causes and consequences of increased sympathetic activity in renal disease. *Hypertension* 43:699-706
78. **Wolf G** 1999 Angiotensin II: a pivotal factor in the progression of renal diseases. *Nephrol Dial Transplant* 14 Suppl 1:42-44
79. **Wolf G** 1998 Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. *Nephrologie* 19:451-456
80. **Wolf G, Neilson EG** 1993 Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* 3:1531-1540
81. **Zhang SL, Chen X, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS** 1999 Insulin inhibits angiotensinogen gene expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 140:5285-5292

82. **Touyz RM** 2003 Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:165-174
83. **Wolf G** 1998 Molecular mechanisms of angiotensin II in the kidney: emerging role in the progression of renal disease: beyond haemodynamics. *Nephrol Dial Transplant* 13:1131-1142
84. **Smith RD, Hunyady L, Olivares-Reyes JA, Mihalik B, Jayadev S, Catt KJ** 1998 Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin AT1a receptor is localized to a serine/threonine-rich region of its cytoplasmic tail. *Mol Pharmacol* 54:935-941
85. **Zahradka P, Litchie B, Storie B, Helwer G** 2004 Transactivation of the insulin-like growth factor-I receptor by angiotensin II mediates downstream signaling from the angiotensin II type 1 receptor to phosphatidylinositol 3-kinase. *Endocrinology* 145:2978-2987
86. **Morris AJ, Malbon CC** 1999 Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79:1373-1430
87. **Voisin L, Foisy S, Giasson E, Lambert C, Moreau P, Meloche S** 2002 EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C446-C455
88. **Gallinat S, Busche S, Raizada MK, Summers C** 2000 The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E357-E374
89. **Wolf G** 1995 Cellular mechanisms of tubule hypertrophy and hyperplasia in renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 21:303-316
90. **Griendling KK, Ushio-Fukai M** 2000 Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91:21-27
91. **Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC** 2003 Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:26-36
92. **Fujita H, Omori S, Ishikura K, Hida M, Awazu M** 2004 ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F120-F126
93. **Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS** 2002 High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 143:2975-2985

94. **Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL** 2003 Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol* 81:159-167
95. www.cellsignal.com. 2004.
96. **Xie Z, Singh M, Singh K** 2004 ERK1/2 and JNKs, but not p38 kinase, are involved in reactive oxygen species-mediated induction of osteopontin gene expression by angiotensin II and interleukin-1beta in adult rat cardiac fibroblasts. *J Cell Physiol* 198:399-407
97. **Yin G, Yan C, Berk BC** 2003 Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 35:780-783
98. **Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK** 2002 Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 91:406-413
99. **Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK** 1999 Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274:22699-22704
100. **Gorin Y, Kim NH, Feliers D, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE** 2001 Angiotensin II activates Akt/protein kinase B by an arachidonic acid/redox-dependent pathway and independent of phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J* 15:1909-1920
101. **Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ** 2004 Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F606-F616
102. **Garvin JL, Ortiz PA** 2003 The role of reactive oxygen species in the regulation of tubular function. *Acta Physiol Scand* 179:225-232
103. **Vaziri ND** 2004 Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:93-99
104. **Touyz RM** 2003 Activated oxygen metabolites: do they really play a role in angiotensin II-regulated vascular tone? *J Hypertens* 21:2235-2238

105. **de Gasparo M** 2002 Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev* 7:347-358
106. **Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS** 2003 Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R117-R124
107. **Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H** 2003 Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14:S227-S232
108. **Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY, Hamano T, Iwatani H, Sugaya T, Ito T, Hori M, Imai E** 2004 Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin. *J Am Soc Nephrol* 15:276-285
109. **Park YM, Park MY, Suh YL, Park JB** 2004 NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochem Biophys Res Commun* 313:812-817
110. **Braam B, Allen P, Benes E, Koomans HA, Navar LG, Hammond T** 2003 Human proximal tubular cell responses to angiotensin II analyzed using DNA microarray. *Eur J Pharmacol* 464:87-94
111. **Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK** 1998 Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32:488-495
112. **Wang Z, Castresana MR, Newman WH** 2004 Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 36:49-56
113. **Mason RM, Wahab NA** 2003 Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:1358-1373
114. **Wolf G, Zahner G, Mondorf U, Schoeppe W, Stahl RA** 1993 Angiotensin II stimulates cellular hypertrophy of LLC-PK1 cells through the AT1 receptor. *Nephrol Dial Transplant* 8:128-133
115. **Braun-Dullaes RC, Mann MJ, Ziegler A, der Leyen HE, Dzau VJ** 1999 A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Clin Invest* 104:815-823

