

Université de Montréal

**Effets chroniques des peptides angiotensines II et IV  
dans le système nerveux central**

par

Nadheige Lochard

Département de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D  
en biologie moléculaire

Mars, 2006

© Nadheige Lochard, 2006





## 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

Cette thèse intitulée :

Effets chroniques des peptides angiotensines II et IV dans le système nerveux central

présentée par :  
Nadheige Lochard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr David W. Silversides, président-rapporteur  
Dr Timothy L. Reudelhuber, directeur de recherche  
Dr Gaétan Thibault, membre du jury  
Dr Gaétan Guillemette, examinateur externe  
Dr André Ferron, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le système rénine-angiotensine (SRA) est l'un des principaux mécanismes régulateurs de la pression artérielle chez les mammifères. Les constituants du SRA, en provenance de différents organes, se rencontrent dans la circulation pour produire son effecteur principal, le peptide vasoconstricteur angiotensine II (Ang II). L'inactivation du SRA durant le développement, dans des modèles animaux ainsi que chez l'homme, est associée à une mortalité au cours de la période néonatale ainsi qu'à de graves problèmes de développement rénal. Outre le SRA circulant, il existe également les SRA tissulaires, qui pourraient contribuer aux effets hémodynamiques et développementaux du SRA.

Le cerveau est un tissu qui possède son propre SRA indépendant du circulant; de plus, il est protégé de la circulation par la barrière hémato-encéphalique. Plusieurs fonctions ont été attribuées au SRA dans le système nerveux central (SNC), comme la régulation de la pression artérielle, le contrôle de la soif et la libération des hormones hypophysaires, dont la vasopressine et la corticostimuline (ACTH). Ces fonctions ont été observées dans des études utilisant des injections aiguës de peptides angiotensines ou des inhibiteurs du SRA dans les ventricules cérébraux. Des modèles de transgéniques, surexprimant les composants du SRA dans le cerveau, ont aussi été générés. Dans ce cas, l'identité du peptide angiotensine responsable des effets observés est inconnue. La présence d'une forte activité des aminopeptidases dans le cerveau contribue à accélérer la dégradation de l'Ang II. Il se pourrait, qu'à l'inverse de la périphérie, les métabolites de l'Ang II soient très importants dans l'activité du SRA dans le SNC. À cet effet, des récepteurs, pour un des métabolites généré par l'activité des aminopeptidases sur l'Ang II, le peptide angiotensine IV (Ang IV), sont fortement exprimés et se retrouvent dans des régions du cerveau dépourvues des récepteurs de l'Ang II. Ces observations suggèrent que le peptide Ang IV pourrait avoir des effets autres que ceux associés à l'Ang II dans le cerveau.

*Notre hypothèse est que la production chronique de peptides angiotensines, dans le cerveau des souris transgéniques serait un meilleur modèle que les méthodes*

*d'injections aiguës ou de surexpression des composants du SRA pour identifier leurs effets dans le système nerveux central.*

Le but de cette étude a été d'étudier les effets d'une production chronique des peptides Ang II et Ang IV dans le SNC. La surexpression des peptides Ang II ou Ang IV dans le cerveau des souris transgéniques est assurée par une protéine de fusion placée sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux astrocytes, le GFAP (glial fibrillary acidic protein). Les cellules exprimant la protéine de fusion libèrent en continu le peptide angiotensine produit.

Nos résultats démontrent que la présence de l'Ang II dans le SNC normalise la pression artérielle, prévient l'hydronéphrose, et corrige l'incapacité à concentrer l'urine, après une restriction hydrique, chez les souris dont le SRA a été inactivé génétiquement. Les souris transgéniques surexprimant le peptide Ang IV dans le cerveau, développent une hypertension au même titre que celles qui surexpriment l'Ang II. De plus, les effets de l'Ang IV sur la pression artérielle nécessitent aussi l'activation des récepteurs de l'Ang II de type 1 ou AT1. Ainsi, le peptide Ang IV est un peptide actif du SRA dans le SNC. Ces résultats constituent un pas important vers l'élucidation du rôle du SRA dans le SNC.

**Mots-clés** : Système rénine-angiotensine, angiotensine II, angiotensine IV, cerveau, hydronéphrose, hypertension.

## Abstract

The renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in regulating mammalian arterial blood pressure. The main effector of the RAS, the vasoconstrictor peptide angiotensin II (Ang II) is produced in the circulation by a cascade of biochemical reactions from components that originate from different organs. Inactivation of the RAS during development, in both animal models and humans, is associated with a high degree of neonatal mortality and gross defects in renal development. The RAS components are also found in numerous tissues, where they could theoretically contribute to the hemodynamic control and in the developmental effect of RAS.

The brain contains its own RAS, which is independent from RAS present in the periphery. Moreover, it is protected from direct blood penetration by the blood brain-barrier. Most of the actions of central RAS include regulation of arterial blood pressure, thirst control and release of pituitary hormones such as vasopressin and adrenocorticotropin hormone (ACTH). These functions have been observed in studies using acute injection of angiotensin peptides or RAS inhibitors in brain ventricles. Transgenic mice overexpressing the RAS components in the brain have been also made. However, in this case the angiotensin peptide responsible for the observed effects remains unknown. Ang II is rapidly metabolized in brain by aminopeptidases which are highly active in this tissue, raising the possibility that metabolites of Ang II are important for brain RAS activity. In support of this idea, the receptors for one of the metabolites resulting from aminopeptidase action on Ang II, angiotensin IV (Ang IV), are highly expressed in brain areas different from those containing the Ang II receptors.

*Our hypothesis is that chronic production of specific angiotensin peptides in the brain of the transgenic mice would be a better model rather than using either acute injections or overexpressing RAS components to identify their effects in the central nervous system.*

The goal of this research was to study the effects of a chronic production of either Ang II or Ang IV peptides in the central nervous system (CNS). In this study, we used a fusion protein capable of releasing directly Ang II or Ang IV peptide. This fusion protein is targeted to the astrocytes in the brain of transgenic mice by the glial GFAP (glial fibrillary acid protein) promoter. The cells expressing this fusion protein continuously release the angiotensin peptide produced.

Our results show that the presence of Ang II in the CNS normalizes blood pressure, prevents hydronephrosis, and corrects the incapacity to concentrate the urine after water restriction in mice with an inactivated RAS. Overexpressing of Ang IV in the brain leads to the development of high blood pressure in transgenic. Moreover, the effects of Ang IV on blood pressure are mediated by the angiotensin II receptor type I or AT1. This study demonstrates that Ang IV peptide is an active angiotensin peptide of the RAS in the CNS and constitutes an important step towards the elucidation of the role of the RAS in the CNS.

**Keywords:** Renin-angiotensin system, angiotensin II, angiotensin IV, central nervous system, hydronephrosis, hypertension.



## Table des matières

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le système rénine-angiotensine classique .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Historique du système rénine-angiotensine .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Les composants du système rénine-angiotensine .....</b>	<b>6</b>
1.3.1 La rénine .....	6
1.3.2 L'angiotensinogène .....	9
1.3.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine.....	10
1.3.4 Les rôles physiologiques des peptides angiotensines .....	14
1.3.4.1 L'angiotensine II.....	14
1.3.4.2 L'angiotensine III.....	15
1.3.4.3 L'angiotensine IV .....	15
1.3.4.4 L'angiotensine (1-7).....	18
1.3.5 Les récepteurs des peptides angiotensines.....	20
1.3.5.1 Le récepteur AT1 .....	20

	viii
1.3.5.1.1 L'activation du récepteur AT1 .....	20
1.3.5.1.2 Les voies de signalisations intracellulaires activées par AT1 .....	22
1.3.5.2 Le récepteur AT2 .....	26
1.3.5.2.1 L'activation du récepteur AT2 .....	26
1.3.5.2.2 Les voies de signalisations activées par AT2 .....	27
1.3.5.3 Le récepteur AT4 ou AT4/IRAP .....	28
1.3.5.4 Le récepteur AT (1-7) ou l'oncogène Mas.....	30
<b>1.4 Les systèmes rénine-angiotensine tissulaires.....</b>	<b>31</b>
1.4.1 Fonctions potentielles des systèmes rénine-angiotensine tissulaires .....	32
<b>1.5 Le système rénine-angiotensine dans le système nerveux central .....</b>	<b>34</b>
1.5.1 Les composants du système rénine-angiotensine dans le système nerveux central.....	34
1.5.1.1 L'angiotensinogène .....	34
1.5.1.2 La rénine .....	37
1.5.1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine et les aminopeptidases...	38
1.5.1.4 La synthèse des peptides angiotensines .....	39
1.5.1.5 La distribution des récepteurs des peptides angio tensines dans le cerveau.....	40
1.5.2 Les fonctions du système rénine-angiotensine dans le système nerveux central .....	41
1.5.2.1 La régulation de la pression artérielle .....	42
1.5.2.2 La soif et l'appétit pour le sel.....	44
1.5.2.3 La différenciation neuronale.....	45
1.5.2.4 La barrière hémato-encéphalique.....	46
1.5.2.5 L'adaptation au stress.....	47
1.5.2.6 Les processus de mémorisation et d'apprentissage .....	49
1.5.2.7 Les maladies neurodégénératives.....	49
<b>1.6 Les effets de l'inactivation des gènes du SRA sur le développement rénal .....</b>	<b>50</b>
1.6.1 L'effet du SRA dans le développement rénal est-il direct ou indirect ? ....	53

1.7	Objectif de cette étude .....	54
	CHAPITRE 2 .....	57
	<b>BRAIN-SPECIFIC RESTORATION OF ANGIOTENSIN II CORRECTS RENAL DEFECTS SEEN IN ANGIOTENSINOGEN-DEFICIENT MICE.....</b>	<b>57</b>
	ABSTRACT.....	59
	INTRODUCTION.....	60
	MATERIALS AND METHODS .....	62
	RESULTS .....	66
	DISCUSSION .....	77
	ACKNOWLEDGMENTS .....	79
	REFERENCES .....	80
	CHAPITRE 3 .....	83
	<b>CHRONIC PRODUCTION OF ANGIOTENSIN IV IN THE BRAIN LEADS TO HYPERTENSION THAT IS REVERSIBLE WITH AN ANGIOTENSIN II AT1 RECEPTOR ANTAGONIST.....</b>	<b>83</b>
	ABSTRACT.....	85
	INTRODUCTION.....	86
	MATERIALS AND METHODS .....	88
	RESULTS .....	93
	DISCUSSION .....	105
	ACKNOWLEDGMENTS .....	107
	REFERENCES .....	108

<b>CHAPITRE 4</b> .....	<sup>x</sup> 112
<b>RÉSULTATS ADDITIONNELS ET DISCUSSIONS</b> .....	112
4.1 Caractérisation de l'hypertension artérielle des souris surexprimant les peptides Ang II et IV dans le SNC.....	113
4.2 Importance de l'Ang II dans le SNC dans l'équilibre hydrique .....	117
4.3 Mécanismes d'action du SRA central dans la correction de l'hydronéphrose.....	119
4.4 L'activation des récepteurs AT1 par l'Ang IV.....	123
4.5 Conclusion .....	128
4.6 Perspectives.....	129
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	132

## Liste des tableaux

**Tableau 1-I.** Séquences en acides aminés des principaux peptides angiotensines 16

**Tableau 1-II.** Les effets de l'inactivation des différents gènes du SRA sur la pression artérielle et les reins ..... 52

## Liste des figures

### Chapitre 1

- Figure 1-1.** Représentation schématique du système rénine-angiotensine circulant . 3
- Figure 1-2.** La synthèse des peptides angiotensines ..... 11
- Figure 1-3.** Distribution des récepteurs AT1, AT2 et AT4 dans le cerveau ..... 35

### Chapitre 2

- Figure 2-1.** Diagram of the vector used to release Ang II in the brains of transgenic mice. .... 67
- Figure 2-2.** Transgene expression analysis in GFAP-Ang II mice. .... 68
- Figure 2-3.** Level of Ang II in tissues and plasma of GFAP-Ang II mice. .... 69
- Figure 2-4.** Characterization of angiotensin peptides present in brain of GFAP-Ang II mice. .... 71
- Figure 2-5.** Blood pressure of GFAP-Ang II mice. .... 72
- Figure 2-6.** Histopathology of the kidneys (Sirius red staining). .... 75
- Figure 2-7.** Effect of restoring brain or circulating Ang II on renal function in AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice. .... 76

### Chapitre 3

- Figure 3-1.** Cascade of enzymatic reactions of the renin-angiotensin system (RAS) leading to the formation of Ang IV. .... 94
- Figure 3-2.** Diagram of the transgene used to target overexpression of Ang IV in brain. .... 95
- Figure 3-3.** Affinity of Ang IV and modified Ang IV peptides for the AT4 and AT1 receptors. .... 96
- Figure 3-4.** Transgene analysis in transgenic GFAP-10.X mice. .... 98

<b>Figure 3-5.</b> Characterization of Ang IV peptides present in brain and plasma of GFAP-10.X mice .....	100
<b>Figure 3-6.</b> Effect of brain Ang IV on blood pressure. ....	101
<b>Figure 3-7.</b> Levels of AT1 receptor in brain of GFAP-10.X mice.....	103
<b>Figure 3-8.</b> Effects of Ang II ( $10^{-8}$ mol/L) and Ang IV ( $10^{-7}$ mol/L) on intracellular free $Ca^{2+}$ concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in AT1-transfected CHO cells. ....	104

## Chapitre 4

<b>Figure 4-1.</b> Mesure de la pression artérielle systolique par la radiotélémétrie .....	115
<b>Figure 4-2.</b> Histologie de l'uretère des souris déficientes en AGT.....	121
<b>Figure 4-3.</b> Pathophysiologie et histologie du système urinaire des souris déficientes en AGT .....	122
<b>Figure 4-4.</b> Effet de l'Ang IV sur l'affinité du récepteur AT1 pour l'Ang II .....	125

## Liste des sigles et abréviations

<b>AA :</b>	Acide arachidonique
<b>ACTH :</b>	Corticotestimuline
<b>ADN:</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AGT:</b>	Angiotensinogène
<b>AMPc :</b>	Adenosine monophosphate cyclique
<b>Ang (1-7) :</b>	Angiotensine (1-7)
<b>Ang (1-9):</b>	Angiotensine (1-9)
<b>Ang I :</b>	Angiotensine I
<b>Ang II:</b>	Angiotensine II
<b>Ang III :</b>	Angiotensine III
<b>Ang IV :</b>	Angiotensine IV
<b>AP :</b>	“ <i>Area postrema</i> ”
<b>ARNm:</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>AT1:</b>	Récepteur de l'angiotensine II de type 1
<b>AT2:</b>	Récepteur de l'angiotensine II de type 2
<b>AT4:</b>	Récepteur de l'angiotensine IV
<b>cGMP:</b>	Guanosine monophosphate cyclique
<b>CHO:</b>	Lignée ovarienne d'hamster chinois
<b>CRF :</b>	Corticolibérine
<b>CVOs:</b>	Organes circumventriculaires
<b>DAG :</b>	Diacylglycérol
<b>ECA :</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>ECA2 :</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
<b>ECA<sub>t</sub> :</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine testiculaire
<b>EGF :</b>	Facteur de croissance de l'épiderme
<b>ERK :</b>	“Extracellular signal-regulated kinase”
<b>GDP :</b>	Guanosine diphosphate
<b>GFAP :</b>	“Glial Fibrillary Acidic Protein”
<b>GFP :</b>	Protéine verte fluorescente



<b>GLUT4</b>	: Transporteur de glucose 4
<b>GTP</b>	: Guanosine triphosphate
<b>HEK-293T</b>	: “Human embryonic kidney cell”
<b>HTA</b>	: Hypertension artérielle
<b>i.c.v.</b>	: Intracérébroventriculaire
<b>i.v.</b>	: Intraveineuse
<b>ICAM</b>	: “Intercellular adhesion protein”
<b>IP3</b>	: Inositol-1,4,5-triphosphate
<b>IRAP</b>	: “Insulin regulated aminopeptidase”
<b>JG</b>	: Juxta-glomérulaire
<b><math>K_{cat}</math></b>	: Constante catalytique
<b><math>K_d</math></b>	: Constante de dissociation
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b><math>K_i</math></b>	: Constante d’inhibition
<b><math>K_m</math></b>	: Constante de Michalelis-Menten
<b>LVV-H7</b>	: LVV-hemorphine-7
<b>MAPK</b>	: “Mitogen-activated protein kinases”
<b>MCP1</b>	: “Monocyte chemoattractant protein-1”
<b>ME</b>	: “Median eminence”
<b>MLCK</b>	: “Myosin light chain kinase”
<b>MPO</b>	: “Medial preoptic nucleus”
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: “Nuclear factor transcription factor-kappa B”
<b>NGF-R</b>	: “Nerve growth factor receptor”
<b>NO</b>	: Monoxyde d'azote
<b>NTS</b>	: Nucleus of the solary tract
<b>OVLT</b>	: “ <i>Organum vasculosum of the lamina terminalis</i> ”
<b>PA</b>	: Pression artérielle
<b>PGs</b>	: Protéines G
<b>PKC</b>	: Protéine kinase C
<b>PLA2</b>	: Phospholipase A2
<b>PLD</b>	: Phospholipase D

<b>R3T3 :</b>	Lignée de cellules fibroblastes
<b>RCPGs :</b>	Récepteurs couplés aux protéines G
<b>ROS :</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>RVML :</b>	“Rostral ventrolateral medulla”
<b>SARS :</b>	Syndrome de déficience respiratoire aigu sévère
<b>SFO :</b>	“Subfornical organ”
<b>SHR :</b>	Rat spontanément hypertendu
<b>SNC :</b>	Système nerveux central
<b>SRA :</b>	Système rénine-angiotensine
<b>STAT :</b>	“Signal transducer and activator of transcription”
<b>VCAM :</b>	Molécule d'adhésion vasculaire
<b>VSMC :</b>	Cellule musculaire lisse vasculaire

*À ma fille, Nadelyn  
ma mère, Christiane  
ma sœur Chrislyne et Édouard*

## Remerciements

Me voilà à la fin de mes études doctorales et presque au bout d'un grand rêve! Je tiens à remercier d'une façon particulière le Dr Timothy Reudelhuber qui m'a donné l'opportunité d'entreprendre ces études. Je me considère privilégiée de l'avoir eu comme directeur de thèse. Je qualifie son enseignement comme étant exceptionnel. Le Dr Reudelhuber est loin d'être un directeur exigeant, mais la confiance qu'il nous accorde, nous pousse à nous surpasser. Je le considère comme un modèle et aussi quelqu'un de très intelligent, comme le démontre l'originalité de ses projets de recherches. De plus, il reste humble et d'une grande disponibilité. Je lui serai toujours reconnaissante et je n'oublierai jamais les valeurs apprises, tant sur le plan scientifique que personnelle, durant ces années passées dans son laboratoire.

Un merci particulier à Chantal Mercure, la technicienne du laboratoire. Chantal est une personne avec une patience inouïe et des doigts de fée. Elle est toujours disponible et répond avec joie à toutes nos questions. Chantal est comme une mère pour les étudiants. Elle a à cœur le bien-être de chacun de nous et elle nous tend une oreille attentive pour tous nos petits bobos scientifiques ou personnels.

Je voudrais remercier le Dr Gary Prescott, un ancien étudiant au doctorat au laboratoire. Avec lui, j'ai appris à aiguiser mon sens critique, c'était notre avocat du diable à l'interne. Il m'a appris à «jongler» correctement avec mes tubes lors des essais radioimmunologiques.

Que dire de Jimmy, le futur Dr Dimitrios Dikeakos, un étudiant au doctorat au laboratoire. Jimmy est un collègue, un compagnon de voyage (on prend toujours le métro ensemble le soir) et un ami. Par sa gentillesse et son humour, il m'a aidé à passer à travers les périodes creuses (quand rien ne fonctionnent !). Je te dis merci et je te souhaite du succès dans ta carrière.

Je voudrais remercier le Dr Gaétan Thibault qui m'a appris les rudiments et les techniques d'études des récepteurs membranaires. Dr Thibault est toujours

disponible et je le considère comme une encyclopédie vivante. C'est la personne de référence pour résoudre les problèmes techniques. Un grand merci pour tous les conseils que vous m'avez prodigués au cours de ces dernières années et pour votre patience inouïe.

Un grand merci au Dr Gaétan Guillemette pour s'être déplacé de Sherbrooke à Montréal pour mes différents comités de thèses. Il m'a ouvert grandement les portes de son laboratoire quand j'ai sollicité son aide pour une technique délicate. Ses conseils et commentaires m'ont été très utiles au cours de ma formation.

Je voudrais également remercier le Dr David Silversides et Diana Raiwet pour nos collaborations fructueuses dans la production des souris transgéniques. Par votre gentillesse et votre accueil chaleureux, mes voyages à Saint-Hyacinthe furent un réel plaisir.

Pour finir, je voudrais remercier mes collègues de travail anciens et présents : Dr Isabelle Jutras, Fannie Tremblay, Angela Anton, Dr Sjors Van Kats, Dipti Taylor, Marie-Josée Lacombe. Un grand merci à vous tous ! Grâce à vous, j'ai pu travailler dans une ambiance très motivante et chaleureuse. Ces remerciements seraient incomplets si je n'inclusais pas Mme Viviane Jodoin, la secrétaire du programme de biologie moléculaire. Sa gentillesse et son professionnalisme m'ont mise en confiance et ont facilité mon intégration dans le département de biologie moléculaire.

Ces études ont été réalisées grâce au support financier du programme de biologie moléculaire de l'université de Montréal, de l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), de la Société canadienne d'hypertension (SCH) et des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC).

# **Chapitre 1**

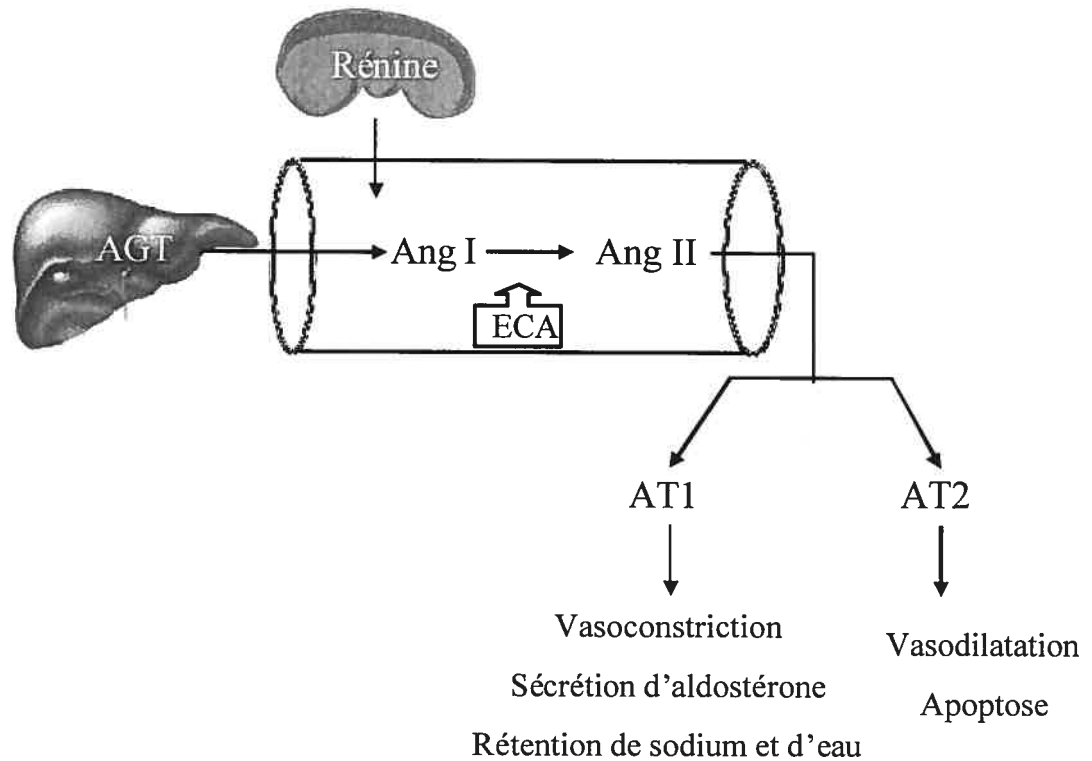
## **INTRODUCTION**

## 1.1 Le système rénine-angiotensine classique

Le système rénine-angiotensine (SRA) est l'un des principaux complexes de régulation de la pression artérielle (PA) chez les mammifères. Son fonctionnement repose sur la coordination entre plusieurs organes qui libèrent dans la circulation les différents constituants nécessaires à la production de son principal effecteur, l'octapeptide hypertenseur angiotensine II (Ang II) (Figure 1.1). La rénine, synthétisée et stockée par les cellules juxta-glomérulaires rénales, est libérée dans la circulation en réponse à des stimuli physiologiques, dont une baisse de la PA. La rénine scinde alors son substrat d'origine hépatique, l'angiotensinogène (AGT), et libère de sa partie N-terminale un décapeptide inactif, l'angiotensine I (Ang I). L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), localisée dans l'endothélium vasculaire, enlève deux acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'Ang I et la transforme en Ang II. L'Ang II libérée favorise la vasoconstriction des vaisseaux sanguins et la réabsorption d'eau et de sodium par les tubules rénaux, ce qui permet de maintenir constante la PA. L'Ang II possède deux récepteurs membranaires, les récepteurs de l'angiotensine II de type 1 (AT1) et 2 (AT2). La majorité des effets physiologiques et pathophysiologiques de l'Ang II se déclenchent par l'activation des récepteurs AT1. Les récepteurs AT2, plus nombreux au cours de la période foetale que chez l'adulte, favorisent une vasodilatation et seraient importants au cours de l'embryogenèse.