116. **Wolf G, Ziyadeh FN** 1999 Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 56:393-405
117. **Wolf G, Shankland SJ** 2003 p27Kip1: the "rosebud" of diabetic nephropathy? *J Am Soc Nephrol* 14:819-822
118. **Monkawa T, Hiromura K, Wolf G, Shankland SJ** 2002 The hypertrophic effect of transforming growth factor-beta is reduced in the absence of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21 and p27. *J Am Soc Nephrol* 13:1172-1178
119. **Wolf G** 1999 Molecular mechanisms of renal hypertrophy: role of p27Kip1. *Kidney Int* 56:1262-1265
120. **Wolf G, Killen PD, Neilson EG** 1991 Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. *Cell Regul* 2:219-227
121. **Hannken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl RA, Wolf G** 2000 Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27(Kip1): role in angiotensin II-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 11:1387-1397
122. **Hannken T, Schroeder R, Stahl RA, Wolf G** 2001 Atrial natriuretic peptide attenuates ANG II-induced hypertrophy of renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F81-F90
123. **Pan JY, Wessling-Resnick M** 1998 GEF-mediated GDP/GTP exchange by monomeric GTPases: a regulatory role for Mg²⁺? *Bioessays* 20:516-521
124. **Cherfils J, Chardin P** 1999 GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 24:306-311
125. **Hixon ML, Muro-Cacho C, Wagner MW, Obejero-Paz C, Millie E, Fujio Y, Kureishi Y, Hassold T, Walsh K, Gualberto A** 2000 Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin Invest* 106:1011-1020
126. **Mori T, Cowley AW, Jr.** 2004 Role of pressure in angiotensin II-induced renal injury: chronic servo-control of renal perfusion pressure in rats. *Hypertension* 43:752-759
127. **Lewis EJ, Lewis JB** 2003 Treatment of diabetic nephropathy with angiotensin II receptor antagonist. *Clin Exp Nephrol* 7:1-8

128. **Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC** 2003 Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:S254-S258
129. **Sowers JR** 2004 Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1597-H1602
130. **Luft FC** 2001 Angiotensin II and cell cycle inhibition. *J Mol Med* 79:351-352
131. www.laboratorynetwork.com/content/news/articles.asp?DocID={93192445-7901-471b-bc3d-98a718561827}. 2004.
132. **Murali B, Umrani DN, Goyal RK** 2003 Effect of chronic treatment with losartan on streptozotocin-induced renal dysfunction. *Mol Cell Biochem* 249:85-90
133. **Brasier AR, Recinos A, III, Eleдрisi MS** 2002 Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1257-1266
134. **Redling S, Pfaff IL, Leitges M, Vallon V** 2004 Immunolocalization of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I, beta II, delta, and epsilon in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F289-F298
135. **Nishiyama A, Yoshizumi M, Rahman M, Kobori H, Seth DM, Miyatake A, Zhang GX, Yao L, Hitomi H, Shokoji T, Kiyomoto H, Kimura S, Tamaki T, Kohno M, Abe Y** 2004 Effects of AT1 receptor blockade on renal injury and mitogen-activated protein activity in Dahl salt-sensitive rats. *Kidney Int* 65:972-981
136. **Laverman G, Ruggenti P, Remuzzi G** 2003 Angiotensin-converting enzyme inhibition or angiotensin receptor blockade in hypertensive diabetics? *Curr Hypertens Rep* 5:364-367
137. **Jozsef L, Filep JG** 2003 Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-kappaB and AP-1 activation and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes. *Free Radic Biol Med* 35:1018-1027
138. **Hayakawa M, Miyashita H, Sakamoto I, Kitagawa M, Tanaka H, Yasuda H, Karin M, Kikugawa K** 2003 Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *EMBO J* 22:3356-3366
139. **Zhang Y, Chen F** 2004 Reactive oxygen species (ROS), troublemakers between nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK). *Cancer Res* 64:1902-1905