## 1.2 Historique du système rénine-angiotensine

L'hypothèse qu'il puisse exister un lien entre les maladies cardiaques et rénales fut avancée pour la première fois par Richard Bright en 1836. Ce dernier avait constaté, lors d'autopsies, qu'une hypertrophie cardiaque accompagnait toujours les cas d'insuffisances rénales sévères (1). Un demi-siècle plus tard, soit en 1898, le chercheur Robert Tigerstedt et son étudiant Per Bergman ont démontré qu'un extrait de rein de lapin pouvait induire une augmentation soutenue de la PA lorsqu'injecté par voie intraveineuse chez l'animal. Ils ont dénommé cette



**Figure 1-1. Représentation schématique du système rénine-angiotensine circulant**

La conversion de l'angiotensinogène (AGT) en angiotensine I (Ang I) par la rénine dans la circulation. L'Ang I est par la suite transformé en angiotensine II (Ang II) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ancrée à la surface des cellules endothéliales. L'Ang II active ses récepteurs AT1 et AT2 pour stimuler ses effets physiologiques.



substance la rénine (2). D'autres chercheurs furent incapables de reproduire ces résultats et la rénine fut ignorée jusqu'en 1934, l'année pendant laquelle Henry Goldblatt a développé le premier modèle animal de l'hypertension artérielle (HTA) chez le chien, par une constriction partielle de l'artère rénale (3). Lors des tentatives d'isolation de cette substance hypertensive, Page et ses associés ont découvert que l'extrait rénal devait être mélangé à du plasma pour produire son effet hypertenseur (4). Ils ont alors conclu que la substance libérée par les reins, en l'occurrence la rénine, est inactive et qu'elle doit absolument rencontrer son substrat dans le sang pour être effective. Ce produit formé dans le sang, à effet vasoconstricteur, fut isolé simultanément par deux groupes, le groupe de Page l'a nommé angiotonine et celui de Braun-Menendez hypertensine (5;6). Il fut convenu plus tard que l'hypertensine et l'angiotonine était un seul et même produit, les deux noms furent alors combinés et le produit renommé angiotensine (7). En 1954, le groupe de Skeggs a purifié l'angiotensine et découvre qu'il existe sous deux formes, un décapeptide inactif nommé angiotensine I (Ang I) et un octapeptide nommé Ang II (8;9). Deux ans plus tard, le même groupe a identifié l'enzyme responsable de la conversion de l'Ang I en Ang II, à laquelle ils ont donné le nom d'enzyme de conversion de l'angiotensine, et a publié aussi, durant la même période, la séquence en acides aminés de l'Ang II (10;11). La synthèse de l'Ang II par la compagnie pharmaceutique Ciba et sa distribution aux chercheurs ont permis d'avancer la compréhension sur les mécanismes d'actions du peptide et de mettre au point des techniques de dosage (12). Ainsi, on a pu mettre en évidence le rôle de l'Ang II dans la stimulation de la sécrétion de l'aldostérone et de son effet inhibiteur sur la sécrétion de la rénine (13-15).

Il fallait attendre le début des années 1970 pour voir apparaître les premiers inhibiteurs du SRA avec la mise en marché du captopril, un inhibiteur de l'ECA synthétisé et distribué par la compagnie pharmaceutique Squibb (16). Son utilisation s'est révélée très efficace dans le traitement de l'HTA et de ses effets secondaires tant chez les modèles animaux que chez l'humain (17-19). Par contre, les effets secondaires nuisibles qui leurs sont associés, comme la toux, l'hypotension et

l'angio-œdème ont stimulé l'intérêt pour la synthèse des inhibiteurs affectant d'autres composants du SRA, comme la rénine et les récepteurs AT1 (20;21). Si la recherche des antagonistes pour le récepteur AT1 fut couronnée de succès avec la commercialisation du losartan (DUP 753), il ne fut pas de même pour les inhibiteurs de la rénine, qui bien qu'efficaces dans les études expérimentales se sont révélés peu prometteurs dans les études cliniques (22-24).

Le bond dans le domaine de la biologie moléculaire, vers la fin des années 80, a favorisé le clonage des différents composants du SRA (AGT, rénine, ECA, AT1 et AT2), et a donné lieu à des modèles transgéniques de suractivation ou d'inactivation pour chacun de ces gènes (25-28). Ces manipulations génétiques n'ont fait que confirmer le rôle du SRA dans la physiologie et aussi dans la physiopathologie de l'HTA. La surexpression ou l'inactivation des gènes du SRA se traduit respectivement par une augmentation ou une baisse significative de la PA (29-32). Durant cette même période, on a pu mettre en évidence l'existence de l'ARNm des différents constituants du SRA dans plusieurs organes, comme le cœur, le cerveau et les reins, suggérant une synthèse locale et un rôle autocrine des peptides angiotensines dans les tissus. Le concept de SRA tissulaire est alors apparu (33;34).

Les années 2000 furent très prolifiques en termes de découvertes sur le SRA; le récepteur AT4 fut identifié comme étant l'aminopeptidase IRAP (*insulin regulated aminopeptidase*). Le rôle de l'Ang IV serait d'inhiber l'activité de l'IRAP, prolongeant ainsi la durée de vie des substrats cette dernière (35;36). Une nouvelle forme d'ECA, nommée ECA2, fut identifiée chez l'humain et serait responsable de la formation du peptide angiotensine (1-7) [Ang (1-7)], auquel des propriétés vasodilatatrices ont été rattachées (37). Le syndrome de déficience respiratoire aigu sévère (SARS) une maladie des voies respiratoires très contagieuse, avec un taux de décès avoisinant les 30 à 60% chez les personnes atteintes, qui a causé tout un émoi en 2003 (38;39). Le plus surprenant fut l'association de l'ECA2 au coronavirus (SARS-CoV) responsable du SARS, elle lui servirait de récepteur et faciliterait son entrée dans la cellule (40). Toutes ces nouvelles données, ajoutées au fait qu'on est loin du décryptage complet des fonctions des SRA tissulaires, laissent entrevoir

qu'on fait face à un système très complexe dont les fonctions pourraient dépasser largement le cadre de la régulation de la PA.

Les progrès accomplis dans la compréhension du SRA sont énormes, mais loin d'être complets. L'identité de la protéase responsable de l'activation de la prorénine reste inconnue. Les fonctions des SRA tissulaires et leurs interactions avec le SRA circulant dans l'HTA et de ses effets secondaires ne sont pas encore élucidées. Les études visant à mieux comprendre le fonctionnement et la régulation du SRA favoriseraient éventuellement un meilleur traitement des gens souffrant d'HTA, dont le nombre ne cesse d'augmenter. En effet, rien qu'aux États-Unis d'Amérique le nombre de personnes hypertendues a augmenté de 30% entre 1994 et 2003 (41).

### **1.3 Les composants du système rénine-angiotensine**

#### ***1.3.1 La rénine***

La rénine est une aspartyle protéase qui catalyse la transformation de l'AGT en Ang I, la première étape dans la cascade de réactions enzymatiques du SRA menant à la formation de l'Ang II. Elle est formée d'une seule chaîne polypeptidique contenant deux domaines, N- et C-terminaux, similaires qui se replient et forment deux lobes autour du site actif de l'enzyme (42). Chaque domaine fournit un des deux résidus acides aspartiques qui constituent le site actif de l'ECA. Contrairement aux autres protéases qui sont actives à pH acide, la rénine est active à un pH neutre; cette caractéristique lui permet d'être fonctionnelle au niveau plasmatique ou tissulaire. De plus, elle est aussi hautement spécifique pour son substrat l'AGT (42;43). La rénine est synthétisée par les cellules juxta-glomérulaires rénales (JGs), un groupe de cellules musculaires lisses spécialisées, localisées dans la partie terminale de l'artériole afférente du glomérule, innervées par des fibres nerveuses sympathiques (44;45). Ces dernières sont en contact étroit avec les cellules de la macula densa, un groupe de cellules épithéliales spécialisées, logées dans la portion terminale du tubule distal. Les cellules de la macula densa, équipées de capteurs

capables de détecter le niveau de sodium et le débit sanguin, envoient des signaux à l'artériole afférente qui ajuste la filtration glomérulaire afin de maintenir l'équilibre hydrosodique (45;46).

Certaines souches de souris (FVB/N, 129sv) possèdent deux gènes de rénine, nommés Ren1d et Ren2; tandis que d'autres (C57BL/6, C3H), tout comme l'humain et le rat, n'en possèdent qu'un seul : Ren1c (47;48). Ren2 est principalement synthétisée dans la glande sous-maxillaire, mais elle est aussi présente au niveau des testicules, des ovaires et des reins (49;50). Les séquences des gènes Ren1 et Ren2 partagent 97% d'homologie, mais en dépit de cela des différences importantes existent entre ces dernières. Comme il a été mentionné précédemment, Ren2 se retrouve majoritairement dans la glande sous-maxillaire, tandis que Ren1 est synthétisé au niveau des reins (49;50). De plus, il est noté que Ren1 contient trois sites de glycosylations, mais Ren2 n'en a aucun. Contrairement à Ren1, l'expression de Ren2 est stimulée par l'androgène, ce qui explique que seules les femelles soient hypotendues après l'inactivation de Ren1d (51;52).

La rénine est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif, la prépro-rénine. Cette dernière perd son segment pré ou peptide signal de 23 acides aminés lors du transport dans le réticulum endoplasmique, pour donner la pro-rénine (42;53). La pro-rénine produite reste inactive, elle est soit libérée de façon constitutive par la cellule ou emmagasinée dans les granules de sécrétions des cellules JGs. Dans ces granules, une protéase inconnue transforme la pro-rénine en rénine active par le clivage protéolytique de son fragment pro, composé de 43 acides aminés (42;53;54). La rénine active est libérée dans la circulation en réponse à plusieurs stimuli physiologiques, comme une stimulation du système nerveux sympathique, une chute de la PA ou une hyponatrémie (46;55).

La concentration de pro-rénine plasmatique atteint 4 à 5 fois le niveau de celle de la rénine. Elle représente environ 90% du contenu total de rénine (pro-rénine et de rénine) chez l'homme et le rat, tandis que chez la souris, elle ne représente que 30% à 50% du contenu total de la rénine (56;57). Considérant que la pro-rénine est inactive, son rôle et son importance au niveau du plasma reste inconnu. L'hypothèse

selon laquelle la prorénine pourrait être internalisée et activée par les cellules fut avancée. Cette possibilité a été évaluée à l'aide des souris doubles transgéniques surexprimant l'AGT et la prorénine humaine au niveau de l'hypophyse antérieure sous le contrôle du promoteur de l'hormone de croissance de rat. En tenant compte de la spécificité d'espèce entre la rénine et l'AGT, les auteurs de cette étude ont pu démontrer qu'il y avait une augmentation significative de la production locale d'Ang I seulement chez les doubles, et non les simples transgéniques (58). La prorénine pourrait avoir ainsi une activité enzymatique dans les tissus, tout en conservant son fragment pro.

L'internalisation de la prorénine, par le récepteur de la mannose-6-phosphate, a été observée au niveau des cellules endothéliales et des cardiomyocytes, indiquant que la glycosylation est importante pour l'internalisation (59). La présence de la rénine, toutefois, a été rapportée au niveau des cardiomyocytes de rats transgéniques surexprimant une forme de rénine non glycosylable, la Ren2. Donc, un récepteur autre que celui de la mannose-6-phosphate serait impliqué dans l'internalisation de Ren2 (32). Le clonage d'un récepteur spécifique pour la prorénine et la rénine vient renforcer cette idée. Ce récepteur, constitué de 350 acides aminés, ne présente aucune homologie avec des protéines connues. Son expression est retrouvée dans le cœur, le cerveau, le placenta et, à un niveau moindre, dans les reins (60). La liaison de la rénine sur ce récepteur contribue à augmenter son efficacité catalytique pour le clivage de l'AGT ( $K_{cat}/K_m$  : 2.4 à 12 S<sup>-1</sup>μM<sup>-1</sup>); de plus la fixation de la prorénine sur ce récepteur génère sensiblement la même quantité d'Ang I que la rénine en solution (60). En dépit de tout ce débat concernant l'activation de la prorénine, il semblerait que seul le rein contribue à la présence de la rénine dans le plasma, car chez l'humain, deux jours après une néphrectomie, la rénine plasmatique est en dessous du seuil de détection; tandis que la prorénine persiste, et ce, même après des années (61;62).

### 1.3.2 L'angiotensinogène

L'AGT est le seul substrat connu de la rénine et le précurseur des peptides angiotensines. Il appartient à la famille des serpines (inhibiteurs des sérines protéases) et est composé de 452 acides aminés avec un poids moléculaire qui varie entre 55 et 56 kilos Dalton (kDa) selon son niveau de glycosylation (63;64). L'AGT est synthétisé par les hépatocytes et libéré de façon continue dans la circulation. La concentration plasmatique de l'AGT dépend donc directement du niveau de transcription et de la durée de vie de la protéine (65). Parmi les facteurs pouvant affecter la transcription de l'AGT, se retrouvent les glucocorticoïdes, les hormones thyroïdiennes et les œstrogènes (65). En effet, durant la grossesse, le niveau d'AGT augmente en parallèle avec celui des glucocorticoïdes, et de même que chez les femmes qui prennent des pilules contraceptives (66-68).

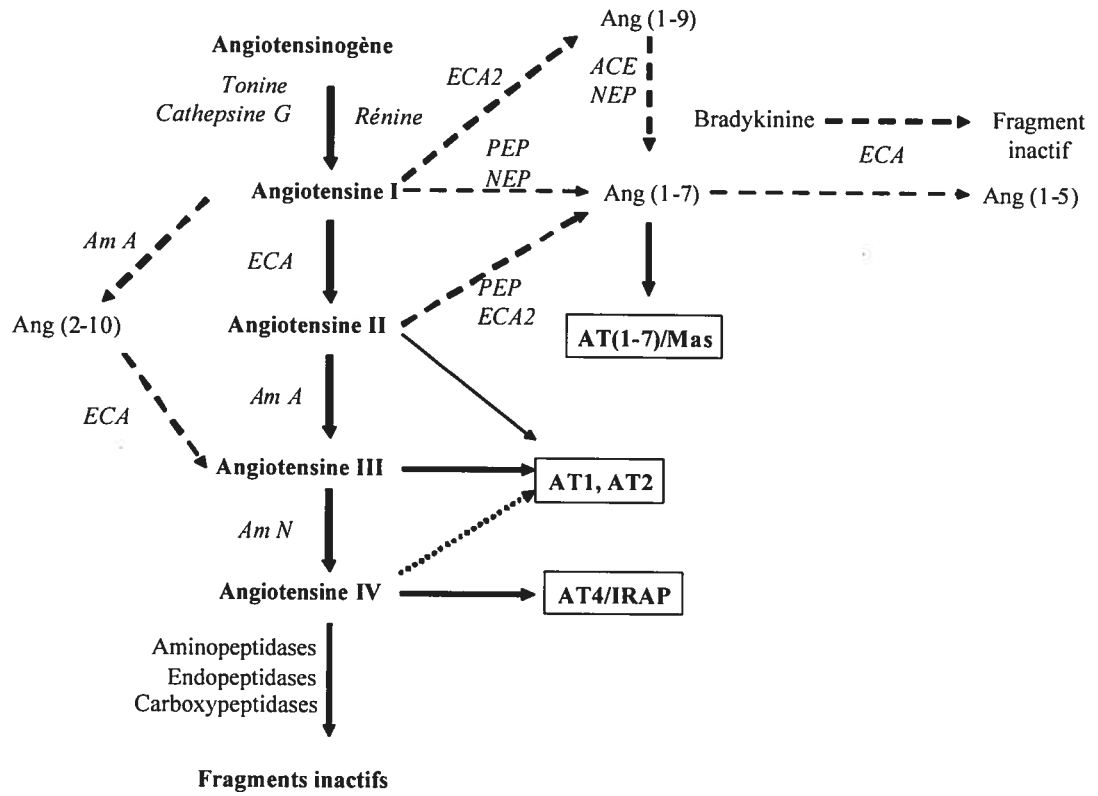
La rénine hydrolyse l'AGT entre les acides aminés leucine<sup>11</sup>-valine<sup>10</sup> chez l'humain, ou leucine<sup>11</sup>-leucine<sup>10</sup> chez les autres espèces, pour libérer l'Ang I. C'est une réaction dépendante de l'espèce, car l'AGT humain n'est clivable que par la rénine humaine ou par celles des primates. Quant à la rénine de souris, elle ne peut pas cliver l'AGT humain, et vice et versa (69). La constante d'affinité ( $K_m$ ) de la rénine pour l'AGT (1.15  $\mu$ M) est équivalente à sa concentration plasmatique (1.3  $\mu$ M) chez l'homme et le rat, par conséquent la formation de l'Ang II dépend à la fois de la concentration de la rénine et de celle de l'AGT (70;71). La situation est différente chez la souris, où le  $K_m$  de la rénine pour l'AGT est comparable à celui de l'homme, mais le niveau d'AGT est très faible (100-300 nM) et la concentration de rénine très élevée, et ceci, même chez les souches qui n'ont qu'un seul gène de rénine (Ang I: 200 ng/ml/h versus humain 10 pg/ml/h) (72). Chez la souris, la concentration de l'AGT est donc l'étape limitante dans la formation de l'Ang II. Cette différence est mise en évidence dans les études de transgéniques où une surexpression de la rénine n'affecte pas la PA chez les souris, alors qu'elle induit une HTA chez les rats (32;73). En revanche, la PA suit l'augmentation du nombre de copies du gène de l'AGT chez la souris (8 mmHg par copie d'AGT) (31).

Le fait que l'AGT composé de 452 acides aminés, soit le précurseur d'un peptide de seulement 10 acides aminés et que son homologie avec les protéines de types serpines soit de 20% suggèrent qu'il puisse avoir d'autres rôles dans l'organisme (74). Une augmentation significative du niveau plasmatique de l'AGT est observée après une réponse inflammatoire, tant chez les rongeurs que chez l'humain, aussi que durant la grossesse (65;75;76). D'autres études seront nécessaires pour mieux définir le rôle de l'AGT dans la physiologie de ces processus.

### 1.3.3 *L'enzyme de conversion de l'angiotensine*

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) appartient à la famille des métallopeptidases dépendantes du zinc. Son rôle consiste à enlever deux acides aminés à la partie C-terminale de l'Ang I pour produire l'Ang II. Elle n'est pas aussi spécifique que la rénine, car en plus de l'Ang I, elle clive d'autres substrats, dont la bradykinine (Figure 2) (77). Cette dernière est un polypeptide de 9 acides aminés, résultant de l'action de la kallibréine sur l' $\alpha$ 2-globuline, avec des propriétés vasodilatatrices. L'activité de l'ECA contribue à augmenter la PA en empêchant l'effet vasodilatateur de la bradykinine, tout en favorisant la production du peptide vasoconstricteur Ang II. À cet effet, la bradykinine semble être un meilleur substrat pour l'ECA que l'Ang I ( $K_{cat}/K_m$  : 61 et  $2.5 \text{ S}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  respectivement) (78).

L'ECA est composée d'une seule chaîne polypeptidique, ancrée à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un segment de 17 acides aminés hydrophobes situé près de la queue C-terminale (77). Une forme soluble de l'ECA est aussi relâchée dans le plasma, après le clivage au site arginine<sup>26</sup>-sérine<sup>27</sup> de l'enzyme, par une protéase non encore identifiée (79;80). L'attachement de l'ECA à la membrane plasmique est critique pour son rôle dans le contrôle de la PA, car les souris transgéniques, n'ayant que la forme soluble de l'enzyme, sont hypotendues (80). L'ECA contient deux sites catalytiques : un dans la partie C-terminale et l'autre dans celle N-terminale (81;82). Bien que les deux sites soient actifs, il existe toutefois des différences mineures quant à leur activité et leur spécificité pour le substrat. La présence du chlore augmente près de 10 fois l'activité



**Figure 1-2. La synthèse des peptides angiotensines**

Am : aminopeptidase; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine;

NEP : endopeptidase neutre; PEP : prolyle endopeptidase; Ang : angiotensine



du site actif en C-terminal, sans affecter celle du site en N-terminal (78;83). L'Ang I est clivé plus efficacement par le site actif en C-terminal que par celui en N-terminal ( $K_{cat}/K_m$  : 1.9 et 0.7  $S^{-1}\mu M^{-1}$ ). Quant à la bradykinine, elle est clivée indifféremment par les deux sites actifs ( $K_{cat}/K_m$  : 14 et 10  $S^{-1}\mu M^{-1}$ ) (78). Par contre, l'inactivation, par mutagenèse dirigée du site actif en N-terminal de l'ECA, en substituant les deux histidines par des lysines, est sans effet apparent chez la souris; donc le site actif en C-terminal à lui seul suffit à accomplir la tâche de l'ECA (84). Une différence dans la liaison des inhibiteurs de l'ECA est à noter. Ceux possédant un groupement fonctionnel carboxyle, comme le lisonopril, lie préférentiellement le site actif en C-terminal ( $K_i$  : N-terminal :  $44 \times 10^{-10}$  M; C-terminal :  $2.4 \times 10^{-10}$  M); et ceux avec un groupement fonctionnel sulfhydrile, dont le captopril, ont une préférence pour le site actif situé en N-terminal de l'ECA ( $K_i$  : N-terminal :  $8.9 \times 10^{-10}$  M; C-terminal :  $14 \times 10^{-10}$  M) (83). Ces différences sont importantes et devraient être prises en considération afin d'inhiber efficacement l'ECA et empêcher toute activité résiduelle lors des traitements de l'HTA.

Une forme tronquée de l'ECA est exprimée spécifiquement dans les testicules. Elle se retrouve dans les cellules de Leydig et dans la queue des spermatozoïdes matures (85;86). Cette forme testiculaire (ECA<sub>t</sub>) correspond à la partie C-terminale de la forme somatique, dont la transcription est assurée par un promoteur alternatif situé au milieu de l'ARN<sub>m</sub> de l'ECA (87). L'absence de l'ECA<sub>t</sub> est associée à une infertilité chez le mâle, mais cette fonction semble être indépendante du SRA et serait plutôt reliée à la capacité de l'enzyme à cliver les liens glycosylphosphatidylinositol, un processus important lors de la fertilisation de l'ovule (88;89).

Au début des années 2000, une autre forme d'ECA, nommé ECA<sub>2</sub>, a été isolée d'une banque d'ADN complémentaire provenant des ventricules de patients souffrant d'insuffisances cardiaques (37). Elle est aussi exprimée dans les reins, les testicules et les poumons (37). L'ECA<sub>2</sub> est également une ectoenzyme ancrée à la membrane plasmique par sa queue C-terminale. Elle partage 42% d'homologie de séquence avec l'ECA somatique et 33% avec l'ECA testiculaires (90;91). Les

enzymes ECA et ECA2 n'ont pas les mêmes substrats, et les inhibiteurs de l'ECA n'affectent pas l'activité de l'ECA2. Contrairement à l'ECA, l'ECA2 n'enlève qu'un acide aminé à la fois de l'extrémité C-terminale de son substrat, elle ne peut pas convertir l'Ang I en Ang II et n'a aucun effet sur la bradykinine. L'ECA2 est responsable de la production de l'angiotensine (1-9) [Ang (1-9)], aux effets encore inconnus, et de l'angiotensine (1-7) [Ang (1-7)] un autre peptide angiotensine à laquelle des propriétés vasodilatatrices ont été attribuées (Figure 2) (91). Par l'inactivation de l'ECA2, la PA des souris n'est nullement affectée, même si les auteurs rapportent une augmentation de l'Ang II plasmatique et des problèmes au niveau de la contractilité cardiaque (92). Le plus surprenant fut l'association de l'ECA2 au syndrome de déficience respiratoire aigu sévère (SARS) (40). Elle favorise la pénétration du coronavirus responsable du SARS (SARS-CoV) dans la cellule. En effet, la surexpression de l'ECA2 dans les cellules HEK-293T (*human embryonic kidney*) les rend permissives à l'entrée et à la réplication du virus, comparativement aux non transfectées (40).

Les inhibiteurs de l'ECA sont très efficaces dans le traitement de l'HTA et leurs effets bénéfiques ont toujours été associés à la diminution de la production d'Ang II et à l'augmentation du niveau de la bradykinine. Des évidences expérimentales suggèrent que ces effets bénéfiques pourraient être aussi reliés aux signaux d'activations intracellulaires déclenchés uniquement par la fixation des inhibiteurs sur l'ECA (93;94). Ces derniers favoriseraient la phosphorylation de la queue cytoplasmique de l'ECA par le recrutement de la caséine kinase 2. Cette phosphorylation de l'ECA lui confère alors la capacité d'activer le proto-oncogène *c-jun*. Une fois activé, *c-jun* est ensuite transloqué au noyau, où il stimule l'expression de l'ECA et de la cyclooxygénase 2. Cette expression de la cyclooxygénase 2 stimule la production de la prostacycline, possédant des effets vasodilatateurs et constituant également un facteur anti-agrégation plaquettaire très puissant (93;95). Ainsi, les inhibiteurs de l'ECA agissent à plusieurs niveaux pour diminuer la PA, premièrement, en inhibant la formation de l'Ang II et la dégradation de la bradykinine; deuxièmement, en stimulant la production de la prostacycline.

### **1.3.4 Les rôles physiologiques des peptides angiotensines**

#### **1.3.4.1 L'angiotensine II**

Les peptides angiotensines sont des produits générés par le métabolisme du décapeptide Ang I. Le premier de cette catégorie est l'Ang II formé par le clivage de deux acides aminés de l'extrémité C-terminale de l'Ang I par l'ECA (Figure 1-2, Tableau 1-I). Les effets de l'Ang II sont multiples et convergent vers un seul but, celui de maintenir constant la PA. Ce but est atteint en régulant la contraction des vaisseaux sanguins et en contrôlant l'équilibre hydrosodique de l'organisme. Ces effets sur la PA peuvent être classés en deux catégories : directs et indirects. L'Ang II régule directement la PA en agissant, sur les vaisseaux sanguins pour induire une vasoconstriction, sur les reins pour provoquer une rétention d'eau et de sodium par les tubules rénaux et la contraction de l'artère glomérulaire efférente, afin de maintenir la pression de filtration glomérulaire. L'Ang II stimule l'excrétion de l'aldostérone et du cortisol par la corticosurrénale, et celles des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) par la médullosurrénale. L'aldostérone et le cortisol augmentent la volémie en favorisant la réabsorption d'eau et de sodium par la partie distale et proximale des tubules rénaux respectivement. Les catécholamines, quant à elles, déclenchent une accélération de la fréquence cardiaque et la vasoconstriction des vaisseaux sanguins.

L'action indirecte de l'Ang II sur la PA s'exerce par différents mécanismes. En effet, l'Ang II stimule la libération de l'ACTH (*adrenal cortex trophic hormone*) par l'hypophyse antérieure et de la vasopressine par l'hypophyse postérieure. La vasopressine est une hormone antidiurétique synthétisée au niveau de la région du PVN de l'hypothalamus et stockée au niveau de l'hypophyse postérieure. Elle agit directement sur les tubules rénaux et favorise une rétention d'eau, à forte concentration elle peut avoir aussi un effet vasoconstricteur. L'ACTH libéré agit au niveau de la zone glomérulaire de la surrénale et accélère la conversion du cholestérol en prégnénolone, le précurseur de l'aldostérone. Ainsi, l'Ang II stimule directement et indirectement la libération de l'aldostérone, lui permettant d'amplifier

son effet sur la rétention d'eau et de sodium par les reins. L'Ang II stimule l'activité du système nerveux sympathique aboutissant à la libération des catécholamines responsables, entre autres, d'une vasoconstriction et de la libération de la rénine par les cellules JGs rénales. L'Ang II stimule aussi la sensation de soif, favorisant ainsi l'ingestion de liquide. Tous ces mécanismes mis en place par le SRA via l'Ang II, permettent d'avoir une réponse rapide lors d'une chute de la PA ou d'un déséquilibre hydrosodique afin de maintenir l'homéostasie de l'organisme.

#### ***1.3.4.2 L'angiotensine III***

L'angiotensine (2-8) ou Ang III résulte du clivage du résidu aspartique de l'extrémité N-terminale de l'Ang II par l'aminopeptidase A (Figure 1-2, Tableau 1-I). Tout comme l'Ang II, l'Ang III se lie sur les récepteurs AT1 (96;97). Par contre, elle a une affinité 10 fois plus faible que celle de l'Ang II pour AT1, ce qui explique que ses effets soient moins puissants que ceux de l'Ang II (97). L'Ang III déclenche les mêmes réponses physiologiques que l'Ang II, comme la vasoconstriction des vaisseaux sanguins, la sécrétion de l'aldostérone, la libération de la vasopressine et la stimulation de la soif (98).

#### ***1.3.4.3 L'angiotensine IV***

Le clivage de l'arginine de l'extrémité N-terminale de l'Ang III par l'aminopeptidase N génère le peptide angiotensine (3-8) ou Ang IV (Figure 2, Tableau I). L'Ang IV possède une affinité 1000 fois plus faible que celle de l'Ang II pour le récepteur AT1 (96;99). La découverte des sites de liaisons spécifiques à l'Ang IV, nommées AT4, a stimulé les recherches sur le rôle physiologique de ce peptide (100;101). Le récepteur AT4 diffère du point de vue pharmacologique des récepteurs AT1 et AT2, en conséquence un antagoniste peptidique qui lui est spécifique fut synthétisé, le divalinal, afin de faciliter sa caractérisation (102;103). L'Ang IV ne semble pas être le seul ligand endogène du récepteur AT4, car un décapeptide, isolé à partir de cerveau de mouton, lie aussi AT4 avec une affinité de

**Tableau 1-I. Séquences en acides aminés des différents peptides angiotensines**

---

<b>Ang I</b>	$\text{NH}_2\text{-Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-His}^9\text{-Leu}^{10}\text{-COOH}$
<b>Ang II</b>	$\text{NH}_2\text{-Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-COOH}$
<b>Ang III</b>	$\text{NH}_2\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-COOH}$
<b>Ang IV</b>	$\text{NH}_2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-COOH}$
<b>Ang (1-7)</b>	$\text{NH}_2\text{-Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-COOH}$

---

l'ordre du nanomolaire (104). Ce décapeptide correspond à la séquence interne de la  $\beta$ -globine, plus précisément les acides aminés 30 à 39 (LVVYPWTQRF), d'où le nom de LVV-hémorphine-7 (LVV-H7) (104).

Bien que les rôles physiologiques de l'Ang IV ne soient pas complètement élucidés, ses effets dans l'organisme semblent être multiples. Un des premiers effets attribuables à l'Ang IV est sa capacité à stimuler les processus de mémorisation et d'apprentissage. L'injection intracérébroventriculaire (i.c.v) d'Ang IV permet de restaurer le déficit dans l'apprentissage et la mémorisation chez des rats ayant subi une perforation ciblée au niveau de l'hippocampe (105;106). Cet effet semble être médié par l'activation des récepteurs AT4, car il est inhibé par le divalinal, un antagoniste des récepteurs AT4. Des évidences expérimentales suggèrent que le peptide Ang IV pourrait avoir aussi des effets vasodilatateurs. Une augmentation significative du flux sanguin cérébral et rénal ( $\approx 20\%$ ) a été rapportée chez le rat, après une infusion de l'Ang IV au niveau de l'artère cérébrale moyenne ou de l'artère rénale (107-109). Cependant, d'autres études furent incapables de démontrer cet effet vasodilatateur de l'Ang IV, et malgré l'utilisation des mêmes souches de rats et sensiblement les mêmes doses d'Ang IV (110;111). Les mécanismes déclenchés dans la vasodilatation et le rôle du monoxyde d'azote (NO) une molécule à effet vasodilatateur, ont engendré beaucoup d'études qui s'opposent et ne font pas l'unanimité (108;111). Des effets vasoconstricteurs ont été aussi associés à l'Ang IV, observés au niveau des artères mésentériques et rénales du rat (112;113). Il ne semble pas y avoir de consensus clair sur les récepteurs impliqués dans la vasoconstriction stimulée par l'Ang IV. Certaines études la rattachent à l'activation des récepteur AT1, tandis que d'autres l'attribuent à l'activation des récepteurs AT4 (112;113).

L'Ang IV aurait aussi des propriétés mitogéniques. Une augmentation de la synthèse d'ADN et d'ARN a été rapportée dans les fibroblastes cardiaques, et dans les cellules neuronales en culture stimulées par l'Ang IV (114;115). Un rôle dans le remodelage vasculaire a été aussi suggéré, à cause d'une augmentation accrue du récepteur AT4 (224%) observée au niveau de la néointima après une angioplastie

chez le lapin (116). Au niveau des cellules endothéliales, l'Ang IV induit l'expression de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type I, une molécule favorisant la fibrinolyse (117;118). Ainsi l'Ang IV pourrait avoir des effets antithrombotiques.

#### **1.3.4.4 L'angiotensine (1-7)**

Plusieurs voies du métabolisme des peptides angiotensines mènent à la formation de l'angiotensine (1-7) ou [Ang (1-7)] (Figure 2, Tableau I). Il peut être libéré directement de l'Ang II ou de l'Ang I par l'action de l'ECA2 et des endopeptidases neutres respectivement. L'Ang (1-7) peut résulter aussi du clivage de l'Ang (1-9) par l'ECA. L'Ang (1-9) résulte, quant à lui, du clivage de l'Ang I par l'ECA2. L'Ang (1-7) était, jusqu'à récemment, considéré comme sans effets biologiques, mais ce point de vue a changé avec le clonage et la caractérisation de l'ECA2. La principale fonction de l'ECA2 est de produire l'Ang (1-7) et la surexpression de l'enzyme, lors des pathologies cardiaques, suggèrent que le peptide Ang (1-7) pourrait avoir des effets protecteurs dans l'organisme. À cet effet, des études *in vitro* ont rapporté des propriétés vasodilatatrices pour l'Ang (1-7) (119). Cette propriété s'observe aussi *in vivo*, car l'infusion intraveineuse (i.v) de l'Ang (1-7) normalise la PA des rats spontanément hypertendus (SHR) (120). Les mécanismes impliqués dans la vasodilatation stimulée par l'Ang (1-7) semblent multiples et font intervenir, entre autres, la bradykinine, la production de NO et les prostaglandines (121;122). Par contre, les souris déficientes en ECA2 ou en oncogène *mas*, identifié comme étant le récepteur de l'Ang (1-7), sont normotendues (92;123;124). Le rôle de l'Ang (1-7) comme un stimulant de la vasodilatation, du moins dans les conditions physiologiques normales, est remis en question par ces modèles de souris transgéniques.

Plusieurs études ont démontré que la présence de l'ECA2 dans le cœur lui fournissait une protection contre le remodelage cardiaque provoqué par une augmentation chronique de la PA. La surexpression de l'ECA2 dans le cœur des rats normotendus, par un vecteur viral, réduit significativement l'hypertrophie et la

fibrose cardiaque subséquentes à une HTA induite par une infusion i.v d'Ang II (125). De plus, une corrélation positive a été observée entre l'augmentation du niveau plasmatique de l'Ang (1-7) et l'utilisation chronique des inhibiteurs de l'ECA ou des antagonistes du récepteur AT1 chez des rats SHRs (126;127). Il fut alors suggéré que les effets bénéfiques de ces inhibiteurs du SRA dans le traitement de l'HTA pourraient être reliés au fait qu'ils favorisent l'augmentation plasmatique de l'Ang (1-7). Par contre, cet effet protecteur de l'Ang (1-7) dans l'hypertrophie cardiaque n'est pas observé dans tous les modèles animaux de l'HTA. Chez les rats rendus hypertendus par l'implantation sous-cutanée d'une pastille de déoxycorticostérone acétate, l'infusion i.v d'Ang (1-7) ne les a pas empêchés de développer une hypertrophie cardiaque (128). Toutefois, une augmentation de l'ECA2 est observée dans le cœur après un infarctus du myocarde, et ce tant chez le rat que chez l'humain (129). Des études approfondies seraient nécessaires pour définir si cette augmentation de l'ECA2 dans le cœur est associée à un mécanisme protecteur ou accélérateur des dommages cardiaques.

Les effets de l'Ang (1-7) se reflètent aussi au niveau cellulaire. Un effet anti-mitogénique a été observé dans les cellules cancéreuses pulmonaires ou des cardiomyocytes en culture stimulées par l'Ang (1-7) (130;131). De même, l'Ang (1-7) réduit l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) en culture stimulées par l'Ang II (132). L'effet anti-mitogénique de l'Ang (1-7) est aussi observé *in vivo*. En effet, l'infusion d'Ang (1-7) réduit significativement (63%) la prolifération cellulaire de la néointima après une angioplastie chez le rat (132). Cet effet anti-mitogénique de l'Ang (1-7) n'est inhibé que par un antagoniste peptide du récepteur de l'Ang (1-7) [D-alanine<sup>7</sup>-Ang-(1-7)] et non par des antagonistes des récepteurs AT1 ou AT2 (133). Ainsi, les voies de signalisations stimulées par l'Ang (1-7) déclenchent soit une vasodilatation ou un effet anti-mitogénique. Il se pourrait que ce peptide joue un rôle protecteur dans l'organisme et prévienne les dommages cardiovasculaires lors d'une suractivation du SRA.



### ***1.3.5 Les récepteurs des peptides angiotensines***

#### ***1.3.5.1 Le récepteur AT1***

Le récepteur AT1 appartient à la famille des récepteurs dits serpents, possédant 7 domaines transmembranaires et couplés aux protéines G (RCPGs). Il est composé de 359 acides aminés, avec ses extrémités N-terminale extracellulaire et C-terminale intracellulaire (134). L'arrangement des cystéines dans les boucles extracellulaires du récepteur AT1 le rend vulnérable à la présence des agents réducteurs (134;135). Chez les rongeurs, rat et souris, le récepteur AT1 existe en deux isotypes : AT1A et AT1B, codés par deux gènes différents (134;136). Ces deux récepteurs partagent 95 % d'homologie de séquence dans la partie codante, et seulement 60% dans la partie non codante, ce qui serait à l'origine des différences observées au niveau de leur distribution tissulaire et de leur régulation (134). L'expression du récepteur AT1A est ubiquitaire, se retrouvant dans la majorité des organes, par contre celle d'AT1B est limitée au cerveau, aux testicules et aux surrénales (136;137). Les deux récepteurs ont une régulation tissu-dépendante. Par exemple, une hypernatrémie régule à la hausse le niveau du récepteur AT1A sans affecter celle d'AT1B dans le cerveau; tandis que dans les reins, l'expression d'AT1B est réduite et celle d'AT1A demeure intacte (138;139). En dépit de ces différences, les deux récepteurs, AT1A et AT1B, sont identiques au point de vue pharmacologique, de leurs affinités pour l'Ang II, et déclenchent l'activation des mêmes signaux intracellulaires (134;140).

##### ***1.3.5.1.1 L'activation du récepteur AT1***

La fixation de l'Ang II sur le récepteur AT1 engage les résidus Asp<sup>1</sup> et Phe<sup>8</sup> de l'Ang II qui s'ancrent dans une poche formée par la Lys<sup>199</sup> dans le domaine transmembranaire V et l'Asp<sup>281</sup> dans la troisième boucle extracellulaire (134;141). Ces interactions sont critiques pour la fixation de l'Ang II sur le récepteur AT1 et non pour son activation. L'activation, quant à elle, nécessite des interactions entre les résidus Tyr<sup>4</sup> et Phe<sup>8</sup> de l'Ang II et les résidus His<sup>256</sup> et l'Ans<sup>111</sup> du récepteur AT1

(141). Ainsi, une mutation de l'Asp<sup>111</sup> en Gly (AT1-N111G) génère un mutant du récepteur AT1 constitutivement actif (142).

La théorie concernant l'activation des RCPGs stipule que ces derniers subissent une isomérisation spontanée entre une forme inactive (R) et active (R\*), et qu'en absence de ligand des contraintes moléculaires assureraient l'équilibre tout en favorisant la forme R (143). Le rôle du ligand serait de sélectionner la forme R\*, sans pour autant s'impliquer dans la transition, et aussi de favoriser le couplage aux protéines G (143;144). Par contre, qu'un seul récepteur RCPG puisse être couplé à différentes protéines G effectrices, ainsi que certains résultats obtenus des mutants des RCPGs constitutivement actifs, suggèrent l'existence d'un mode d'activation séquentielle où le ligand aurait un rôle actif dans la transition de la forme R à R\*. La caractérisation du mutant constitutivement actif du récepteur AT1-N111G, en comparaison avec le récepteur natif, révèle que cette mutation augmente l'affinité du récepteur pour l'Ang II ( $K_d$  : 0.23±0.02 à 0.16±0.05 nM), tout en réduisant son affinité pour les antagonistes, comme le losartan ( $K_d$  : 10±1.5 à 229±31 nM) (145). Le [Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>]-Ang II, un antagoniste peptidique du récepteur AT1, lie AT1-N111G avec une affinité de l'ordre du nanomolaire et l'active complètement (146). Ainsi, l'absence des acides aminés Asp<sup>1</sup>, Tyr<sup>4</sup> et Phe<sup>8</sup> sur l'agoniste [Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>]-Ang II) n'empêche pas l'activation complète du récepteur AT1-N111G, ce dernier se retrouve dans une conformation intermédiaire R', entre les formes R et R\* (146). Par contre, ce même analogue, [Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>]-Ang II, ne peut pas activer le récepteur AT1 natif, suggérant que la transition de la forme R à R' ne se fait pas de façon spontanée (145). De ces expériences ont découlés l'hypothèse que l'activation du récepteur AT1 passe par une forme intermédiaire, partiellement activée R', médiée par les acides aminés Tyr<sup>4</sup> et Phe<sup>8</sup> de l'Ang II, avant d'arriver à l'activation totale R\*. La question concernant l'existence de ces différentes formes dans les conditions physiologiques est soulevée et mérite considération.

L'existence d'un modèle d'activation séquentielle concorde avec les résultats obtenus où des voies de signalisations intracellulaires sont préférentiellement activées en fonction de l'agoniste utilisé et de la conformation du récepteur. Le

récepteur AT1-N111G ne subit jamais de phosphorylation que ce soit après une stimulation par l'Ang II, ou par le [Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>]-Ang II. Toutefois, on assiste à une internalisation du mutant d'AT1 seulement après une stimulation à l'Ang II, suggérant un mécanisme d'internalisation indépendant de la phosphorylation (146;147). Une augmentation de la production d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) est observée après la stimulation du récepteur AT1-N111G par l'Ang II ou par l'antagoniste [Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>]-Ang II (146;147). L'activation du récepteur AT1 natif par l'antagoniste [Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>]-Ang II induit la phosphorylation du récepteur sans provoquer une internalisation, et déclenche l'activation de la kinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) sans stimuler la production d'IP3 (146;147). En se basant sur ces résultats, il a été suggéré que le récepteur AT1 peut adopter différentes conformations et que les transitions entre ces dernières sont mises en évidence par l'utilisation des analogues de l'Ang II, ce qui pourrait expliquer les effets pléiotropiques de l'Ang II.

### ***1.3.5.1.2 Les voies de signalisations intracellulaires activées par AT1***

L'activation du récepteur AT1 par l'Ang II favorise son couplage aux protéines G (PGs). Les PGs sont constituées de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ancrées à la face interne de la membrane plasmique par un groupement prényle au niveau des sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ ; elles appartiennent à la famille des protéines qui peuvent hydrolyser le GTP (guanosine triphosphate). L'isoforme de la sous-unité  $G_{\alpha}$  détermine la voie de signalisation qui sera activée, par exemple la sous-unité  $G_{\alpha_s}$  active l'adénylate cyclase et la  $G_{\alpha_q}$  active la phospholipase C. Le recrutement des PGs par le récepteur activé favorise l'échange d'une molécule de GDP (guanosine diphosphate) pour une GTP au niveau de la sous-unité  $G_{\alpha}$ . Cet échange est responsable de la dissociation du complexe protéique en  $G_{\beta\gamma}$  et  $G_{\alpha}$ , nécessaire à l'activation des signaux intracellulaires.

La liaison de l'Ang II sur le récepteur AT1 entraîne son couplage à la protéine  $G_{\alpha_q-11}$ , qui elle active la phospholipase C. Cette enzyme hydrolyse la phosphatidylinositol-4-5 diphosphate en deux messagers intracellulaires : l'IP3 et le

diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub>, en se fixant sur ses récepteurs au niveau du réticulum sarcoplasmique, favorise la libération du calcium dans le cytosol. Le DAG, quant à lui, stimule l'activation de la protéine kinase C (PKC), impliquée dans la phosphorylation des protéines à effets mitogéniques. La deuxième voie activée par l'Ang II est celle des tyrosines kinases, l'activation de ces dernières déclenche la phosphorylation des protéines kinases comme MAPK (mitogen-activated protein kinases) et ERK. L'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation des protéines kinases déclenche l'activation des proto-oncogènes comme *c-jun* et *c-fos*, qui eux stimulent la prolifération et la croissance cellulaire (148). Le calcium agit au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires par l'intermédiaire de la calmoduline. Le complexe calcium-calmoduline active la kinase MLCK (*myosin light chain kinase*) qui phosphoryle la myosine. La phosphorylation de la myosine favorise sa liaison à l'actine et déclenche ainsi la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires.

L'Ang II active le facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B (*nuclear transcription factor-kappa B*), une protéine proinflammatoire. L'activation de NF- $\kappa$ B par l'Ang II nécessite d'abord celle des protéines JAK (*Janus kinase*) et STAT (*signal transducer and activator of transcription*) (149). Le rôle du facteur NF- $\kappa$ B est de stimuler la production des molécules proinflammatoires comme le MCP1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), l'ICAM (*intercellular adhesion protein*) et le VCAM (*vascular cell adhesion molecule*). L'Ang II est aussi impliqué dans la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), par l'activation de la NADPH-oxydase (*nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*) (148). La production des ROS entraîne un stress oxydatif important qui accentue les effets de l'inflammation et aussi affecte la fonction vasculaire (148).

La phospholipase D (PLD) et la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) sont toutes deux activées par l'Ang II. L'activation de la PLA<sub>2</sub> permet de libérer l'acide arachidonique (AA) des lipides membranaires. L'AA est métabolisé entre autres, (i) par la cyclooxygénase pour produire les prostaglandines, la thromboxane A<sub>2</sub> et la prostacycline, (ii) par les lipoxygénases pour libérer les leukotriènes et les lipoxines.

Ces composés sont impliqués dans les différentes phases de la réaction inflammatoire. La PLD, quant à elle, catalyse l'hydrolyse de la phosphatidylcholine en choline et en acide phosphatidique. Ce dernier peut stimuler les processus mitogéniques par sa transformation en DAG sous l'action de la phosphatidate phosphohydrolase (150;151). L'Ang II diminue aussi la production de l'AMPc, une molécule facilitant la vasodilatation, par le couplage du récepteur AT1 à la protéine  $G_{\alpha i}$ , qui elle inhibe l'activité de l'adénylate cyclase (152).

Il y a des évidences qu'un stress mécanique appliqué sur des cardiomyocytes en culture puisse activer les récepteurs AT1 en absence de la liaison de l'Ang II. Une activation de la kinase ERK est observée dans les cardiomyocytes ou des cellules HEK-293T transfectées avec le récepteur AT1, après l'application d'un stress mécanique. L'indépendance de l'Ang II dans cette activation est mise en évidence par l'utilisation des cardiomyocytes déficients en AGT (incapable de produire l'Ang II) qui reproduisent les mêmes résultats, et aussi par l'induction de l'hypertrophie cardiaque chez des souris déficientes en AGT, après une ligation aortique (153). Le traitement de ces souris par le candesartan réduit de façon significative l'hypertrophie cardiaque sans affecter la PA (153). Ces résultats concordent avec d'autres études rapportant une hypertrophie cardiaque sévère par la surexpression du récepteur AT1 dans le cœur des souris transgéniques (154;155). Par contre, une étude a rapporté le développement de l'hypertrophie cardiaque chez des souris transgéniques surexprimant une forme mutée du récepteur AT1, incapable de se lier aux protéines G ( $G_{\alpha q}/G_{\alpha i}$ ) (156). Ces résultats suggèrent que le récepteur AT1 peut activer des signaux intracellulaires indépendamment de son association avec les protéines G. D'autres études seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse et déterminer les signaux intracellulaires impliqués.

Les récepteurs AT1 sont dépourvus d'activité tyrosine kinase intrinsèque, et ses effets mitogéniques passent nécessairement par la transactivation des récepteurs possédant cette activité, comme le facteur de croissance EGF (epidermal growth factor). Le mécanisme de transactivation de l'EGF par AT1 implique des intermédiaires comme la PKC, le calcium, les ROS et les tyrosines kinases PyK2

(proline-rich tyrosine kinase) et *Src* (157). Ces molécules facilitent l'activation des métalloprotéases, à la surface cellulaire, responsables de la conversion de la *pro-heparin binding EGF* en *heparin binding EGF* (HB-EGF). Ce dernier se lie sur le récepteur EGF et déclenche son activation (158). Le récepteur EGF activé recrute alors les molécules adaptatrices comme Grb2-Sos et active la voie des kinases menant à la croissance et la prolifération cellulaire (159). En effet, la prolifération et la migration induite par l'Ang II sur les VSMCs en culture sont inhibées par l'utilisation d'un inhibiteur des métalloprotéases (GM6001) ou un anticorps contre le HB-EGF (160).

La formation des homodimères ou hétérodimères est un phénomène courant chez les RCPGs, et le récepteur AT1 n'échappe pas à cette règle. Des homodimères d'AT1 ont été mis en évidence ainsi que la présence des hétérodimères avec d'autres RCPGs comme le récepteur B2 de la bradykinine, le récepteur AT2, et l'oncogène *mas*, ce dernier étant le récepteur de l'Ang (1-7) (161-163). La formation de ces hétérodimères est insensible à la présence de l'agoniste ou des antagonistes des récepteurs impliqués et réduit leur internalisation. Certaines associations sont favorables à l'activation du récepteur AT1, par contre d'autres se comportent comme un antagoniste biologique. Ainsi, l'hétérodimérisation du récepteur AT1 avec le récepteur B2 de la bradykinine augmente son affinité et son efficacité pour l'Ang II (164). En revanche, l'activité du récepteur AT1 est réduite par son hétérodimérisation avec AT2 ou l'oncogène *mas* (161;165). Les homodimères d'AT1 ont été mis en évidence au niveau des monocytes et sont favorisés par le facteur XIIIa de la transglutaminase. Ces homodimères d'AT1 pourraient avoir un rôle dans la progression de l'athérosclérose observée chez les patients hypertendus (166). En accord avec cette idée, on a constaté une diminution significative du niveau des homodimères d'AT1 et une réduction des plaques athéromateuses chez les souris déficientes en apolipoprotéine E, un modèle animal de l'athérosclérose, par l'utilisation des inhibiteurs de l'ECA ou du facteur XIIIa de la transglutaminase (166). Une corrélation positive a été également observée entre le niveau des hétérodimères AT1-B2 et les cas de prééclampsies (167;168). Tous ces résultats

indiquent la possibilité que la formation des homo- ou hétérodimères des récepteurs de l'Ang II puisse avoir un rôle dans la pathophysiologie de l'HTA.