Accord des coauteurs

1. Valérie Tardif
2-484-1-0, M.Sc. Sciences biomédicales
2. Guo DF, Tardif V, Ghelima K, Chan JS, Ingelfinger JR, Chen XM, Chenier I. A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. J Biol Chem. 2004 Feb 24

Article soumis au journal Endocrinology en date du 23-08-2004

Valérie Tardif, Karim Ghelima, Annick Desjardins, Julie R Ingelfinger, Isabelle Chénier, XiangMei Chen, John S.D. Chan and Deng-Fu Guo. Angiotensin II stimulates a novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein, GLP gene expression in rat kidney proximal tubular cells :mechanism of GLP-induced cellular hypertrophy.

À titre de coauteur des articles ci-dessus, je suis d'accord pour que Valérie Tardif incluse ces articles dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre GLP, une nouvelle protéine associée au récepteur AT1, induit de l'hypertrophie dans les cellules du tubule proximal de rein de rat; mécanismes moléculaires de l'action de GLP.

GHELIHA KARIM
Coauteur

08-09-2004
Date

Deng-Fu GUO
Coauteur

08-09-2004
Date

ISABELLE CHENIER
Coauteur

8 septembre 2004
Date

JOHN S.D.CHAN
Coauteur

le 8 sept 2004
Date

ANNICK DESJARDINS
Coauteur

10-09-04
Date

Att'n : Dr DF Guo

Accord des coauteurs

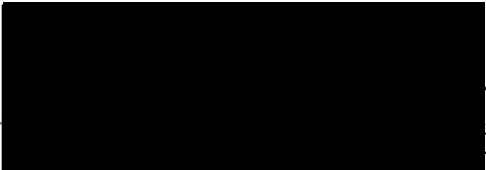
- 1. Valérie Tardif
2-484-1-0, M.Sc. Sciences biomédicales
- 2. Guo DF, Tardif V, Ghelima K, Chan JS, Ingelfinger JR, Chen XM, Chenier I. A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. J Biol Chem. 2004 Feb 24

Article soumis au journal Endocrinology en date du 23-08-2004

Valérie Tardif, Karim Ghelima, Annick Desjardins, Julie R Ingelfinger, Isabelle Chénier, XiangMei Chen, John S.D. Chan and Deng-Fu Guo. Angiotensin II stimulates a novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein, GLP gene expression in rat kidney proximal tubular cells :mechanism of GLP-induced cellular hypertrophy.

À titre de coauteur des articles ci-dessus, je suis d'accord pour que Valérie Tardif incluse ces articles dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre GLP, une nouvelle protéine associée au récepteur AT1, induit de l'hypertrophie dans les cellules du tubule proximal de rein de rat; mécanismes moléculaires de l'action de GLP.

Julie R. Ingelfinger
Coauteur



Sept 8 '04
Date

PERMISSION DE L'ÉDITEUR D'UNE REVUE

1. Journal of Biological Chemistry
940 Elkridge Landing Road
Linthicum, MD
21090-2908
2004-09-07
2. Nom des éditeurs
Dan Scott
3. Guo DF, Tardif V, Ghelima K, Chan JS, Ingelfinger JR, Chen XM, Chenier I. A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. J Biol Chem. 2004 Feb 24

L'étudiante Valérie Tardif est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre GLP, une nouvelle protéine associée au récepteur AT1, induit de l'hypertrophie dans les cellules du tubule proximal de rein de rat; mécanismes moléculaires de l'action de GLP.

The student Valérie Tardif received an authorization to include the above mentioned paper as part of a thesis entitled « GLP, une nouvelle protéine associée au récepteur AT1, induit de l'hypertrophie dans les cellules du tubule proximal de rein de rat; mécanismes moléculaires de l'action de GLP. », to be submitted to the Department of Medecine, Faculty of Medecine of the Université de Montréal, for the M.Sc. diploma.

Joan Cuthbert

Date : 09/14/04

For the copyright owner

**THE AMERICAL SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY
AND MOLECULAR BIOLOGY**