### ***1.3.5.2 Le récepteur AT2***

Le récepteur AT2 fait partie de la famille des récepteurs possédant 7 domaines transmembranaires et couplés aux protéines G. Il est composé de 363 acides aminés et ne partage que 34% d'homologie de séquence avec le récepteur AT1. Les différences se retrouvent particulièrement au niveau de la troisième boucle extracellulaire et dans la queue C-terminale (134). Le récepteur AT2 est exprimé ubiquitairement chez le fœtus. En revanche après la naissance son niveau chute considérablement pour devenir même indétectable, avec une exception pour certains organes comme le cerveau, le cœur, l'endothélium vasculaire et le tissu endométrial (134). Par contre, une réexpression du récepteur AT2 est observée dans certaines conditions pathologiques comme les insuffisances rénales et cardiaques, et les dommages vasculaires (169).

#### ***1.3.5.2.1 L'activation du récepteur AT2***

Le récepteur AT2 ne fut pas inclut initialement dans la famille des RCPGs, car un analogue non-hydrolysable du GTP (GTP $\gamma$ S) n'affectait pas son affinité pour l'Ang II (170). Par contre, son clonage a révélé son appartenance à la famille des RCPGs, toutefois ses caractéristiques différentes suggèrent un couplage à des protéines G non conventionnelles (171). Ceci fut confirmé par le fait que l'activation d'AT2 ne semble pas être reliée à aucune des voies de signalisation classiques activées par les RCPGs, comme la libération de calcium et la production d'IP3 (172). De plus, le récepteur AT2 semble exister sous différentes conformations avec certaines étant sensibles au GTP $\gamma$ S et d'autres non; cette hétérogénéité a été constaté dans différentes lignées cellulaires comme les cellules neuronales (N1E-115) et les fibroblastes (R3T3) (173;174).

### 1.3.5.2.2 *Les voies de signalisations activées par AT2*

Les mécanismes de signalisation du récepteur AT2 ne sont pas encore entièrement compris. Toutefois, son activation peut être reliée à trois mécanismes de transduction de signaux intracellulaires : l'activation des protéines phosphatases, la régulation de la voie guanylate cyclase-NO et finalement l'activation de la PLA2 (175). L'activation des phosphatases par AT2, du moins dans les préparations membranaires à partir de fœtus de rat, semble se faire via le couplage et l'activation de la protéine  $G_{\alpha i}$  (134;172). L'activation des phosphatases par AT2 vise la déphosphorylation des protéines kinases impliquées dans la prolifération et la croissance cellulaire comme les kinases MAPK et ERK (176;177). Ainsi, le récepteur AT2 inhibe l'activité du récepteur AT1 de deux façons : premièrement, par un contact direct via la formation des hétérodimères et deuxièmement, en inhibant les voies de signalisations activées par AT1, comme la déphosphorylation des kinases MAPK et ERK. Le récepteur AT2 peut aussi activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, via la production des ROS et de céramide, suggérant un rôle actif dans l'inflammation (178). L'activation de la guanylate cyclase et de la PLA2 par le récepteur AT2 entraîne la production de cGMP et d'acide arachidonique respectivement. Le cGMP favorise une vasodilatation tandis que l'acide arachidonique est métabolisé en prostaglandines et en leukotriènes, des molécules proinflammatoires. Le déclenchement de l'apoptose est une autre fonction attribuable à la stimulation du récepteur AT2, fonction qui cadre avec son haut niveau d'expression au cours de la période fœtale. Les mécanismes impliqués dans l'apoptose déclenchée par AT2 font intervenir la MAP kinase 38 et la caspase-3, ces dernières favorisent la déphosphorylation et l'inhibition du facteur anti-apoptotique *Bcl-2* (179;180).

Les voies de signalisations activées par AT2 semblent s'opposer à celles d'AT1, car elles déclenchent une vasodilatation, elles inhibent la prolifération et elles stimulent l'apoptose. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse que le récepteur AT2 pourrait avoir un rôle protecteur dans l'organisme. Les résultats obtenus avec des souris ou des cellules en culture déficientes en AT2 ne supportent pas toujours ce



rôle protecteur attribué aux récepteurs AT2. Une surcharge de volume, par une ligation aortique, entraîne une dilatation cardiaque et est associée à un taux de décès très élevé chez les souris déficientes en AT2 (63%) comparativement aux souris contrôles (34%) (181;182). Par contre, d'autres résultats suggèrent que le récepteur AT2 pourrait avoir un rôle délétère et même contribuer au développement de l'hypertrophie cardiaque. En effet, il fut impossible d'induire une hypertrophie cardiaque, que ce soit par ligation aortique ou par infusion sous-cutanée d'Ang II, chez des souris déficientes en AT2 (183;184).

Une augmentation de l'expression du récepteur AT2 est observée dans plusieurs pathologies, dont l'hypertrophie cardiaque. Des modèles cellulaires ont été utilisés afin d'étudier les effets reliés à une surexpression du récepteur AT2 et les résultats obtenus sont très contradictoires. La surexpression du récepteur AT2, dans des cellules en culture (R3T3, VSMC), déclenche une apoptose; cette apoptose est reliée à la formation des homodimères du récepteur AT2. De façon surprenante, ni l'apoptose, ni la formation des homodimères d'AT2 dans ces cellules ne dépendent de la présence de l'Ang II, d'où l'idée que le récepteur AT2 pourrait être constitutivement actif (179;185). Par contre, d'autres études rapportent une hypertrophie et une prolifération cellulaire par la surexpression du récepteur AT2 dans des cardiomyocytes en culture (186). Ainsi, le rôle du récepteur AT2 semble varier en fonction du modèle utilisé. Des interactions avec d'autres protéines non identifiées qui seraient présentes ou non dans un type cellulaire pourraient expliquer ces divergences dans les résultats précités. Il se pourrait également que des voies de signalisations soient activées en fonction du niveau d'expression du récepteur AT2. Cette hypothèse cadrerait avec la régulation temporelle (chez le fœtus) et conditionnelle (dans certaines pathologies) du niveau d'expression du récepteur AT2.

### ***1.3.5.3 Le récepteur AT4 ou AT4/IRAP***

Des sites de liaisons, spécifique pour le peptide Ang IV, furent identifiés pour la première fois dans le cortex surrénalien de veau (100). Ces récepteurs de l'Ang IV (AT4) démontrent une affinité de l'ordre du nanomolaire pour le peptide Ang IV et

sont pharmacologiquement différents des récepteurs AT1 et AT2 (101;103). La présence des récepteurs AT4 fut démontrée dans différents tissus comme le cœur, les reins et le cerveau, et ce avec une consistance à travers les espèces, dont la souris, le rat et l'humain (187-189).

Le récepteur AT4 ne semble pas être couplé aux protéines G, car son affinité pour le peptide Ang IV n'est pas affectée par l'analogue non-hydrolysable du GTP, le GTP $\gamma$ S. De plus, aucune des voies de signalisation intracellulaire, classiquement associés aux RCPGs, n'est activée par le peptide Ang IV (190). L'utilisation d'un analogue photoactivable d'Ang IV, suggère que le récepteur AT4 est une protéine membranaire d'environ 186 kDa, possédant un grand domaine extracellulaire (191). D'autres études rapportent que le récepteur AT4 pourrait être constitué de deux sous-unités : une de 165 kDa contenant le site de liaison pour l'Ang IV, et une autre de 60 kDa (192). Ces résultats soutiennent l'évidence que le récepteur AT4 n'appartient pas à la famille des RCPGs. Les voies de signalisations intracellulaires activées par AT4 ne sont pas encore identifiées, on ne connaît que les effets résultant d'une stimulation par l'Ang IV. Ces effets de l'Ang IV ont été décrits dans la section traitant des peptides angiotensines (section 1.3.4.3).

Récemment, le récepteur AT4 a été identifié comme étant l'IRAP (insulin-regulated aminopeptidase), une ectoenzyme appartenant à la famille des aminopeptidases zinc-dépendantes, comme les aminopeptidases A et N (36;193). L'IRAP est localisée dans les mêmes compartiments endosomaux que le transporteur de glucose GLUT4 et sa distribution cellulaire, tout comme celle de GLUT4, est régulée par l'insuline (194). Une superposition parfaite a été observée entre les sites de liaison de l'Ang IV et ceux de l'IRAP dans le cerveau, que ce soit par immunohistochimie ou par hybridation *in situ*. De plus, les cellules HEK-293T, transfectées avec l'IRAP, acquièrent la capacité de lier l'Ang IV (36). La liaison de l'Ang IV sur IRAP inhibe son activité enzymatique, donc le rôle de l'Ang IV pourrait être de prolonger la durée de vie de ses substrats (35). Bien qu'on ne connaît pas encore l'identité des substrats de l'IRAP *in vivo*, il a été démontré que cette dernière pouvait dégrader, *in vitro*, l'Ang III, la vasopressine, l'ocytocine, la

bradykinine, mais pas l'insuline (194;195). Des études ont également démontré que l'Ang IV ne se lie pas sur le site actif de l'IRAP, mais plutôt sur un site à proximité de la membrane plasmique (196). Il est fort probable que l'Ang IV soit un modulateur allostérique et non un ligand orthostérique de l'IRAP. Considérant ces résultats et la variété des effets produits par l'Ang IV, on peut émettre l'hypothèse qu'il existe d'autres récepteurs pour l'Ang IV.

Le rôle de l'IRAP dans l'hypertension n'a pas encore été déterminé. Par contre, les souris déficientes en IRAP développent une hypertrophie cardiaque ( $203.7 \pm 13.4$  versus  $169.9 \pm 8.6$  mg,  $P < 0.0001$ ) (197). De plus, il a été rapporté que l'Ang IV et son homologue LVV-H7 pouvait inhiber l'activité de l'ECA pour la conversion de l'Ang I en Ang II (198). Ce n'est que depuis peu de temps que l'IRAP a été intégré au SRA en tant que récepteur du peptide Ang IV, ce qui pourrait expliquer l'absence de données sur son implication dans le contrôle de la PA, malgré la disponibilité des souris déficientes en IRAP.

#### ***1.3.5.4 Le récepteur AT (1-7) ou l'oncogène Mas***

L'oncogène *mas*, identifié chez l'humain, est en fait un récepteur faisant partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (199). Son expression est détectée dans plusieurs tissus dont le cerveau, les reins, les testicules et les vaisseaux sanguins (200). Considérant le fait que les cellules CHO (*chinese hamster ovary cell*), transfectées avec le récepteur Mas, démontraient une augmentation du niveau du calcium intracellulaire après une stimulation par les peptides Ang II ou Ang III, le récepteur Mas fut proposé comme étant un récepteur pour les peptides angiotensines (201). Par contre, l'injection de ces mêmes peptides dans des oocytes de *Xenopus* exprimant le récepteur Mas, de rat ou humain, n'a pu confirmer ces résultats (202). Il fut proposé récemment que l'agoniste naturel de Mas serait le peptide Ang (1-7) (122;203). Plusieurs évidences expérimentales ont confirmé le rôle de Mas comme le récepteur de l'Ang (1-7). En effet, la liaison de l'Ang (1-7) radioactive est éliminée des reins de souris déficientes en Mas

comparativement aux souris contrôles. De plus, l'effet antidiurétique, observé après l'infusion de l'Ang (1-7), est absent chez les souris déficientes en Mas (203;204).

Le peptide Ang (1-7), l'agoniste de Mas, est considéré comme ayant des propriétés vasodilatatrices. Par contre, les souris déficientes en Mas n'ont pas de réduction de PA (205). Il a été démontré que le récepteur Mas pouvait antagoniser l'activité du récepteur AT1, par la formation des hétérodimères dans les cellules HEK-293T transfectées avec les deux récepteurs, et ce, indépendamment de la présence des ligands ou antagonistes de ces récepteurs (162). De plus, la réponse vasoconstrictrice à l'Ang II est plus forte dans les vaisseaux sanguins isolés des souris déficientes en Mas (162). Le fait qu'aucun phénotype n'est apparent par l'inactivation du récepteur Mas, supporte l'idée que ce dernier pourrait intervenir, lors d'une suractivation du SRA, où il antagoniserait l'activité des récepteurs AT1 et pourrait contrecarrer ainsi les effets néfastes de l'Ang II.

Les signaux intracellulaires reliés à l'activation de Mas ne sont pas encore connus. Récemment, il a été démontré qu'une stimulation de Mas, par un agoniste peptidique nouvellement synthétisé (BMP7), pouvait déclencher une libération du calcium intracellulaire et favoriser l'internalisation de ce récepteur dans les cellules CHO (206). Les modèles de transgéniques ou inductibles de Mas vont être importants pour mieux comprendre son rôle physiologique dans l'organisme.

#### **1.4 Les systèmes rénine-angiotensine tissulaires**

Le concept de SRA tissulaire suppose qu'un tissu doit posséder tous les éléments nécessaires à la synthèse locale des peptides angiotensines. Ces peptides pourraient exercer un effet local par l'activation autocrine ou paracrine de leurs récepteurs spécifiques. Les SRA tissulaires pourraient agir en tandem avec le SRA circulant dans la régulation de la PA, mais pourraient avoir également des fonctions non reliées au contrôle hémodynamique. L'existence des composants du SRA, au niveau tissulaire, a été mise en évidence par différentes approches moléculaires, immunologiques et pharmacologiques. Certains SRA tissulaires, comme le SRA du

cerveau, sont complètement indépendants du SRA circulant; tandis que d'autres en sont en partie tributaires. C'est le cas du SRA vasculaire et cardiaque qui doivent capter la rénine circulante. Plusieurs évidences expérimentales soutiennent la présence et le caractère fonctionnel des SRA tissulaires. Ainsi, dans certains organes comme les reins, les testicules et les surrénales, la concentration locale d'Ang II est souvent supérieure à celle détectée dans le plasma (hypophyse: 300 fois; reins : 1000 fois), suggérant une production locale et non une captation de l'Ang II circulante (61;207;208). L'Ang II demeure détectable dans certains tissus comme le cerveau, les testicules et même le plasma après une néphrectomie bilatérale en dépit de l'absence de la rénine circulante (209-212). De plus, en réponse à un même stimulus physiologique, les SRA tissulaires et circulants répondent différemment. Ainsi, une néphrectomie chez le rat entraîne une élévation du niveau d'AGT et une réduction de l'Ang II plasmatique, alors qu'elle est sans effet sur ces mêmes composants au niveau central (213). L'expression de la rénine surrénalienne augmente après une néphrectomie, une hypokaliémie ou une stimulation par l'ACTH. Dans ces mêmes conditions, celle de la rénine rénale disparaît ou est réprimée (214;215). L'utilisation chronique des inhibiteurs de l'ECA continue d'être efficace dans la réduction de la PA en dépit de l'augmentation de l'Ang II plasmatique, après une réduction initiale au début du traitement (216;217). Ces résultats suggèrent que l'effet hypotensif à long terme des inhibiteurs de l'ECA serait relié à une inhibition tissulaire plutôt que systémique de la formation de l'Ang II.

#### ***1.4.1 Fonctions potentielles des systèmes rénine-angiotensine tissulaires***

La distribution des composants du SRA au niveau des organes et leur surexpression dans certaines conditions pathologiques ont permis d'attribuer différentes fonctions aux SRA tissulaires. Le SRA vasculaire pourrait être impliqué dans le remodelage vasculaire et la progression de l'athérosclérose en stimulant la production des radicaux libres, la libération des molécules proinflammatoires et l'expression des molécules d'adhésions (218-220). L'activation du SRA cardiaque serait associée au développement de l'hypertrophie cardiaque. En effet, la

surexpression de l'AGT de rat dans le cœur des souris induit une hypertrophie cardiaque chez ces dernières, sans affecter leur PA (221). De plus, les inhibiteurs de l'ECA réduisent l'hypertrophie cardiaque chez les rats SHR à des doses non effectives sur leur PA (222). Ces résultats suggèrent donc un rôle actif de l'Ang II dans le cœur lors du déclenchement de l'hypertrophie cardiaque. Cette hypothèse a été évaluée dans un modèle de souris transgéniques par la surexpression dans le cœur d'une protéine de fusion capable de relâcher le peptide Ang II (223). L'hypertrophie cardiaque était indécélable chez ces souris en dépit d'une augmentation significative de l'Ang II cardiaque (20 à 50 fois le niveau normal) (223). Ces résultats suggèrent que la présence de l'Ang II dans le cœur n'est pas l'élément déclencheur de l'hypertrophie cardiaque. En accord avec cette étude, une induction de l'hypertrophie cardiaque est possible chez les souris déficientes en Ang II, par l'inactivation de l'AGT ou de ses récepteurs AT1, après une surcharge de pression provoquée par une ligation aortique (153;224;225). Il est possible que la présence de l'Ang II contribue aux dommages cardiaques sans pourtant en être l'inducteur. Dans le système reproducteur des femelles, le SRA est supposé impliqué dans la néovascularisation du tissu endométrial, du placenta et aussi dans l'atrésie folliculaire par l'intermédiaire des récepteurs AT2 (226;227;227). Toutefois, les souris déficientes en AGT sont fertiles et mènent à terme leurs grossesses. L'absence de l'ECA testiculaire chez les mâles est associée à une réduction de la fertilité (228). Par contre, cette fonction dans la fertilité est indépendante du SRA et serait plutôt reliée à la capacité de l'ECA de cliver les liens GPI impliqués dans la fertilisation de l'ovule (89). En dépit de ces supposés rôles des SRA tissulaires, leurs absences ne semblent pas affecter le fonctionnement normal des organes impliqués, à l'exception des reins et du cerveau.

La majorité des travaux présentés dans cette thèse concernent le rôle des peptides angiotensines dans le cerveau. En conséquence, une description en détail du SRA du cerveau et de ses effets physiologiques sont présentés dans la section suivante. Nous décrirons également l'importance du SRA dans le développement rénal et les évidences expérimentales qui nous ont amenés à l'hypothèse que le SRA du cerveau puisse avoir un rôle dans ce processus.

## **1.5 Le système rénine-angiotensine dans le système nerveux central**

Le cerveau est isolé de la circulation par la barrière hémato-encéphalique agissant comme un filtre sélectif et ne laissant passer que les nutriments nécessaires, par exemple l'insuline et le glucose. Puisque les peptides angiotensines ne peuvent traverser cette barrière, leur présence dans le cerveau ne peut résulter que d'une synthèse locale (229). En effet, l'Ang II est détectable et son niveau est même augmenté, après une néphrectomie bilatérale, éliminant toute trace d'Ang II dans la circulation systémique (212). Ces données démontrent que le SNC contient un SRA tissulaire indépendant du SRA circulant. Il faut mentionner que certaines régions situées autour des ventricules cérébraux sont dépourvues de la barrière hémato-encéphalique et sont impliquées dans les échanges d'informations entre le SNC et la circulation systémique. Ces régions sont nommées organes circumventriculaires (CVOs) et incluent : le SFO (*subfornical organ*), l'OVLTL (*organum vasculosum of the lamina terminalis*), l'AP (*area postrema*), et la ME (*median eminence*) (Figure 1-3) (230). Les régions du CVOs perçoivent tant l'Ang II produite dans le cerveau que celle présente dans la circulation, tandis que les régions protégées par la barrière hémato-encéphalique ne sont stimulées que par l'Ang II produite localement dans le cerveau.

### ***1.5.1 Les composants du système rénine-angiotensine dans le système nerveux central***

#### ***1.5.1.1 L'angiotensinogène***

L'expression de l'AGT est généralisée dans tout le cerveau et constitue l'une des protéines les plus abondantes du liquide cébrospinal (231;232). Les études d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ* révèlent son expression au niveau des astrocytes (233;234). Cependant, l'AGT a été détecté dans le milieu des cellules neuronales en culture, donc l'AGT se retrouverait, non seulement dans les astrocytes, mais également dans les neurones (235;236). La surexpression d'un

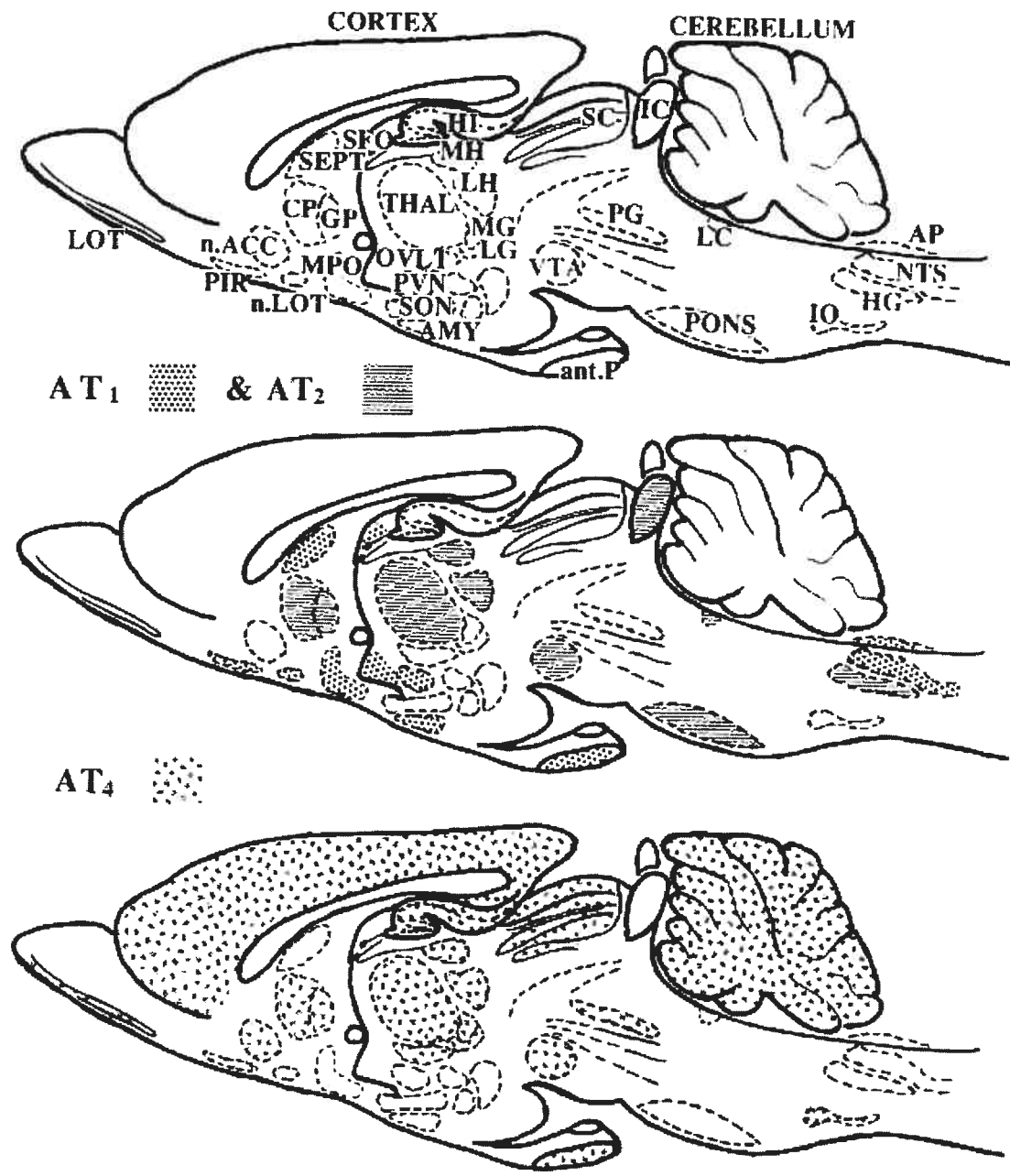


Figure 1-3. Distribution des récepteurs AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub> dans le cerveau  
 (Voir légende à la page suivante)



**Légende figure 1-3****Distribution des récepteurs AT1, AT2 et AT4 dans le cerveau**

Schematic sagittal drawings displaying the predominant distributions of the three angiotensin receptor subtypes. Upper Panel: Brain structures that possess AT1, AT2, or AT4 angiotensin receptors. Middle Panel: Brain structures that possess AT1 or AT2 binding sites. Lower Panel: Brain structures that possess AT4 binding sites. Abbreviations: **AMY**, amygdala; **AP**, area postrema; **ant. P**, anterior pituitary; **CP**, caudate-putamen; **GP**, globus pallidus; **HG**, hypoglossal nucleus; **HI**, hippocampus; **IC**, inferior colliculus; **IO**, inferior olivary nucleus; **LOT**, lateral olfactory tract; **LG**, lateral geniculate; **LH**, lateral habenula; **LC**, locus coeruleus; **MG**, medial geniculate; **MH**, medial habenula; **MPO**, medial preoptic nucleus; **n. LOT**, nucleus of the lateral olfactory tract; **n. ACC**, nucleus accumbens; **NTS**, nucleus of the solitary tract; **OVLT**, organum vasculosum of the lateral terminalis; **PG**, periaqueductal gray; **PVN**, paraventricular nucleus of the hypothalamus; **PIR**, piriform cortex; **SEPT**, septum; **SFO**, subfornical organ; **SC**, superior colliculus; **SON**, supraoptic nucleus; **THAL**, thalamus; **VTA**, ventral tegmental area.

(Figure tirée de la référence (264) et reproduite avec la permission de l'auteur)

antisens de l'AGT dans le cerveau de rat sous le contrôle du promoteur GFAP (GFAP-AsAGT) réduit de plus de 90% le niveau de la protéine AGT dans le cerveau (237). Ces résultats confirment que la synthèse de l'AGT dans le SNC, est produite principalement dans les astrocytes.

### **1.5.1.2 La rénine**

La présence de la rénine dans le cerveau et son rôle dans la synthèse des peptides angiotensines sont encore très discutées. Bien que son activité fut détectée dans les extraits de cerveau, sa localisation exacte demeure toutefois incertaine (238;239). Le niveau d'expression de la rénine semble être très faible dans le cerveau, car il a fallu près de 100 µg d'ARNm pour déceler sa présence par Northern blot (240). Ceci pourrait être à la base du peu de succès, obtenu dans les études visant à localiser la rénine dans le cerveau (240). En comparant le niveau d'expression de l'AGT à celle de la rénine, plusieurs ont avancé l'hypothèse que la cathepsine D, la tonine et la voie des chymases seraient plus importantes que la rénine, dans la formation de l'Ang I au niveau du cerveau (241;242). Récemment, une nouvelle lignée de souris transgéniques a été générée par la surexpression de la protéine fluorescente GFP (*green fluorescence protein*) sous le contrôle du promoteur de la rénine de souris (mRen-GFP). L'analyse histologique des coupes de cerveau de ces souris démontre l'expression de la protéine GFP dans plusieurs régions comme le SFO, le NTS (*nucleus of the solary tract*), le RVML (*rostral ventrolateral medulla*). Au niveau cellulaire, la protéine GFP a été localisée principalement dans les cellules neuronales (243). Cette étude confirme donc, la présence de la rénine dans le SNC; l'expression de la GFP étant sur le contrôle du promoteur de la rénine.

Une isoforme de la rénine a été rapportée au niveau du cerveau et résulterait de l'utilisation d'un promoteur alternatif, localisé au niveau de l'intron 1 du gène de la rénine. L'utilisation de ce promoteur est responsable de la production d'une prorénine tronquée, dépourvue de peptide signal et d'une partie de la région pro (2/3) (244;245). Étant dépourvue de peptide signal, cette isoforme de la rénine pourrait

constituer une source cytoplasmique de rénine active (244;245). A cet effet, une hypertension a été observée chez les souris transgéniques surexprimant la forme tronquée de la rénine humaine (GFAP-icRen) et de l'AGT humain (GFAP-AGT) dans le cerveau, sous le contrôle du promoteur GFAP (246). Ces résultats suggèrent que la rénine intracellulaire peut être active et contribuer à la formation de l'Ang I dans le SNC.

### ***1.5.1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine et les aminopeptidases***

Le rôle de l'ECA est d'assurer la conversion de l'Ang I en Ang II. Les aminopeptidases A et N clivent successivement un acide aminé de l'Ang II, pour générer les peptides Ang III et Ang IV respectivement. La localisation de ces enzymes de transformation des peptides angiotensines a été caractérisée dans le cerveau. Ainsi, il a été démontré que l'expression de l'ECA est généralisée dans tout le cerveau, avec un niveau plus élevé dans les régions du CVOs (247;248). L'activité des aminopeptidases dans le cerveau est de loin supérieure (2 à 3 fois) à celle du plasma ou des autres tissus (249;250). Ainsi, la dégradation des peptides angiotensines dans le SNC, pourrait être accélérée comparativement à ce qui se passe dans la circulation. Les aminopeptidases A et N ont été localisées dans des régions du cerveau associées aux récepteurs des peptides angiotensines qu'elles génèrent. L'utilisation d'un inhibiteur radioactif de l'aminopeptidase N ( $[^{125}\text{I}]$ -RB129), responsable de la formation de l'Ang IV, a permis de localiser son expression dans le cortex, l'hypothalamus et le cervelet. Les récepteurs AT4 sont fortement exprimés dans ces régions (251). L'aminopeptidase A, à laquelle est imputée la formation de l'Ang III, est détectée par immunohistochimie, entre autres, au niveau des microvaisseaux cérébraux, dans les neurones immunoréactives à l'Ang II et dans les régions du CVOs (252;253).

#### ***1.5.1.4 La synthèse des peptides angiotensines***

Comme il a déjà été mentionné, la formation de l'Ang II résulte d'une cascade de réactions enzymatiques. Tous les composants du SRA sont présents dans le cerveau, par contre, ils ne se retrouvent pas tous au niveau de la même cellule. L'AGT est localisé principalement dans les astrocytes et la rénine dans les neurones, soulevant alors la question sur le site de synthèse de l'Ang II (233;243). L'Ang II, détectée par immunohistochimie, est circonscrite dans les cellules neuronales (254). La présence de l'Ang II dans les cellules neuronales, résulte-t-elle d'une synthèse locale ou d'une internalisation de l'espace extracellulaire? Des nouvelles lignées de souris transgéniques ont été générées afin de répondre à cette question. Ces souris surexpriment la protéine GFP, sous le contrôle du promoteur de la rénine (Ren-GFP) et la  $\beta$ -galactosidase, sous le contrôle du promoteur de l'AGT humain (hAGT- $\beta$ -gal) (255). L'analyse histologique des coupes de cerveau de ces souris révèle que la rénine et l'AGT sont localisés dans des cellules adjacentes (255). En se basant sur ces résultats et en tenant compte que l'ECA est une ectoenzyme, l'hypothèse que la synthèse de l'Ang II, dans le SNC, se fasse dans l'espace extracellulaire, semble être la plus plausible.

Plusieurs études ont suggérées que l'Ang III et non l'Ang II serait l'effecteur principal du SRA dans le SNC. Si la dégradation de l'Ang II et de l'Ang III se fait sensiblement à la même vitesse dans le plasma ( $t_{1/2}$ : 13 et 16 secondes); dans le cerveau, l'Ang III est dégradée trois fois plus vite que l'Ang II ( $t_{1/2}$ : 23 et 8 secondes) (256). En dépit de cette dégradation rapide, l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v) de l'Ang III est équipotente à celle de l'Ang II, dans l'augmentation de la PA et dans la stimulation de la réponse dipsogénique (257). De plus, l'inhibition du métabolisme de l'Ang II en Ang III, par l'injection i.c.v d'un inhibiteur de l'aminopeptidase A (EC33) prévient l'augmentation de la PA et de la soif stimulées par une injection i.c.v d'Ang II (258;259). Une augmentation de la PA a été également observée chez des rats normotendus, chez qui le métabolisme de l'Ang III a été inhibé par l'injection i.c.v d'un inhibiteur de l'aminopeptidase N (PC18) (259). Les effets de l'Ang III, tout comme ceux de l'Ang II, sont médiés par

l'activation des récepteurs AT1, car ils sont inhibés par un prétraitement avec un antagoniste des récepteurs AT1 (259). Ainsi, l'effet de l'Ang II dans le SNC semble tributaire de sa conversion en Ang III. Par contre, on ne comprend pas encore comment l'Ang III puisse être aussi efficace que l'Ang II dans l'activation des récepteurs AT1 dans le SNC, alors qu'il a une affinité 10 fois plus faible, *in vitro*, que l'Ang II pour le récepteur AT1.

Des évidences expérimentales suggèrent que le peptide Ang IV pourrait être un peptide actif du SRA dans le SNC. En effet, l'injection i.c.v d'Ang IV, déclenche des réponses physiologiques comme l'augmentation de la PA et la stimulation des fonctions cognitives chez des rats ayant subi destruction neuronale mécanique (perforation ciblée de l'hippocampe) ou chimique (injection d'un inhibiteur des récepteurs muscariniques, la scopolamine) (260). L'utilisation d'un antagoniste spécifique des récepteurs AT4 ou des récepteurs AT1 et AT2 démontre que les effets de l'Ang IV sur la mémoire passent par l'activation des récepteurs AT4 et ceux sur la PA nécessitent l'activation des récepteurs AT1 (102;103). On pourrait suggérer que cette différence d'activation est reliée à une différence de concentration du peptide Ang IV utilisée dans ces études. En dépit de la différence d'affinité des récepteurs AT1 ou AT4 pour le peptide Ang IV ( $K_d$ : AT1 :  $10^{-7}$ M; AT4 :  $10^{-9}$ M), des études utilisant les mêmes doses d'Ang IV (100 pM) rapportent les mêmes observations. L'absence de modèle animal transgénique, surexprimant le peptide Ang IV, limite la mise en place des études *in vivo* qui pourraient permettre de mieux comprendre le comportement de ce peptide, dans l'activation des récepteurs AT1 et/ou AT4.

#### ***1.5.1.5 La distribution des récepteurs des peptides angiotensines dans le cerveau***

La distribution des récepteurs des peptides angiotensines dans le cerveau est bien caractérisée (Figure 1-3). La localisation des récepteurs AT1 dans le cerveau coïncide avec les fonctions qui leur sont attribuées. Ainsi, ils sont retrouvés dans les régions du cerveau impliquées dans la régulation de l'homéostasie des fluides corporels protégées [PVN, MPO (*medial preoptic nuclei*)] ou non de la barrière

hématoencéphalique (OVLT, SFO, AP) (261-263). Le récepteur AT1 est aussi détecté dans les régions impliquées dans le contrôle de la PA (AP, NTS, PVN, MPO, RVML) (Figure 1-3). Du NTS, partent les fibres des barorécepteurs cardiaques qui se terminent au niveau du sinus carotidien. Une chute de la PA est ressentie par ces barorécepteurs qui transmettent les signaux directement au système nerveux central. Le NTS transmet alors les signaux au RVML qui déclenche l'activation du système nerveux sympathique. Le récepteur AT1 est aussi présent dans l'hypophyse antérieure où il est impliqué dans la libération, entre autres, de l'ACTH. Il n'y a pas de récepteur AT1 dans l'hypophyse postérieure mais il est innervé par les neurones du PVN et du SON qui expriment AT1 (264). Chez les rongeurs, les deux sous-types d'AT1 montrent un profil de distribution différent avec l'expression d'ATA très généralisée et celle du récepteur AT1B confinée dans certaines régions dont le SFO, l'OVLT et l'hypophyse antérieure (265). Cette différence de localisation des récepteurs AT1A et AT1B, suggère qu'ils pourraient avoir des fonctions différentes dans le SNC.

Contrairement aux autres organes, les récepteurs AT2 sont exprimés à un niveau équivalent à celui des récepteurs AT1 dans le cerveau (Figure 1-3) (266). Dans certaines régions, ils se superposent aux récepteurs AT1, comme au niveau du PVN et du NTS. Par contre, les récepteurs AT2 se retrouvent dans des régions dépourvues de récepteurs AT1, comme le thalamus (230).

Les sites de liaisons pour l'Ang IV couvrent une plus grande surface du cerveau et sont plus nombreux que ceux des récepteurs AT1 et AT3 combinés (Figure 1-3). Les récepteurs AT4 sont exprimés en grande partie dans des régions dépourvues des récepteurs AT1 et AT2. Ils se retrouvent dans des régions du cerveau associées aux fonctions cognitives dont le cortex, l'hippocampe, et le cervelet (189;264). Le patron d'expression de l'IRAP, identifiée comme étant le récepteur du peptide Ang IV, est identique et se superpose aux sites de liaisons de l'Ang IV radioactive dans le cerveau (36;267).

## ***1.5.2 Les fonctions du système rénine-angiotensine dans le système nerveux central***

### ***1.5.2.1 La régulation de la pression artérielle***

Les premiers résultats, concernant le rôle du SRA dans le SNC, ont été obtenus par des études utilisant des injections i.c.v des peptides angiotensines. L'injection i.c.v d'Ang II induit une augmentation de la PA, tout comme l'infusion systémique d'Ang II mais avec un profil de réponse très différent. En effet, l'augmentation de la PA, après une injection i.c.v d'Ang II, est graduelle et dure plus longtemps que celle due à une infusion systémique d'Ang II (268). Ces résultats sont en accord avec les études qui stipulent que la conversion de l'Ang II en Ang III est nécessaire pour exercer un effet dans le SNC. L'augmentation graduelle et la durabilité de l'effet d'une injection i.c.v d'Ang II pourraient être reliées à la conversion lente de l'Ang II en Ang III au niveau central (232). Les peptides Ang II et Ang III injectés i.c.v ont la même puissance quant au niveau de l'augmentation de la PA provoquée (25 mmHg), alors que l'effet de l'injection i.c.v d'Ang IV est beaucoup plus faible (12 mmHg) (102). L'augmentation de la PA par les peptides angiotensines dans le SNC implique l'activation du système nerveux sympathique et la libération de vasopressine (269). En effet, une sympathectomie centrale (injection i.c.v de 6-hydroxy-dopamine) ou une hypophysectomie atténue considérablement les effets sur la PA résultant d'une injection i.c.v d'Ang II (270-272).

L'implication du SRA du cerveau dans la physiologie et la pathophysiologie de l'HTA est mise en évidence dans des modèles génétiques, transgéniques, ou d'inactivation du SRA. Une augmentation du niveau d'Ang II et des sites de liaison d'Ang II ont été observés dans le cerveau des rats SHR. De plus, l'inactivation centrale des récepteurs AT1, par injection i.c.v d'antagonistes ou d'un antisens contre les récepteurs AT1, réduit considérablement la PA des rats SHR, comparée aux rats contrôles (273;274). L'absence de l'AGT dans le cerveau des rats transgéniques (GFAP-AsAGT) génère une hypotension, une polydipsie et l'incapacité à concentrer l'urine chez ces derniers (237). Si la présence du SRA

central est nécessaire pour maintenir le niveau normal de la PA, elle semble contribuer aussi aux effets néfastes de l'Ang II circulant. En effet, l'absence d'AGT dans le cerveau des rats transgéniques (GFAP-AsAGT) réduit significativement l'augmentation de la PA ( $46.3 \pm 2.5$  versus  $29.2 \pm 4.2$  mmHg) et l'hypertrophie cardiaque (augmentation de la masse cardiaque : 11.1% versus 2.8%), suite à une infusion systémique d'Ang II (275). L'exposition chronique au froid (4 semaines à 5°C) induit une augmentation graduelle de la PA chez des souris. Au niveau du cerveau, cette exposition chronique au froid régule à la hausse l'expression des récepteurs AT1, tout en réduisant celle des récepteurs AT2 (276;277). L'injection i.c.v de losartan ou l'utilisation des souris transgéniques déficientes en AGT réduit significativement l'augmentation de la PA, induite par une exposition chronique au froid (différence de pression :  $61 \pm 5$  versus  $19 \pm 3$  mmHg) (277;278).

Les différents composants du SRA ont été surexprimés dans le SNC et leurs effets sur la PA rapportés. La surexpression de l'ECA humain, dans le cerveau des rats par transfection via un complexe virus-liposome, favorise une augmentation significative d'Ang II dans le cerveau et la libération de la vasopressine. Ces rats sont hypertendus et l'injection i.c.v d'un inhibiteur de l'ECA ou d'un antagoniste de l'AT1 normalise leurs PA (279). La spécificité d'espèce de la réaction rénine-AGT a été mise à profit dans la génération des souris transgéniques pour étudier le SRA central. L'expression de la rénine et de l'AGT a été ciblée dans le cerveau par l'utilisation d'un promoteur glial (GFAP) ou neuronal (Synapsine-I ou SYN). Ces doubles transgéniques (GFAP-hAGT X GFAP-hrénine ou SYN-hAGT x SYN-hrénine) sont légèrement hypertendues (augmentation 15 mmHg) et présentent une polydipsie (280;281). Une réduction significative (40%) de l'osmolalité urinaire a été observée chez les doubles transgéniques surexprimant la rénine et l'AGT humaine dans les neurones (SYN-hAGT x SYN-hrénine) (281). Cette réduction de l'osmolalité urinaire chez ces souris, est toutefois surprenante. Ce phénomène s'observe plutôt lors de l'inactivation du SRA et est relié à une diminution significative du niveau de la vasopressine plasmatique, une hormone à effet antidiurétique (282;283). Malheureusement, les auteurs n'ont pas mesuré le niveau



plasmatique de la vasopressine dans le plasma, ni celle de l'Ang II dans le cerveau. Il se pourrait aussi qu'une production excessive d'Ang II dans le cerveau ait désensibilisé les récepteurs AT1. La surexpression des récepteurs AT1 dans le cerveau, sous le contrôle du promoteur neuronal NSE (neuron-specific enolase), est sans effet sur la PA basale des souris transgéniques (284).

### ***1.5.2.2 La soif et l'appétit pour le sel***

L'effet de l'injection i.c.v des peptides angiotensines, dans la stimulation de la soif, est indépendant du statut hydrique de l'animal. En effet, une injection i.c.v d'Ang II déclenche la soif, même chez les animaux infusés avec de l'eau (285). L'Ang II centrale semble être plus efficace que l'Ang II systémique à provoquer la sensation de soif. En effet, une injection i.c.v de 0.1 pg d'Ang II est suffisante pour stimuler la soif, comparée à une concentration plasmatique de 500 pg/ml nécessaire pour stimuler le même effet (285-287). Deux régions du cerveau dépourvues de barrière hémato-encéphalique sont importantes dans le contrôle de la soif : le SFO et l'OVLT. Une destruction mécanique de ces régions génère une adipsie chez le rat (288). Aussi, la soif stimulée par l'infusion systémique d'Ang I est complètement bloqué par l'injection i.c.v de captopril, un inhibiteur de l'ECA (289;290). En plus de son effet dans le déclenchement de la soif, le SRA central stimule aussi l'appétit pour le sel ou l'ingestion de sodium. L'adrénalectomie déclenche un appétit pour le sel qui est essentiel pour la survie de l'animal afin de compenser la perte d'eau et de sodium provoquée par l'absence de l'aldostérone. Il a été rapporté que l'inhibition des récepteurs AT1 du cerveau réduit significativement (70%) la quantité de solution saline ingérée par des rats ayant subis une adrénalectomie (291). De plus, l'injection i.c.v de la rénine ou de l'Ang II stimule un appétit pour le sel chez le rat, effet qui est inhibé par l'injection i.c.v d'un antagoniste du récepteur AT1 (292;293). Ainsi, la production de l'Ang II et l'activation des récepteurs AT1 dans le SNC occupent une place importante dans la régulation de l'équilibre hydrosodique.

Les récepteurs AT1A et AT1B dans le cerveau sont régulés différemment par la déshydratation ou la natrémie. Les deux stimuli augmentent le niveau des

récepteurs AT1A sans affecter celui des récepteurs AT1B (294;295). En se basant sur ces résultats, l'hypothèse que les récepteurs AT1A puissent être importants dans l'équilibre hydrosodique a été avancée. Par contre les résultats obtenus avec les souris déficientes en AT1A ou en AT1B indiquent plutôt l'implication des récepteurs AT1B dans ce processus. L'inactivation des récepteurs AT1A ou AT1B chez les souris n'affecte pas leurs comportements face à l'eau. Une réduction significative dans la capacité à concentrer leur urine après une restriction hydrique de 24 heures (1038±184 versus 1974±107 mOsm) a été rapportée chez les souris déficientes en AT1A. Cette incapacité à concentrer l'urine semble être secondaire à un défaut de la libération de synthèse ou de libération de la vasopressine; car le niveau plasmatique de la vasopressine n'augmente pas après la période de restriction hydrique (3.3±0.6 à 13.3±4 versus 5.1±0.3 à 6.1±0.7 pg/ml) (283). Des études utilisant l'injection i.c.v d'Ang II chez des souris déficientes en AT1A ou AT1B, suggèrent que les récepteurs AT1A sont importants pour stimuler une réponse hypertensive et les récepteurs AT1B pour déclencher la sensation de soif (296).

### ***1.5.2.3 La différenciation neuronale***

La différenciation de la cellule neuronale se caractérise par la formation de deux types d'extensions cytoplasmiques : l'axone et les dendrites. L'axone est responsable de la transmission de l'influx nerveux et les dendrites, quant à elles, reçoivent et intègrent les informations provenant des autres neurones. Un effet sur la neuritogenèse a été observé dans des cellules neuronales non-différenciées stimulées par l'Ang II. Le même phénomène est obtenu que ce soit par l'utilisation des cultures primaires ou des lignées stables (NG108-15) de cellules neuronales (297;298). Les mécanismes impliqués dans la stimulation de la neuritogenèse par l'Ang II impliquent l'activation de la protéine kinase B et l'augmentation du niveau d'association de la protéine MAP2c (*microtubule associated protein 2c*) et de la tubuline (298). Il existe une divergence quant aux récepteurs de l'Ang II qui sont impliqués dans ce processus de neuritogenèse. L'importance des récepteurs AT1 a été rapportée dans les cultures primaires neuronales. Par contre, au niveau des lignées neuronales stables (NG108-15), ce sont les récepteurs AT2 qui se sont

trouvés impliqués dans ce phénomène. Afin d'évaluer le rôle du SRA central dans le développement neuronal *in vivo*, une analyse histologique comparative des régions du cerveau chez des souris déficientes en AT1A ou AT2, a été réalisée. Une augmentation significative du nombre de cellules a été observée dans toutes les régions du cerveau examinées chez les souris déficientes en AT2 ce qui pourrait résulter d'une réduction de l'apoptose par l'absence des récepteurs AT2 (299). A cet effet, les souris déficientes en AT2 présentent des signes d'anxiété. Ceci a été démontré par une diminution du comportement explorateur de l'animal, lorsque placé dans un nouvel environnement, et aussi, du nombre de défécations (300;301). Un traitement, avec un inhibiteur de l'ECA (captopril) ou un antagoniste des récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques (prazosin), élimine l'anxiété chez les souris déficientes en AT2 (301). Aussi, les souris déficientes en AT2 présentent une diminution de l'expression des récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques dans le cerveau, probablement secondaire à une production excessive de norépinephrine stimulée par les récepteurs AT1, en absence d'une contre-régulation par les récepteurs AT2. L'importance du SRA dans le développement cérébral vient d'être mise de l'avant avec l'identification d'une mutation ou l'absence du récepteur AT2 chez des patients souffrant d'une forme de retard mental relié au chromosome X (302).

#### ***1.5.2.4 La barrière hémato-encéphalique***

L'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique est assurée par les cellules gliales, plus nombreuses que les cellules neuronales. Dans de ce groupe de cellules, on retrouve les astrocytes, caractérisées par leurs formes étoilées et l'expression de la protéine GFAP (glial fibrillary acid protein). L'expression de GFAP est importante pour la fonction des astrocytes, car les souris déficientes en AGT présentent des défauts de structure et de fonction de leur barrière hémato-encéphalique. Étant donné que les astrocytes sont les sites principaux de synthèse de l'AGT, des études ont été réalisées afin d'évaluer le rôle de l'AGT dans ces cellules. Ces études ont évalué la capacité des souris déficientes en AGT à réparer leur barrière hémato-encéphalique après une destruction mécanique par le froid. Les souris déficientes en AGT ont été incapables de réparer leur barrière hémato-encéphalique, ceci étant

évalué par la quantité de bleue d'Evans présent dans le cerveau après une infusion de ce dernier, dans le péritoine (303). L'augmentation de l'expression de GFAP, dans les astrocytes des souris déficientes en AGT, après l'injure est très faible par rapport aux souris contrôles. Ainsi, l'AGT serait important pour l'expression de la protéine GFAP dans les astrocytes réactives. En accord avec cette hypothèse, l'AGT a été récemment localisé dans le noyau des astrocytes, où il pourrait stimuler l'expression de GFAP (304). L'injection d'Ang II ou d'Ang IV dans le péritoine permet aux souris déficientes en AGT de réparer leur barrière hémato-encéphalique. Par contre, l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs AT1 ou AT2 n'élimine pas les effets de ces peptides angiotensines (304). Il est possible que les effets des peptides Ang II et Ang IV sur la réparation de la barrière hémato-encéphalique soient stimulés par l'activation des récepteurs AT4. Malheureusement, l'effet de l'antagoniste du récepteur AT4, le divalinal, ne fut pas évalué au cours de cette étude. De façon surprenante, les souris déficientes en rénine n'ont pas cette incapacité à réparer leur barrière hémato-encéphalique, comme il a été observé chez les souris déficientes en AGT (305). Cette étude ne cadre pas avec le fait que les peptides Ang II et Ang IV annule le déficit lors de la réparation de la barrière hémato-encéphalique chez les souris déficientes en AGT. Ces résultats relancent le débat concernant le rôle de la rénine dans la synthèse de l'Ang I dans le SNC.

#### ***1.5.2.5 L'adaptation au stress***

Les facteurs de stress peuvent être classés en deux catégories : la première catégorie regroupe les facteurs de stress environnementaux, comme une exposition chronique au froid ou une immobilisation; la deuxième catégorie englobe les facteurs de stress d'ordre systémique, comme une privation d'eau ou un changement dans la natrémie (hypo- ou hypernatrémie). Ces deux catégories de stress agissent sur l'activité du SRA central en modulant l'expression des récepteurs AT1 et non AT2. Comme on l'a déjà décrit précédemment (section 1.5.2.2), les facteurs de stress systémique augmentent significativement le niveau des récepteurs AT1A sans affecter celui des récepteurs AT1B dans le cerveau. La modulation de l'expression des récepteurs AT1 dans le cerveau par un stress environnemental varie en fonction

des régions du cerveau et de la durée du stress. Ainsi, un stress aigu (regroupement, immobilisation) induit une augmentation de l'expression des récepteurs AT1A seulement au niveau du PVN, alors qu'un stress chronique (transport, immobilisation chronique) augmente le niveau des récepteurs AT1 dans la ME et dans le SFO. Au niveau de l'hypophyse antérieure, un stress aigu augmente l'expression des récepteurs AT1A tout en diminuant celle des récepteurs AT1B, alors qu'un stress chronique n'affecte pas l'expression des récepteurs AT1B, mais augmente l'expression des récepteurs AT1A (306;307).

La modulation des récepteurs AT1, par le stress, est circonscrite au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire, dont l'implication est connue dans ce processus. Le stress stimule la libération de l'hormone CRF (corticotropin-releasing factor) par les cellules du PVN au niveau de l'hypothalamus. Le CRF agit au niveau de l'hypophyse antérieure pour stimuler la libération de l'ACTH. L'ACTH contribue à la libération des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes par la surrénale. Ces derniers agissent comme stimulateurs et inhibiteurs de l'axe hypothalamo-hypophysaire respectivement. À cet effet, le niveau plasmatique d'ACTH et urinaire de corticostérone est augmenté chez le rat après l'application d'un stress aigu (308). Un prétraitement, par l'infusion chronique sous-cutanée de candesartan par une pompe osmotique deux semaines avant l'application du stress, prévient l'augmentation des récepteurs AT1 dans le cerveau et la libération des hormones (308). L'importance du SRA dans les dommages qui peuvent être causés aux organes par un stress a été mise en évidence dans le modèle des animaux ayant des ulcères gastriques. L'immobilisation de la souris dans le froid (4°C), pour une période de 2 heures, provoque un stress chez l'animal associé à une réduction importante du flux sanguin gastrique. Cette réduction du flux sanguin gastrique occasionne des lésions au niveau de la muqueuse gastrique. Un prétraitement par le candesartan sur une période de deux semaines augmente le flux sanguin gastrique de près de 50% et réduit de 80% les ulcérations présentes dans la muqueuse gastrique (309). Ainsi, l'utilisation des inhibiteurs du SRA pourrait être appropriée dans les cas de stress chronique afin de prévenir les dommages aux organes.

### ***1.5.2.6 Les processus de mémorisation et d'apprentissage***

L'Ang IV est reconnue pour son rôle dans la stimulation des processus de mémorisation et d'apprentissage, une fonction qui concorde bien avec la localisation de ses récepteurs dans le cerveau au niveau de l'hippocampe et du cervelet (Figure 1-3). Une perforation ciblée de l'hippocampe, ou l'inhibition des récepteurs muscariniques dans le cerveau, chez le rat entraîne une réduction de la mémoire et un déficit dans l'apprentissage, ceci étant révélé par différents tests (310;311). L'injection i.c.v d'Ang IV restaure la mémoire et corrige le déficit dans l'apprentissage chez ces rats. L'effet de l'Ang IV sur la facilitation des processus de mémorisation et d'apprentissage est spécifique à l'activation des récepteurs AT4, car cet effet est éliminé par l'injection i.c.v d'un antagoniste des récepteurs AT4 (divalinal) et non par celui des récepteurs AT1 ou AT2 (105). En accord avec le rôle de l'Ang IV dans les fonctions cognitives, une augmentation du flux sanguin cérébral déclenchée via la stimulation des récepteurs AT4 est observée par l'infusion de l'Ang IV, au niveau de l'artère cérébrale chez le rat (108;109). La libération de l'acétylcholine est un processus important dans la stimulation de la mémoire; des sites de liaisons pour l'Ang IV ont été identifiés dans des régions contenant les corps cholinergiques ou leurs terminaux, comme au niveau de l'hippocampe. Bien que l'Ang IV ne stimule pas directement la libération de l'acétylcholine, il potentialise son effet sur la dépolarisation, de façon dose-dépendante (312). Les mécanismes par lesquels l'Ang IV stimule les fonctions cognitives ne sont pas encore connus et font l'objet d'intenses études de recherche.

### ***1.5.2.7 Les maladies neurodégénératives***

L'Alzheimer et le Parkinson sont deux maladies neurodégénératives très fréquente dans le groupe d'âge des 65 ans et plus. Les symptômes de ces maladies sont différents; l'Alzheimer est associée à une perte de mémoire, tandis que la maladie Parkinson affecte les fonctions motrices. L'activité du SRA central est perturbée lors de ces maladies. Une régulation différentielle des récepteurs AT1 et AT2 a été rapportée. L'expression des récepteurs AT1 et AT2 est réduite de façon

significative ( $\approx 70\%$ ) au niveau de la substance noire dans les cas de Parkinson, tandis qu'une augmentation fulgurante des récepteurs AT<sub>2</sub> ( $\approx 200\%$ ) est détectée dans le cortex dans les cas d'Alzheimer (313). De même, une réduction significative de l'activité de l'ECA est observée dans le liquide céphalo-rachidien des personnes atteintes (314). Ces résultats ont dirigé les études vers la recherche d'un lien entre les polymorphismes de l'ECA et les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Il n'y a pas encore de consensus sur ce sujet, car les résultats obtenus sont contradictoires et varient en fonction du sexe et de la population étudiée (315-317). Par contre, des modèles cellulaires ou animaux suggèrent un rôle actif de l'ECA dans ces maladies neurodégénératives. En effet l'utilisation de captopril retarde la dégénération des neurones dopaminergiques et réduit le stress oxydatif dans un modèle animal de Parkinson généré par injection i.c.v de 6-hydroxy-dopamine (318). L'accumulation de la protéine  $\beta$ -amyloïde dans les cellules neuronales est une des caractéristiques de l'Alzheimer. Dans des modèles cellulaires la présence de l'ECA augmente la dégradation de la protéine  $\beta$ -amyloïde et réduit la toxicité cellulaire associée à sa surexpression (319;320). De ces résultats ressort l'importance de réaliser des études de causalité entre l'utilisation des inhibiteurs de l'ECA et l'apparition ou la progression de l'Alzheimer.

Comme nous venons de le décrire les fonctions du SRA central sont multiples et ne sont pas simplement confinées dans le contrôle hémodynamique. Les modèles de délétions génétiques des différents composants du SRA ainsi que des modèles de culture cellulaire ont été tous très utiles dans la mise en évidence des effets du SRA dans le SNC. Par contre, pour mieux comprendre l'implication physiologique du SRA central il va falloir développer des modèles animaux plus spécifiques où le SRA serait inactivé ou suractivé uniquement dans le cerveau

## **1.6 Les effets de l'inactivation des gènes du SRA sur le développement rénal**

Le lien entre le SRA et le développement rénal fut suggéré après que plusieurs cas de fœtopathies furent rapportés chez des femmes enceintes

hypertendues traitées au captopril (un inhibiteur de l'ECA) (321-323). Un point commun fut trouvé chez ces fœtus : la présence d'anomalies rénales se caractérisant par une anurie, de l'hydronéphrose et, parfois, une absence de développement complète des reins (321-323). De ces observations a découlé l'hypothèse que le SRA est important pour le développement normal des reins. La néphrogenèse résulte de l'interaction réciproque entre le bourgeon urétéral, précurseur de l'urètre et des tubules collecteurs, et le blastème métanéphrique formé de cellules mésenchymateuses qui sous l'induction du bourgeon forment les glomérules. Les composants du SRA ont été identifiés tant au niveau du bourgeon urétéral que dans le blastème métanéphrique (324-327). L'inactivation pharmacologique ou certaines délétions génétiques du SRA chez les rongeurs (rats et souris) entraîne l'apparition d'anomalies rénales identiques à celles qui sont provoquées par l'inhibition du SRA chez les fœtus humains (328;329). Tous les gènes du SRA ont été inactivés chez la souris et leurs effets sur le développement rénal répertoriés (Tableau 1-II) (300;330-333). De l'analyse des phénotypes obtenus par ces délétions, il ressort que la présence de l'Ang II et des récepteurs AT1 sont requises pour le développement normal des reins. Par contre, une inactivation simultanée des récepteurs AT1A et AT1B est nécessaire pour voir apparaître les anomalies rénales chez la souris. Ces résultats indiquent que la fonction des récepteurs AT1A et AT1B est redondante dans la néphrogenèse (333).

Les souris déficientes en AGT naissent selon le nombre attendu (lois de Mendel) et ne présentent aucune anomalie rénale à la naissance; ces dernières n'apparaissent que trois semaines plus tard (330). Une létalité, au cours de la période néonatale, a été associée à l'inactivation de l'AGT chez la souche C57BL/6 et non pas chez la souche FVB/N (330;334). Ainsi, la létalité semble être un phénomène relié à la souche de souris et non une conséquence directe de l'absence de l'AGT. L'analyse histologique des reins de souris déficientes en AGT, âgées de trois semaines ou plus, révèle plusieurs anomalies structurales comme une atrophie des papilles rénales, un épaississement des artères interlobulaires, des kystes, et finalement une hydronéphrose sévère (330). De plus, ces souris sont hypotendues (20-30 mmHg), elles présentent une polydipsie et une polyurie accompagnée d'un



Tableau 1-II. Les effets de l'inactivation des différents gènes du SRA sur la pression artérielle et les reins

Délétions Phénotypes	AGT	Ren1c	ECA	AT1A	AT1B	AT1A AT1B	AT2
Hypotension (mmHg)	P 20-30	P 30	P 37	P 22	A	P 27-34	A/P 20
Anomalies rénales	P	P	P	A	A	P	A
Incapacité à concentrer l'urine	P	P	P	A	A	P	A

P : phénotype présent; A : phénotype absent

Ren1c : rénine chez la souche de souris avec un seul gène de rénine

ECA : absence d'ECA dans la circulation et dans les testicules

AGT : angiotensinogène

déficit dans la capacité de concentrer l'urine (Tableau II) (330;335). Les phénotypes observés chez les souris déficientes en AGT se retrouvent aussi chez celles déficientes soit en rénine, en ECA ou en AT1A-AT1B. Chez les souches ayant deux gènes de rénine (Ren1 et Ren2), une délétion de l'un des deux gènes n'a aucun effet sur le développement des reins, suggérant une complémentarité d'effet entre ces deux gènes de rénine (51;336). Ces différentes inactivations des gènes du SRA ont permis de confirmer l'importance de ces derniers dans la néphrogenèse, mais elles ne permettent pas de dissocier les effets résultants de l'absence du SRA circulant de ceux du SRA tissulaire.

### ***1.6.1 L'effet du SRA dans le développement rénal est-il direct ou indirect ?***

Le rôle principal du SRA étant de maintenir constant la PA, on pouvait supposer que son effet dans le développement rénal s'exerçait par un contrôle hémodynamique. Une hypotension n'est pas toujours associée aux anomalies rénales, car les souris déficientes en AT1A ont des reins normaux, en dépit qu'elles soient hypotendues (Tableau 1-II) (337). Il y a des évidences expérimentales qui sont en faveur d'un rôle indirect du SRA dans le développement rénal. Les récepteurs AT1B ne sont pas exprimés dans les reins et ceci est confirmé par l'absence de liaison de l'Ang II radioactive sur les coupes de reins provenant des souris déficientes en AT1A (137;337). Une double inactivation des récepteurs AT1A et AT1B est nécessaire pour déclencher les malformations rénales chez la souris. Comment expliquer le fait que les reins des souris déficientes en AT1A soient normaux alors qu'ils n'expriment pas de récepteur AT1B? Ceci pourrait s'expliquer par une action indirecte du SRA dans le développement des reins par l'intermédiaire de l'un des tissus qui expriment les deux récepteurs.

La disparité dans l'expression tissulaire des deux sous-types du récepteur AT1 est mise à profit et permet de limiter les organes candidats pour le centre d'action du SRA dans le développement rénal. Comme il a déjà été mentionné, l'expression du récepteur AT1A est généralisée dans tout l'organisme et celle

d'AT1B est plus restreinte. Chez la souris, trois organes expriment le récepteur AT1B, le cerveau, la surrénale et les testicules (137). Les testicules ne peuvent pas être considérés comme candidat, car les souris femelles présentent aussi des problèmes de malformations rénales par l'inactivation du SRA. Nous proposons comme hypothèse que le rôle du SRA dans le développement rénal est indirect en passant par le cerveau et/ou les surrénales.

## 1.7 Objectif de cette étude

La technique d'injection des peptides angiotensines dans les ventricules cérébraux est une méthode très utilisée pour étudier les effets reliés à l'activation du SRA central. Cette technique, bien que très utile, présente toutefois quelques faiblesses. Lors de l'injection des peptides angiotensines dans les ventricules cérébraux, même si la concentration du peptide dans la solution d'injection est faible au site d'injection, elle dépasse de loin le niveau physiologique. De plus, cette technique ne permet d'observer que les effets transitoires résultants d'une injection aiguë des peptides angiotensines dans le cerveau. L'autre méthode couramment utilisée pour contourner ces problèmes est la génération des souris transgéniques surexprimant les composants du SRA dans le cerveau. Le SRA est composé d'une cascade de réactions enzymatiques générant différents peptides angiotensines; il est impossible de contrôler la surexpression d'un peptide en particulier avec cette approche. Les modèles de souris transgéniques avec une suractivation du SRA central ont été générés en surexprimant la rénine et l'AGT humain dans le cerveau (280;281;338). Bien que les auteurs aient démontré que les effets obtenus chez ces souris, comme l'augmentation de la PA, peuvent être inhibés par des antagonistes du récepteur AT1, cela ne suffit pas pour relier l'effet observé à la production d'Ang II. En effet, il a été démontré, qu'en plus de l'Ang II, d'autres peptides angiotensines comme l'Ang III et l'Ang IV peuvent eux aussi activer le récepteur AT1 (98;102;339).

*Notre hypothèse est que la production chronique des peptides angiotensines, dans le cerveau des souris transgéniques, serait un meilleur modèle que les méthodes d'injections aiguës et de surexpression pour identifier leurs effets dans le SNC.*

Il existe des évidences expérimentales supportant le rôle de l'Ang II et des récepteurs AT1 du cerveau dans le contrôle de la PA. À titre d'exemple, l'injection i.c.v des antagonistes des récepteurs AT1 prévient l'augmentation de la PA chez les rats spontanément hypertendus (273;274). Le cerveau est un tissu riche en aminopeptidases, ce qui contribue à accélérer le métabolisme de l'Ang II en Ang III et Ang IV (Figure 1.2). De plus, l'existence des récepteurs de l'Ang IV, AT4, dans des régions du cerveau dépourvues de récepteurs AT1 et AT2 suggère que ce peptide pourrait avoir des fonctions physiologiques, dans le cerveau, qui seraient non reliées au contrôle hémodynamique.

Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier les effets d'une production chronique des peptides Ang II ou Ang IV dans le cerveau en utilisant des souris transgéniques. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'effet de la restitution de l'Ang II dans le cerveau des souris déficientes en AGT sur les phénotypes observés chez ces dernières.

L'approche que nous avons utilisée consiste à libérer le peptide angiotensine d'intérêt dans le cerveau par l'intermédiaire d'une protéine de fusion sans l'intervention du SRA endogène. L'expression de cette protéine de fusion est ciblée vers les astrocytes du cerveau par le promoteur glial GFAP. Cette protéine de fusion contient un peptide signal qui la dirige dans la voie de sécrétion où une protéase ubiquitaire, la furine, reconnaît son site de clivage placé en amont de l'extrémité N-terminale du peptide angiotensine (Figure 2.1). Une cellule qui exprime cette protéine de fusion relâche en continue le peptide angiotensine, d'où le nom de pompe biologique qui lui a été associé (340).

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés sous forme d'articles. Le chapitre 2 traite de la surexpression de la protéine de fusion libérant

l'Ang II dans le cerveau des souris transgéniques sous le contrôle du promoteur GFAP. Cette méthode a été également utilisée afin de restituer l'Ang II dans le cerveau des souris déficientes en AGT pour ensuite étudier les effets sur les phénotypes associés à l'inactivation du SRA, comme l'hypotension et les anomalies rénales. Le chapitre 3 décrit la caractérisation des souris transgéniques surexprimant la protéine de fusion qui libère le peptide Ang IV dans le cerveau, sous le contrôle du même promoteur, permettant la comparaison des effets dus à l'Ang II et l'Ang IV dans le système nerveux central.

## **Chapitre 2**

### **Brain-specific restoration of angiotensin II corrects renal defects seen in angiotensinogen-deficient mice**

Nadheige Lochard, David W. Silversides, Jorge P. van Kats,  
Chantal Mercure, Timothy L. Reudelhuber

Journal of Biological Chemistry 2003; 278(4): 2184-2189

Dans l'article qui suit, le Dr David W. Silversides a généré les souris transgéniques à partir des vecteurs d'expression que nous lui avons fournis. Le Dr Jorge P. van Kats a généré une lignée de souris transgéniques (2C) que nous avons utilisée à des fins de comparaisons. Madame Chantal Mercure, une technicienne au laboratoire, nous a fourni une assistance technique pour la construction des vecteurs d'expression. Les autres expériences présentées dans cet article ainsi que la rédaction du manuscrit ont été réalisées par le premier auteur sous la direction du Dr Timothy Reudelhuber.

## ABSTRACT

Mice deficient for angiotensinogen (AGT), or other components of the renin-angiotensin system, show a high rate of neonatal mortality correlated with severe renal abnormalities including hydronephrosis, hypertrophy of renal arteries and an impaired ability to concentrate urine. Although transgenic replacement of systemic or adipose, but not renal, in AGT-deficient mice has previously been reported to correct some of these renal abnormalities, the tissue target for this complementation has not been defined. In the current study, we have used a novel transgenic strategy to restore the peptide product of the renin-angiotensin system, angiotensin II, exclusively in the brain of AGT-deficient mice and demonstrate that brain-specific angiotensin II can correct the hydronephrosis and partially correct renal dysfunction seen in AGT-deficient mice. Taken together, these results suggest that the renin-angiotensin system affects renal development and function through systemically accessible targets in the brain.



## INTRODUCTION

The renin-angiotensin system (RAS) plays a critical role in the regulation of blood pressure and volume homeostasis in mammals. The main effector of the RAS is the octapeptide hormone angiotensin II (Ang II) produced by the successive enzymatic cleavage of the hepatic glycoprotein angiotensinogen (AGT) by kidney-derived renin and angiotensin-converting enzyme (ACE), a metalloprotease located at the surface of endothelial cells (1). Although Ang II acts through two receptors, type I and type II (AT1 and AT2, respectively), all of the known cardiovascular effects of Ang II are mediated by the AT1 receptor. In addition to this circulating RAS, the mRNA and protein for all of the RAS components have been identified in different tissues as brain, heart, adrenal gland, reproductive organs and kidney (review in Ref. 2), leading to the suggestion that tissue RAS (tRAS) might mediate cardiovascular and other functions within tissue sites.

Inactivation of the RAS during development either by pharmacological inhibition or gene ablation also causes severe anomalies in the neonatal kidney, leading to hydronephrosis and impaired urine concentration (3). In humans, inhibition of the RAS during pregnancy is associated by a high rate of spontaneous abortion and in some strains of mice with a high rate of mortality in the first 3-5 weeks of life (4-8). In an effort to understand the mechanisms that implicate the RAS in renal development, all of the genes coding for the components of the RAS from AGT to the angiotensin receptors have been disrupted in mice (9-15). Although these results confirm that Ang II acting through the AT1 receptor is required for normal renal development, renal defects in mouse pups are only observed when both of the two AT1 isoforms present in mice (AT1A and AT1B (16-18)) are inactivated, leading to the suggestion that each isoform can compensate in the absence of the other in the target tissue (19). Because only limited tissues, including the brain, adrenal gland and testis, express both the AT1 receptor isoforms in mice, it is possible that the effects of the RAS on renal development are mediated through one of these non-renal tissues. Supporting this hypothesis specific

restoration of AGT in the circulation by targeting adipocytes (20) or multi-tissue restoration of AGT by using the ubiquitously expressed metallothionein promoter (21) or the native angiotensinogen promoter (22) prevents kidney abnormalities seen in AGT<sup>-/-</sup> mice whereas targeted restoration of AGT only in the kidney of these animals does not prevent the renal anomalies (8). In the current study, we have used a novel transgenic strategy to directly address the ability of brain Ang II to correct the renal anomalies in AGT<sup>-/-</sup> mice and have compared these results to those obtained when Ang II is specifically restored in the circulation of these mice.

## MATERIALS AND METHODS

### Generation of Transgenic and Angiotensinogen Knockout Mice

The expression vector used for releasing Ang II is shown in Figure 1 and the details of its construction have been described previously (23). Briefly, the signal peptide of human prorenin was linked to a fragment of the heavy chain constant region of IgG2b mouse immunoglobulin lacking the BIP binding, hinge and intermolecular disulfide bridge regions. This domain is followed by a portion of the human prorenin prosegment which includes a consensus cleavage site (RVRTKR) for furin, a ubiquitous protease, immediately linked to the human angiotensin II (Ang II) peptide sequence. This fusion protein coding sequence was placed downstream of a 2.2kb fragment of the human glial fibrillary acidic protein promoter (hGFAP), which targets expression to astrocytes of transgenic mice (24). The transgene was excised from the plasmid vector and coinjected with a tyrosinase gene for pigmentation marking in the pronucleus of fertilized eggs from FVB/N mice as previously described (25). The resulting transgenic founder lines were called GFAP-AngII. Generation and characterization of transgenic mice with cardiac-specific expression of frog skin Ang II (fsAng II, 2C) has been described previously (26).

Knockout mice for angiotensinogen (AGT<sup>-/-</sup>, a gift from Drs. Kim and Smithies, University of North Carolina Chapel Hill, NC) were crossed from the original C57BL/6 strain onto the FVB/N background for 10 generations to generate AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice. GFAP-Ang II or fsAngII 2C transgenic mice were crossed into the AGT<sup>-/-</sup>(FVB) background. All mice were used at 12-16 weeks of age unless otherwise specified. The animal protection committee of the Clinical Research Institute of Montreal approved all animal protocols.

## Transgene Expression Analysis in GFAP-Ang II Mice

Total RNA from brain or other tissues was prepared by the guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform method (25) and RNase protection assays were performed as described previously (27) with minor modifications. Labeled RNA probes corresponding to the transgene or to histone H4 (an internal control for RNA loading) were synthesized in presence of the  $^{32}\text{P}$ -CTP (Amersham Pharmacia biotech). Total RNA (10  $\mu\text{g}$ ) from tissue samples was hybridized with a mixture of the labeled probes ( $6 \times 10^3$  counts $\cdot\text{min}^{-1}$   $\text{ml}^{-1}$ ).

The distribution of transgene expression in brain was assessed by in situ hybridization as described previously (28). Briefly, mice were killed by decapitation and brains were removed and quickly embedded in OCT and frozen in isopentane at  $-30^\circ\text{C}$ . Serial frozen sections (10  $\mu\text{m}$  thick) were cut by cryostat at  $-20^\circ\text{C}$  and thaw-mounted on Superfrost slides (Fisher). Tissue sections were fixed for 1 h in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) and followed by a 10 min wash in a buffer containing 0.1 M triethanolamine, 0.1M acetic acid glacial and 0.02 M acetic anhydride. Ribonucleotide probes corresponding to the transgene were synthesized by in vitro transcription in the presence of [ $^{35}\text{S}$ ]-UTP and [ $^{35}\text{S}$ ]-CTP. The labeled probes ( $8 \times 10^7$  counts $\cdot\text{min}^{-1}$   $\text{ml}^{-1}$ ) were hybridized overnight at  $55^\circ\text{C}$ . Non-hybridized probes were digested by incubation in RNase A solution (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of RNase A in 1 X SSC) and the slides were extensively washed and dipped in photographic emulsion (Kodak NTB-2). Slides were exposed for 6 days and developed in Kodak D19 solution.

## Characterization of GFAP-Ang II Mice

The levels of Ang II in brain, tissues and plasma were determined by radioimmunoassay (RIA) (29). Ang II in tissue or plasma was obtained by acid/alcohol extraction (80% ethanol, 0.1M HCl) and purified on Sep-Pak hydrophobic C18 cartridges (Waters, Milford, MA). The peptides were eluted with ethanol and lyophilized peptides were quantified by RIA using a polyclonal rabbit

antibody, which has 100% cross-reactivity with Ang II (angiotensin 1-8), Ang III (angiotensin 2-8) and Ang IV (angiotensin 3-8) but no reactivity with Ang I (angiotensin 1-10) (29). To determine the form of angiotensin peptides released by the fusion protein in brain, whole brain acid/alcohol extracts from three mice were pooled and fractionated by reverse-phase HPLC and elution fractions were lyophilized and subjected to RIA using an antibody specific for Ang II and its metabolites (26, 29).

Plasma renin activity was determined as described previously (26). Briefly blood (5 drops) was obtained by orbital puncture of mice under light ether anesthesia in cold tubes containing 25  $\mu$ l of 0.5 M EDTA (pH 8.0). Blood was immediately centrifuged and the plasma was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the assay was performed. Plasma renin activity was determined by an Ang I generation assay in presence of excess angiotensinogen substrate from sheep (26). The resulting Ang I was measured by RIA using antibody specific for Ang I.

### **Physiological measurements**

Systolic blood pressure (BP) was measured by tail-cuff plethysmography (BP-200 system, Visitech Systems, Apex, NC). Mice were trained for 7 days and BP was recorded for an additional 3 days. After the initial 10 days of BP recording, some mice were treated with an ACE inhibitor (Captopril, Sigma) at 100 mg/kg/day by intraperitoneal injection in 0.9% NaCl or an angiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonist (Candesartan, a gift from Astra-Zeneca) 15 mg/kg/day by gavage for a further 5 days or 3 days while measuring BP during the treatment.

For determination of water intake and urine output, animals were placed in metabolic cages with free access to water and food. After a 24 h adaptation period, water intake and urine output volume were measured for three consecutive days. Urine and plasma osmolality were determined by the freezing-point depression method ( $\mu$ Osmette, Precision Systems). Water bottles were removed for 24 h, and

urine volume and osmolality were again measured to evaluate the capacity of the mice to concentrate urine when faced with dehydration.

## **Histology**

Animals were killed by CO<sub>2</sub> inhalation, and the kidneys were fixed in Bouin's fixative and embedded in paraffin. Serial cuts (5 μm) were prepared and stained with either Sirius red or hematoxylin/eosin for morphological analysis by standard techniques.

## **Statistical Analysis**

Results are expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA with Dunnett's post test or unpaired t test was performed using GraphPad Prism version 3.00 for windows (Graph Pad Software, San Diego, California USA)

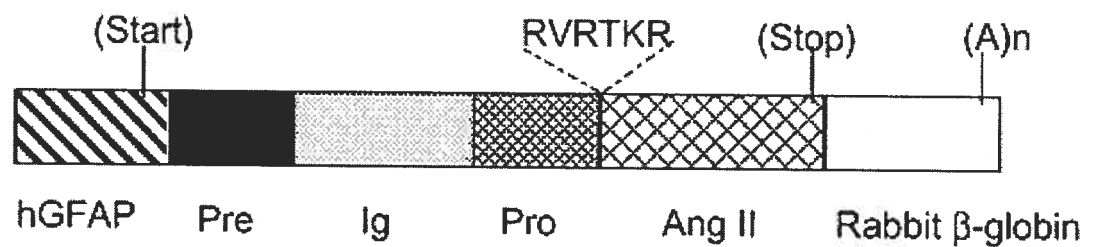
## RESULTS

### Transgene Expression

A fusion protein capable of releasing Ang II into the secretory pathway of expressing cells was placed under the control of the human GFAP promoter (Figure 2.1) to drive over-production of Ang II specifically in the brain of transgenic mice. Six founder lines were obtained and the tissue distribution of transgene expression in the brain was determined by RNase protection and in situ hybridization. Three lines (GFAP58.8, GFAP58.5, and GFAP58.2) were found to express the transgene (Figure 2.2A) at different levels in brain. Line GFAP58.8 (which had the highest expression level in the brain and was used for most of the experiments in this study) was found to express the transgene exclusively in the brain (Figure 2.2B) and in situ hybridization demonstrated that this expression was evenly distributed throughout the entire brain (Figure 2.2C). Notably, expression of the fusion protein had no effect on the pattern of expression of the endogenous GFAP gene (data not shown).

### Dosage and characterization of Ang II in brain of GFAP-Ang II transgenic mice

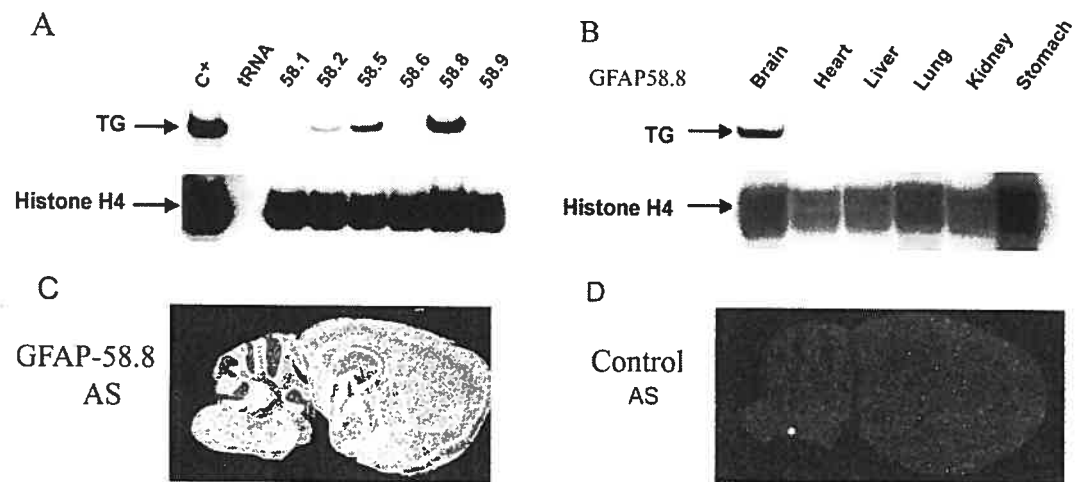
Angiotensin peptides were extracted from various tissues and plasma from line GFAP58.8 by acid/ethanol extraction and quantitated by radioimmunoassay. The results show that brain Ang II was increased by 3 to 7-fold in the transgene-expressing lines as compared with non-transgenic littermates (Figure 2.3A), and Ang II production in the brain of each line was roughly proportional to the level of transgene expression (Figure 2.2A). Measurement of the levels of Ang II in various tissues of line GFAP58.8 confirmed that Ang II production was only increased in the brain of this line as we could not detect any increase of Ang II content in non-brain tissues tested (Figure 2.3B). Importantly, we were also unable to detect any increase



**Figure 2-1. Diagram of the vector used to release Ang II in the brains of transgenic mice.**

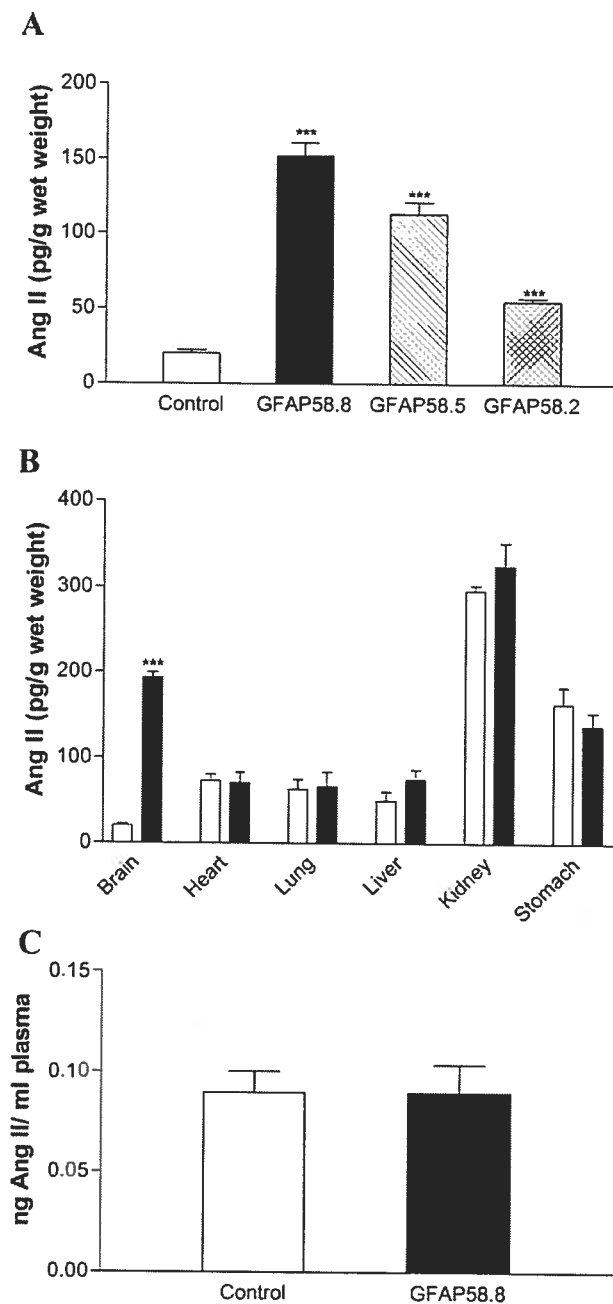
A 2.2 Kb fragment of the human GFAP (*hGFAP*) promoter was used to drive expression of a fusion protein comprised of a signal peptide sequence (Pre), a fragment of the heavy chain constant region of mouse immunoglobulin IgG2b (Ig), a human prorenin prosegment as molecular spacer (Pro) containing the furin cleavage site (RVRTKR) followed by the sequence encoding Ang II peptide (Ang II). The coding sequence for Ang II is followed by an intron and polyadenylation signal from rabbit  $\beta$ -globin.





**Figure 2-2. Transgene expression analysis in GFAP-Ang II mice.**

An RNase protection assay was performed on total RNA from brain (A) or non-brain tissues from line GFAP58.8 (B) TG: expected size of the protected transgene mRNA. Histone H4, expected size for the histone internal control mRNA; tRNA, negative control; C<sup>+</sup>, mRNA from GH4 cells transfected with the vector in figure 1 (10  $\mu$ g RNA by lane). In situ hybridization on brain sections from line GFAP58.8 (C) or non-transgenic control mice (D) with an antisense transgene probe (AS).



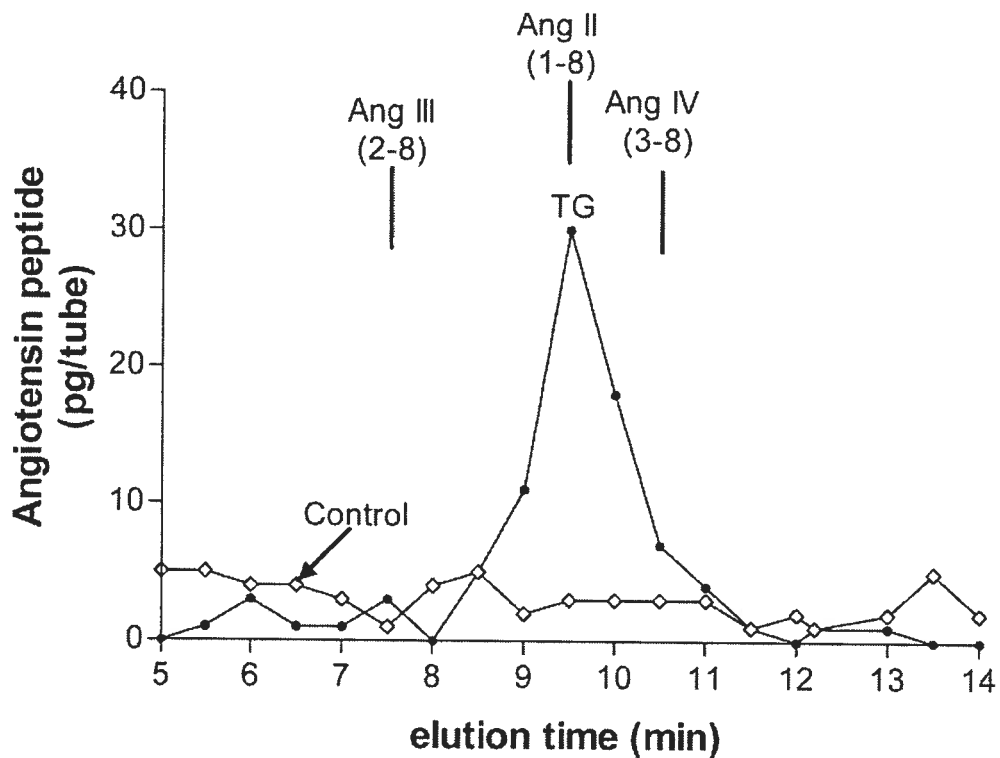
**Figure 2-3. Level of Ang II in tissues and plasma of GFAP-Ang II mice.**

Angiotensin peptides were extracted from brain of the three founder lines of mice (A), tissues (B), or plasma (C) from line GFAP58.8 mice (solid bars) or control (open bars) and subjected to RIA using an antibody specific to Ang II and its metabolites;  $n \geq 4$ . Values are expressed as means  $\pm$  SEM; \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control.

in circulating Ang II in the plasma of GFAP-Ang II mice as compared with control littermates, suggesting that the Ang II being produced in the brain of the transgenic animals is not spilling over into their circulation (Figure 2.3C). To confirm this finding, we measured plasma renin activity, a sensitive indicator of circulating Ang II levels, because renin secretion from the kidney is potently suppressed by increases in circulating Ang II. Notably, GFAP58.8 mice actually show a slight increase in PRA (GFAP58.8  $1721 \pm 404$  and non-transgenic  $1193 \pm 185$  ng Ang I/ml/h,  $P < 0.05$ ), supporting the conclusion that these animals do not liberate brain-derived Ang II into the circulation. Because the brain is rich in aminopeptidases that can break down Ang II to less active metabolites (30, 31), we investigated the form of Ang II contained in the brain of line GFAP58.8 by RIA-coupled HPLC of whole brain acid/alcohol extracts. The results clearly demonstrate that the majority of the peptide extracted from the brain of GFAP58.8 mice migrates as bona fide Ang II (Figure 2.4).

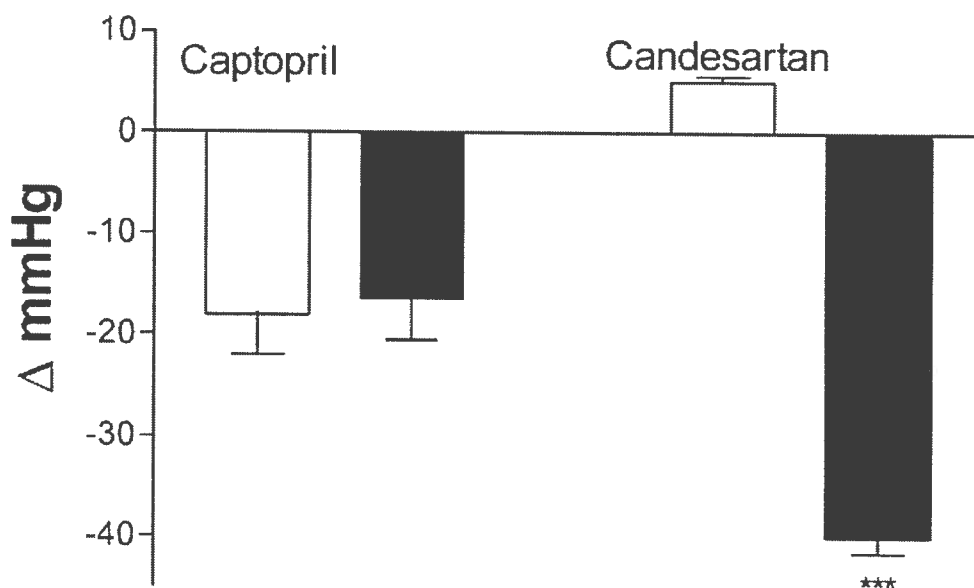
### **Blood Pressure Measurement of GFAP-Ang II Mice**

To determine the effect of increased in brain Ang II on cardiovascular functions, systolic BP was measured by the non-invasive tail-cuff method (32). We found that the BP was significantly increased in the transgenic mice (GFAP58.8,  $150 \pm 12$ ; control,  $123 \pm 6$  mmHg;  $P < 0.001$ ). Despite the differences observed in the levels of Ang II in brain of the three transgenic lines we characterized, there was no significant difference in the degree of hypertension seen in mice from these lines (data not shown). Treatment of line GFAP58.8 mice with a specific angiotensin II AT1 receptor antagonist (Candesartan) at a dose of 15 mg/kg/day by gavage normalized BP after 3 days of treatment (Figure 2.5), confirming that the hypertension seen in these mice was due to the action of Ang II on the AT1 receptor. In contrast, treatment of these mice with the angiotensin converting enzyme inhibitor Captopril at a dose of 100 mg/kg/day intraperitoneally for 4 days did not reduce the BP of transgenic mice to a greater extent than seen in non-transgenic littermates (Figure 2.5). This dose of Captopril was effective, however, in correcting



**Figure 2-4. Characterization of angiotensin peptides present in brain of GFAP-Ang II mice.**

Tic marks indicate the migration of angiotensin peptide standards for Ang II (angiotensin 1-8), Ang III (angiotensin 2-8), and Ang IV (angiotensin 3-8). Peptides extracted from the brains of three transgenic (closed circles) or three control (open diamonds) mice were separated by HPLC, and fractions were subjected to RIA with an antibody specific for Ang II and its metabolites.



**Figure 2-5. Blood pressure of GFAP-AngII mice.**

Systolic blood pressure of male GFAP58.8 (solid bars) and non-transgenic or control (open bars) mice at 10-12 weeks of age (BP) was recorded by the tail cuff method. Shown is the pressure difference after treatment with the ACE inhibitor Captopril or the angiotensin II AT1 receptor antagonist Candesartan. Values are expressed as means  $\pm$  SEM,  $n \geq 6$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control relative.

RAS-dependent hypertension in mice, which overexpress human renin in the liver under the control of transthyretin promoter (TTRhRen-A3 before treatment  $169\pm 10$  and after treatment  $112\pm 9$ ;  $P < 0.001$  (29)). These results clearly demonstrate that the hypertension seen in line GFAP58.8 is due to the direct action of Ang II on the AT1 receptor and not due to activation of the endogenous mouse RAS, which would have responded to Captopril treatment.

### **Effect of brain or circulating Ang II on AGT<sup>-/-</sup>(FVB) renal defects**

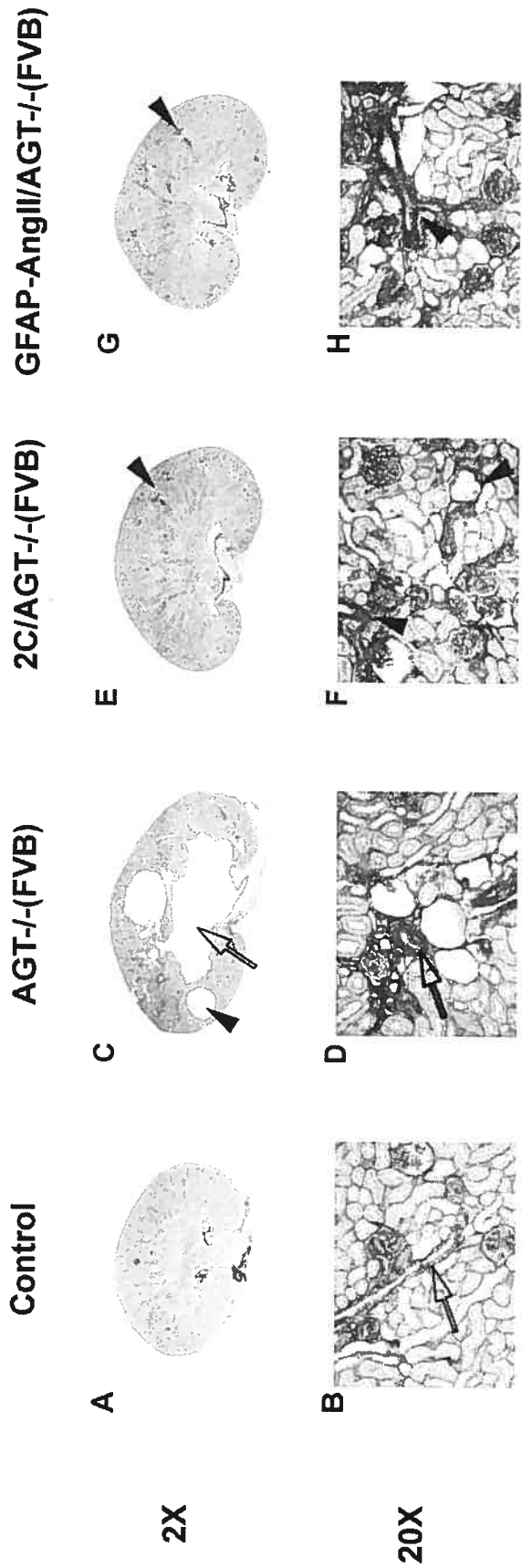
Inactivation of the AGT gene in C57BL/6 mice leads to multiple renal defects including hydronephrosis, hypertrophy of renal arteries, increased thirst, an inability to concentrate urine when faced with dehydration and results in a high mortality rate by weaning (6-8). To test for the effect of complementation of Ang II on these phenotypes, we first bred the AGT<sup>-/-</sup> mice onto the FVB/N background (hereafter referred to as AGT<sup>-/-</sup>(FVB)). After 10 generations, AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice had all of the expected phenotypes but did not exhibit any increased mortality at weaning (data not shown). These mice were bred to GFAP58.8 transgenic mice or to transgenic mice overexpressing frog skin Ang II in the heart (line 2C; Ref. 26). The 2C line has an approximate 1,000-fold increase in cardiac Ang II and spills this peptide into the circulation as evidenced by a suppression of plasma renin content (line 2C; Ref. 26). Blood pressure in line 2C mice is not increased at 5 weeks, but is slightly elevated by 10-12 weeks as compared to non-transgenic littermates (26). The GFAP58.8 and line 2C transgenic mice were bred into the AGT<sup>-/-</sup>(FVB) background, and the resulting mice were characterized. Selective restoration of Ang II either in brain or in plasma normalizes BP of the AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice (\*AGT<sup>-/-</sup>(FVB)  $106\pm 7$ ; GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup>(FVB)  $110\pm 9$ ; 2C/AGT<sup>-/-</sup>(FVB)  $112\pm 12$  and control  $120\pm 5$  mmHg; \*,  $P < 0.01$  versus control).

The kidneys of AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice present hydronephrosis, increased perivascular, glomerular and interstitial fibrosis, medullary cysts and hypertrophy of interlobular arteries (Figure 2.6, C and .D). All (22/22) kidneys examined from

GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice were free of hydronephrosis (Figure 2.6E) while the vast majority (8/10) of kidneys from 2C/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) were hydronephrosis-free (Figure 2.6G). Interestingly, some glomerular atrophy and hypertrophy of interlobular arteries persists in spite of restoration of Ang II in brain or the circulation of AGT<sup>-/-</sup> animals (Figure 2.6, F and H). Small cysts were also present in the renal cortex of animals restoring Ang II only in the circulation of the AGT-deficient animals (Figure 2.6H).

### **Effect of brain or circulating Ang II on kidney function of AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice**

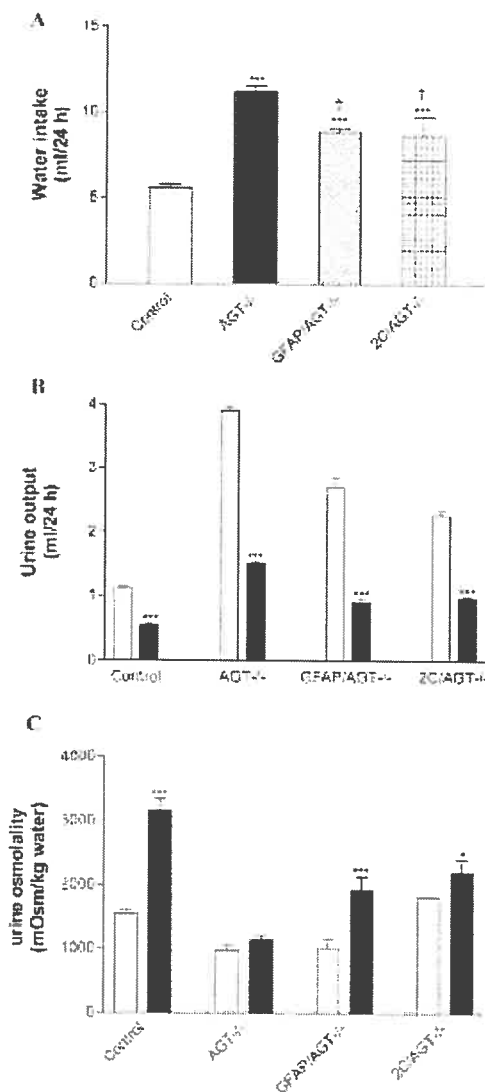
To test for the effect of brain or circulatory Ang II on kidney function in AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice, animals were placed individually in metabolic cages with free access to water and food, and urine output and water consumption were measured. As expected, AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice show an increased water intake and urine output (Figure 2.7A, B) but both were significantly attenuated in GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) and 2C/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice. Urine osmolality of AGT<sup>-/-</sup>(FVB) and GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) was significantly lower than that of control mice (Figure 2.7C). In contrast, 2C/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice correct this decrease in urine osmolality (Figure 2.7C), consistent with the known importance of circulating Ang II for kidney function (8). As previously reported, AGT<sup>-/-</sup> mice are unable to concentrate urine when deprived of water (Figure 2.7C). After a 24 h period of water deprivation GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice show the same capacity as control mice to concentrate urine (an approximate 2-fold increase) even though the starting osmolality is lower than that of control mice (Figure 2.7C). The 2C/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) as well AGT<sup>-/-</sup>(FVB) cannot concentrate their urine after being water deprived as compared with control littermates (Figure 2.7C). These results demonstrate that brain Ang II plays an important role in regulating fluid balance in conditions of dehydration.



**Figure 2-6. Histopathology of the kidneys (Sirius red staining).**

Kidney sections from control (A and B); AGT<sup>-/-</sup>(FVB) (C and D); 2C/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) (E and F) and GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) (G and H) mice were stained for extracellular matrix with Sirius Red. Original magnification was 2X (A, C, E and G) and 20X (B, D, F and H) AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice present hydronephrosis (C, open arrows) cortical cysts (C, arrowheads), glomerular fibrosis (D, F and H, note increased dark staining) and hypertrophy of the interlobular arteries (D; note thickening of arterial walls as denoted by open arrows) as compared with control FVB mice (A, B). Hydronephrosis was corrected in GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) (E) and 2C/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) (G) mice while cortical cysts (E and G arrowheads) and hypertrophy of interlobular arteries (F and H; note thickening of arterial walls, arrowheads) persist.





**Figure 2-7. Effect of restoring brain or circulating Ang II on renal function in AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice.**

Water intake (A) was measured in mice with free access to food and water. Values are the mean of 3 days' measurements; \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control; †,  $P < 0.05$  compared with AGT<sup>-/-</sup>(FVB). Urine output (B) was measured in mice before (open bars) or after (solid bars) water deprivation for 24 h; \*\*\*,  $P < 0.001$  compared to euhydrated relative. C, urine osmolality before (open bars) and after (solid bars) water deprivation; \*\*\*,  $P < 0.001$ , \*,  $P < 0.05$  compared with euhydrated relative.

## DISCUSSION

We have used a novel technique to generate transgenic mice with a chronic over-production of Ang II peptide in the brain. This locally-produced Ang II does not spill over into the circulation as evidenced by an absence of transgene mRNA or Ang II peptide increases in the non-brain tissues tested, a lack of detectable increases in circulating Ang II and a lack of suppression of circulating renin, a very sensitive indicator of circulating Ang II. Our results demonstrate that restoration of brain Ang II in mice deficient for an endogenous renin-angiotensin system prevents the hydronephrosis seen in the non-complemented AGT<sup>-/-</sup> mice and restores their ability to concentrate urine when challenged by dehydration. In contrast, while restoration of circulating Ang II in the AGT<sup>-/-</sup> mice also corrects hydronephrosis, it is unable to correct their ability to concentrate urine when challenged with dehydration, suggesting differences in the site of action of Ang II in these two models. Although both complementation strategies partially corrected the increased drinking and urine output seen in AGT<sup>-/-</sup> mice, neither improved the observed hypertrophy of the interlobular renal arteries. Taken together, these results suggest that the panoply of renal phenotypes described in RAS-deficient mice may be due to the action of Ang II on multiple target tissues.

Newborn mice deficient for RAS have histological normal kidneys at birth and develop frank hydronephrosis in the first 3-5 weeks of life (8, 33), a period when the newborn kidney must adapt to a much higher flux in fluid than it was exposed to in utero. Although both transgenic models reduce drinking behavior and urine output in the AGT<sup>-/-</sup> background, these values do not return to levels seen in control mice and it seems unlikely that this partial reduction in urine flux could account for the complete disappearance of the hydronephrosis. Ichikawa and co-workers have suggested that the hydronephrosis seen in RAS-deficient C57BL/6 mouse pups is due to an incomplete development of a smooth muscle layer around the upper ureter which results in a loss of ureteral peristalsis and hydronephrosis due to reflux pressure (33). Surprisingly, in the FVB background, we see no deficiency in the

formation of the smooth muscle cell layer around the upper ureter of the AGT<sup>-/-</sup> animals (data not shown) even though all of these animals develop hydronephrosis raising the possibility that the hydronephrosis is not directly linked to this developmental phenomenon. Correction of hydronephrosis in RAS-deficient mice has also been reported by other groups who have targeted components of the RAS to different tissues. Double transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in numerous tissues correct all of the renal abnormalities seen in AGT<sup>-/-</sup> mice (22). Similar results were reported with expression of AGT in AGT<sup>-/-</sup> mice using the metallothionein promoter that results in expression in multiple tissues including brain, kidney and liver (21). Somewhat more surprisingly, rescue of the hydronephrosis in AGT<sup>-/-</sup> mice has been reported with complementation of angiotensinogen expression selectively in adipocytes (20). Notably all of these approaches would result in a partial or complete restoration of circulating Ang II. One possible explanation for the ability of both brain and circulating Ang II to correct hydronephrosis might be their parallel effects on blood pressure that might counter reflux pressure in the ureter by increasing the filtration pressure in the kidney. Indeed, whereas AGT<sup>-/-</sup> mice are mildly hypotensive, GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup> (FVB) and 2C/AGT<sup>-/-</sup>(FVB) mice had a normal BP. However, Kessler et al. (34) recently reported that replacement of a soluble form of ACE in ACE<sup>-/-</sup> knockout mice resulted in the rescue of kidney anomalies even though these mice remain hypotensive (34), making blood pressure an unlikely reason for the correction of hydronephrosis.

Another possible explanation for the ability of circulating Ang II to correct renal defects in AGT<sup>-/-</sup> mice would be its uptake by the kidney itself. Even though the kidney can indeed take up Ang II from the circulation via the AT1 receptor (35) restoration of Ang II production only in the kidney is not sufficient to rescue anomalies in kidneys of AGT<sup>-/-</sup> mice (8), suggesting that the effect of Ang II on hydronephrosis is mediated by a non-renal tissue. Alternatively, Ang II produced in the circulation might act on the brain to influence the development of hydronephrosis, which would explain why both of our transgenic mouse models correct this phenotype. Although the blood-brain barrier is impermeable to peptides

such as angiotensin, the circumventricular organs, such as subfornical organ (SFO), paraventricular nuclei, organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT), allow peptides and hormones to leave the brain without disrupting blood-brain-barrier and permit substances in plasma that do not normally cross this barrier to trigger changes in brain function (reviewed in Ref. 36). These organs are rich in AT1 receptors (37) and injection of  $^{125}\text{I}$ -Ang II into the circulation results in Ang II binding in SFO, OVLT, median eminence, and area postrema (38-40) to affect both blood pressure and drinking behavior. These findings raise the possibility that both brain and circulating Ang II act at the same sites in the brain to influence either post-natal renal development or function in newborn mice. Although the actual mechanisms need further investigation, both central and circulating Ang II can influence renal sympathetic nerve activity, which in turn could have a direct effect on kidney function, by stimulating the peristalsis of the ureter and in this way prevent the urinary reflux (41). Interestingly we found that the high rate of neonatal mortality that has been associated with renin-angiotensin system deficiency depends on genetic background use. By using AGT $^{-/-}$ (FVB) it seems that the kidney anomalies seen in mice with RAS disruption are an adaptation problem instead of developmental problem, because obvious renal defects are not seen until 4 to 5 weeks of age.

In conclusion, we have demonstrated that chronic elevations of Ang II specifically restricted to the brain can prevent the hydronephrosis and urine concentration deficit in RAS-deficient mice. These findings may have important implications for understanding the fetotoxic effects of RAS inhibitors seen in humans (4;5).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Jadwiga and Mieczyslaw Marcinkiewicz for assistance with in situ hybridization, Diana Raiwet for expert technical assistance, Drs Oliver Smithies and hyung-Suk Kim for the AGT $^{-/-}$  line and Drs. Gary Prescott and Christian Deschepper for helpful discussions.

**REFERENCES**

1. Rubanyi, G. M. (1993) *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **22 Suppl 4**, S1-14
2. Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Muller, D. N., Luft, F. C., and Ganten, D. (2001) *J.Mol.Med.* **79**, 76-102
3. Kihara, M., Umemura, S., Sumida, Y., Yokoyama, N., Yabana, M., Nyui, N., Tamura, K., Murakami, K., Fukamizu, A., and Ishii, M. (1998) *Kidney Int.* **53**, 548-555
4. Barr, M., Jr. and Cohen, M. M., Jr. (1991) *Teratology* **44**, 485-495
5. Shotan, A., Widerhorn, J., Hurst, A., and Elkayam, U. (1994) *Am.J.Med.* **96**, 451-456
6. Piper, J. M., Ray, W. A., and Rosa, F. W. (1992) *Obstet.Gynecol.* **80**, 429-432
7. Niimura, F., Labosky, P. A., Kakuchi, J., Okubo, S., Yoshida, H., Oikawa, T., Ichiki, T., Naftilan, A. J., Fogo, A., Inagami, T. (1995) *J.Clin.Invest* **96**, 2947-2954
8. Ding, Y., Stec, D. E., and Sigmund, C. D. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 7431-7436
9. Matsusaka, T., Nishimura, H., Utsunomiya, H., Kakuchi, J., Niimura, F., Inagami, T., Fogo, A., and Ichikawa, I. (1996) *J.Clin.Invest* **98**, 1867-1877
10. Chen, X., Li, W., Yoshida, H., Tsuchida, S., Nishimura, H., Takemoto, F., Okubo, S., Fogo, A., Matsusaka, T., and Ichikawa, I. (1997) *Am.J.Physiol* **272**, F299-F304
11. Ichiki, T., Labosky, P. A., Shiota, C., Okuyama, S., Imagawa, Y., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I., Hogan, B. L., and Inagami, T. (1995) *Nature* **377**, 748-750
12. Murakami, K. and Fukamizu, A. (1999) *Immunopharmacology* **44**, 1-7
13. Clark, A. F., Sharp, M. G., Morley, S. D., Fleming, S., Peters, J., and Mullins, J. J. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 18185-18190
14. Sharp, M. G., Fettes, D., Brooker, G., Clark, A. F., Peters, J., Fleming, S., and Mullins, J. J. (1996) *Hypertension* **28**, 1126-1131
15. Krege, J. H., John, S. W., Langenbach, L. L., Hodgins, J. B., Hagaman, J. R., Bachman, E. S., Jennette, J. C., O'Brien, D. A., and Smithies, O. (1995) *Nature* **375**, 146-148

16. Iwai, N., Inagami, T., Ohmichi, N., Nakamura, Y., Saeki, Y., and Kinoshita, M. (1992) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **188**, 298-303
17. Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J. E., Pratt, R. E., Kobilka, B. K., and Dzau, V. J. (1992) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **185**, 253-259
18. Kakar, S. S., Riel, K. K., and Neill, J. D. (1992) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **185**, 688-692
19. Inokuchi, S., Kimura, K., Sugaya, T., Yoneda, H., Shirato, I., Murakami, K., and Sakai, T. (1998) *Virchows Arch.* **433**, 349-357
20. Massiera, F., Bloch-Faure, M., Ceiler, D., Murakami, K., Fukamizu, A., Gasc, J. M., Quignard-Boulangue, A., Negrel, R., Ailhaud, G., Seydoux, J., Meneton, P., and Teboul, M. (2001) *FASEB J.* **15**, 2727-2729
21. Ishida, J., Sugiyama, F., Tanimoto, K., Taniguchi, K., Syouji, M., Takimoto, E., Horiguchi, H., Murakami, K., Yagami, K., and Fukamizu, A. (1998) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **252**, 610-616
22. Davisson, R. L., Kim, H. S., Krege, J. H., Lager, D. J., Smithies, O., and Sigmund, C. D. (1997) *J.Clin.Invest* **99**, 1258-1264
23. Methot, D., vanKats, J. P., Lochard, N., Tremblay, F., Silversides, D. W., and Reudelhuber, T. L. (2001) *Am.J.Hypertens.* **14**, 38S-43S
24. Brenner, M., Kisseberth, W. C., Su, Y., Besnard, F., and Messing, A. (1994) *J.Neurosci.* **14**, 1030-1037
25. Methot, D., Reudelhuber, T. L., and Silversides, D. W. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 4551-4556
26. van Kats, J. P., Methot, D., Paradis, P., Silversides, D. W., and Reudelhuber, T. L. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 44012-44017
27. Methot, D., Silversides, D. W., and Reudelhuber, T. L. (1999) *Circ.Res.* **84**, 1067-1072
28. Marcinkiewicz, M., Nagao, T., Day, R., Seidah, N. G., Chretien, M., and Avoli, M. (1997) *Neuroscience* **76**, 425-439
29. Prescott, G., Silversides, D. W., Chiu, S. M., and Reudelhuber, T. L. (2000) *Physiol Genomics* **4**, 67-73
30. Reaux, A., Fournie-Zaluski, M. C., David, C., Zini, S., Roques, B. P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 13415-13420
31. Zini, S., Fournie-Zaluski, M. C., Chauvel, E., Roques, B. P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1996) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 11968-11973

32. Krege, J. H., Hodgin, J. B., Hagaman, J. R., and Smithies, O. (1995) *Hypertension* **25**, 1111-1115
33. Matsusaka, T., Miyazaki, Y., and Ichikawa, I. (2002) *Annu.Rev.Physiol* **64**, 551-561
34. Kessler, S. P., Gomos, J. B., Scheidemantel, T. S., Rowe, T. M., Smith, H. L., and Sen, G. C. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 4271-4276
35. Zou, L. X., Imig, J. D., Hymel, A., and Navar, L. G. (1998) *Am.J.Hypertens.* **11**, 570-578
36. Ganong, W. F. (2000) *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **27**, 422-427
37. Phillips, M. I. and Summers, C. (1998) *Regul.Pept.* **78**, 1-11
38. Volicer, L. and Loew, C. G. (1971) *Neuropharmacology* **10**, 631-636
39. Johnson, A. K. and Schwob, J. E. (1975) *Pharmacol.Biochem.Behav.* **3**, 1077-1084
40. van Houten, M., Schiffrin, E. L., Mann, J. F., Posner, B. I., and Boucher, R. (1980) *Brain Res.* **186**, 480-485
41. DiBona, G. F. (2002) *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **11**, 197-200

## **Chapitre 3**

### **Chronic production of angiotensin IV in the brain leads to hypertension that is reversible with an angiotensin II AT1 receptor antagonist**

Nadheige Lochard, Gaétan Thibault, David W. Silversides,  
Rhian M. Touyz, Timothy L. Reudelhuber

Circulation Research 2004; 94: 1451-1457



Dans l'article qui suit, le Dr Gaétan Thibault a fourni une aide précieuse dans la planification des expériences et des méthodes d'analyse dans la détermination de l'affinité des peptides angiotensines pour les récepteurs AT1 ou AT4. Le David W. Silversides a généré les souris transgéniques à partir des vecteurs d'expression que nous lui avons fournis. Le Dr Rhian Touyz a réalisé les expériences de mobilisation du calcium intracellulaire. Les autres expériences présentées dans cet article ainsi que la rédaction du manuscrit ont été réalisées par le premier auteur sous la direction du Dr Timothy Reudelhuber

## ABSTRACT

Angiotensin IV (Ang IV) is a metabolite of the potent vasoconstrictor angiotensin II (Ang II). Because specific binding sites for this peptide have been reported in numerous tissues including the brain, it has been suggested that a specific Ang IV receptor (AT<sub>4</sub>) might exist. Bolus injection of Ang IV in brain ventricles has been implicated in learning, memory and localized vasodilatation. However, the functions of Ang IV in a physiological context are still unknown. In this study, we generated a transgenic (TG) mouse model that chronically releases Ang IV peptide specifically in the brain. TG mice were found to be hypertensive by the tail cuff method as compared to control littermates. Treatment with the angiotensin converting enzyme inhibitor Captopril had no effect on blood pressure, but surprisingly treatment with the Ang II AT<sub>1</sub> receptor antagonist Candesartan normalized the blood pressure despite the fact that the levels of Ang IV in the brains of TG mice were only 4-fold elevated over the normal endogenous level of Ang peptides. Calcium mobilization assays performed on cultured CHO cells chronically transfected with the AT<sub>1</sub> receptor confirm that low dose Ang IV can mobilize calcium via the AT<sub>1</sub> receptor only in the presence of Ang II, consistent with an allosteric mechanism. These results suggest that chronic elevation of Ang IV in the brain can induce hypertension that can be treated with angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonists.

## INTRODUCTION

The octapeptide hormone angiotensin II (Ang 1-8; Ang II) is considered to be the main effector of renin-angiotensin system (RAS) in the control and regulation of blood pressure.<sup>1</sup> Ang II interacts with two types of receptors called AT1 and AT2.<sup>2,3</sup> Most of the physiological actions of Ang II in the cardiovascular system are thought to be mediated by the activation of AT1 receptors. All the components of the RAS, including angiotensinogen, prorenin, renin, angiotensin converting enzyme (ACE) and the angiotensin receptors are present not only in the circulation but also in certain tissues including the heart, kidney and brain (reviewed in ref <sup>4</sup>). Whether or not these so-called local RAS have an activity independent of the circulating RAS is a matter of much debate. However, there is little doubt that the brain can synthesize angiotensin peptides locally because Ang II is not readily permeable to the blood brain barrier and because it has been detected in brain of nephrectomized rats unable to generate circulating Ang II.<sup>5</sup> Overactivation of the brain RAS is implicated in the maintenance of the hypertension in certain laboratory animal models including spontaneously hypertensive rats (SHR)<sup>6</sup> and several transgenic mouse models.<sup>7</sup>

In the brain, as well as in the circulation, Ang II is rapidly metabolized (Figure 3.1). Aminopeptidases A and N act successively to remove 1 amino-acid from the N-terminus of Ang II to produce Ang III (Ang 2-8) and Ang IV (Ang 3-8).<sup>8</sup> Injection of Ang III peptide in cerebral ventricles has been found to have dose-dependent pressor responses similar to those of Ang II.<sup>9</sup> In fact, the finding that inhibition of aminopeptidase A could prevent an increase in blood pressure following Ang II injection in cerebral ventricles has led some investigators to suggest that Ang III is the principal effector of the RAS in the brain.<sup>10</sup> However, it is still not certain whether it is Ang III that performs these biological functions, or its further metabolite, Ang IV.

Because Ang IV binds with high affinity to sites that are both histologically and pharmacologically distinct from the AT1 and AT2 receptors, the possibility has been raised that a distinct receptor (the AT4 receptor) exists for this angiotensin

peptide.<sup>11</sup> In the brain, AT4 binding sites are found in regions associated with cognitive and motor function including neocortex, hippocampus and cerebellum.<sup>12</sup> Recent evidence has suggested that the AT4 receptor may be the insulin-regulated aminopeptidase (IRAP).<sup>13</sup> The substrates of IRAP in vivo are not known, but it is possible that interaction of Ang IV with IRAP could inhibit degradation of endogenous neuropeptides thereby increasing their half-life. In fact Ang IV has been reported to increase memory recall and learning in passive and conditioned avoidance tests.<sup>14;15</sup> Ang IV has also been reported to regulate cerebral blood flow, proliferation of lung endothelial cells<sup>16</sup> and stimulation of endothelial cell expression of plasminogen activator inhibitor (PAI-1).<sup>17</sup> Although these results suggest a number of physiological functions for Ang IV in the brain, they are largely based on experiments involving acute interventions with pharmacologic doses of the peptide delivered by nonphysiological routes.

In the current study, we generated a transgenic mouse model designed to test for the cardiovascular effect of chronically elevated Ang IV levels in the brain. Our results suggest that a modest increase of Ang IV, specifically in the brain, contributes to hypertension that can be corrected with an angiotensin II AT1 receptor antagonist.

## MATERIALS AND METHODS

### Generation of transgenic mice

The expression vector used for releasing Ang IV (m-Ang IV) is shown in Figure 3.2 and the details of its construction have been described elsewhere.<sup>18:19</sup> Two modifications were made to the natural amino acid sequence of Ang IV. First, alanine (Ala) was added to the N-terminus to provide a good P1' site for furin cleavage and thereby increase the efficiency of peptide release. Second, the proline at the penultimate position was substituted by glycine to produce the peptide Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV. This fusion protein was placed under the control of a 2.2 Kb fragment of the human glial fibrillary acidic protein promoter (hGFAP), which is specific for astrocytes.<sup>20</sup> The transgene was excised from the plasmid vector and coinjected with a tyrosinase gene in the pronucleus of fertilized eggs of FVB/N females mice, as previously described,<sup>21</sup> to produce GFAP-Ang IV transgenic mice. We obtained 3 founder lines for GFAP-Ang IV named GFAP10.1, 10.2 and 10.3.

All mice were used at 8 to 12 weeks unless otherwise specified. The animal protection and ethics committee of the Clinical Research Institute of Montreal approved all animal protocols.

### Tissue pattern of transgene expression

RNase protection assays (from total RNA) were performed as described previously.<sup>19:21</sup> The pattern of transgene expression in brain was assessed by in situ hybridization as described previously.<sup>19</sup>

### Preparation of antibodies

A rabbit antiserum was raised against Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV. For immunization, the peptide was coupled to the chicken ovalbumin (Sigma A5503, Sigma Aldrich,

Oakville, Ontario, Canada) in molar ratio 20:1 using glutaraldehyde.<sup>22</sup> Three rabbits were immunized at 2 subcutaneous and one intramuscular site. Primary immunization contained 1 mg of conjugated peptide mixed 1:2 with Freund's complete adjuvant (Sigma F-5881). Three booster immunizations separated by 3 weeks were performed in the same way but using Freund's incomplete adjuvant. Test bleeds (8 ml) were collected between the injections and evaluated for positive immune response by radioimmunoassay (RIA). At the end of the protocol, animals were exsanguinated and serum was collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . This antiserum is specific for Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV and shows 100% cross-reactivity with Gly<sup>5</sup>-Ang IV and no detectable reactivity with either Ang I, Ang II or Ang IV.

## **Characterization of transgenic peptide expression in GFAP-Ang IV**

### **Mice**

To determine the form of angiotensin IV peptide released by the the fusion protein in brain, whole brain acid/alcohol extracts from 5 mice from line GFAP10.2, or control were pooled and fractionated by reverse-phase HPLC as described previously.<sup>19:23</sup> The elution fractions were lyophilized and subjected to RIA using the rabbit antibody raised against Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV. Synthetic peptides were used as migration standards. The levels of Ang II, Ang III and Ang IV peptides in brain acid/alcohol extracts were determined by RIA using a polyclonal antibody that reacts equally well with all 3 metabolites and using [<sup>125</sup>I]-Ang II as tracer.<sup>19:24</sup>

### **Receptor binding assays**

Receptor binding assays were performed to determine the affinity of Ang IV, Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV and Gly<sup>5</sup>-Ang IV for the AT1 and AT4 receptors using membrane preparations from whole brain of control mice or a stable CHO cell line expressing the rat AT1B receptor (CHO-AT1B). Brain membranes were prepared as described previously.<sup>25</sup> Membrane fractions were resuspended in binding buffer (phosphate-buffered saline containing two tablets of complete protease inhibitor (Roche 1697498, Roche Diagnostic, Laval, Québec, Canada) per 100 ml, 0.5% heat-treated

BSA (Sigma A-6918), 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L PMSF and 5 mmol/L DTT).

For the competition assay 100 µg protein of a fresh preparation of brain membranes were incubated with 6 X 10<sup>4</sup> cpm of [<sup>125</sup>I]-Ang IV in the presence of a mix of AT1 and AT2 antagonists, 10<sup>-6</sup> mol/L each of candesartan (gift from Astra-Zeneca) and PD 123319 (gift from Parke-Davis, Canada), in a final volume of 0.25 ml. Increasing concentrations of Ang IV, Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV, Gly<sup>5</sup>-Ang IV and Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-Ang II were added to the tubes. After an incubation period of 2 hours at 37°C with shaking, the bound ligand was separated from free ligand by filtration through glass fiber filters followed by 3 4-ml washes with 0.08 mol/L Tris/HCl pH 7.4 containing 0.9% NaCl. Radioactivity in the membranes was measured with a gamma counter. Non-specific binding was estimated in presence of 10<sup>-6</sup> mol/L Ang IV.

One day before the experiment, the CHO-AT1B were plated at 4 X 10<sup>5</sup> cells/well in 24 wells plate. The cells were washed twice with DMEM free of serum and incubated with 5 X 10<sup>5</sup> cpm of [<sup>125</sup>I]-Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-Ang II for 90 minutes at room temperature in a final volume of 0.5 ml. For competition assays, increasing concentrations of Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-Ang II, Ang IV, Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV, Gly<sup>5</sup>-Ang IV, Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-Ang II, Candesartan, or PD 123 319 were included in the incubation medium. After the incubation period, the cells were washed twice with DMEM free of serum and solubilized with 0.5 ml of 1N NaOH and the radioactivity in the lysate was quantified with a gamma counter. Nonspecific binding was determined in the presence of 10<sup>-6</sup> mol/L of Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-Ang II.

### **Reverse transcription polymerase chain reaction amplification and quantification of AT1 receptors in brain of GFAP-Ang IV mice**

Total RNA from brain was prepared by the Trizol method (Invitrogen 15596-026). The first strand cDNA was synthesized with random primers and 5 µg of total RNA treated with the RQ1 RNase-free DNase (Promega, M6106) by using the Superscript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen 18064-022). Three primers were designed for AT1 receptors and the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), two primers for the PCR amplification and one

as the probe. The primers for AT1 were, forward primer: 5'-ATATTTGTCATCCCTAC-3; reverse primer: 5'-AATACACAATTCGGTGGATG-3' and the probe: 5'-AGCGTCAGTTTCAACCTCTA-3'. The primers for GAPDH were, forward primer: 5'-TCCGCCCTTCCGCTGATG-3'; reverse primer: 5'-CAGGGAAGGCCATGCCAGTGA-3' and the probe: 5'CCA CAG TCC ATG CCA TCA CT-3'. PCR for AT1 was performed with 2  $\mu$ l of cDNA at 52°C ( $T_m$ ) for 30 cycles while the GAPDH PCR was performed at 61.6°C ( $T_m$ ) for 20 cycles. The number of cycles and the quantity of cDNA used were optimized to be in the linear range of the PCR. The PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel and transferred to the GeneScreen Plus membrane (NEN Life Science, NEF988). The southern was done as described in reference 1. Briefly, after the transfer the membrane was washed in 2X SSC. The membranes were placed for 2 hours in the prehybridation buffer (6X SSC; 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.4% SDS; 5X Denhardt's and 500  $\mu$ g/ml of denatured salmon-sperm) followed by an overnight incubation at 42°C in the hybridation buffer (6X SSC; 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.4% SDS; 500  $\mu$ g/ml of denatured salmon-sperm and 1.5 X 10<sup>6</sup> cpm of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP labeled probe). The membranes were subsequently washed in 2X SSC at 42°C and exposed for 2 hours in a phosphoimager cassette. The bands were quantified with the ImageQuant program (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). The results shown were reproduced in two independent experiments.

### **Intracellular calcium measurements**

Intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in CHO-AT1B cells was determined as previously described.<sup>26</sup> Briefly, cells were cultured on round glass coverslips. The cells were loaded with fura-2AM (4X10<sup>-6</sup> mol/L) and 0.2% pluronic acid in Hank's buffer and incubated at room temperature in the dark for 30 minutes. The cells were exposed either directly to Ang II (10<sup>-8</sup> mol/L) or Ang IV (10<sup>-7</sup> mol/L) or after pre-treatment for 20 minutes with Candesartan (10<sup>-5</sup> mol/L). Fluorescence was measured by photomicrographic digital imaging (Attofluor



Ratiovision; Zeiss) using excitation wavelengths of 343/380 nm and an emission wavelength of 520 nm.  $[Ca^{2+}]_i$  was determined from the Grynkiewicz formula.<sup>27</sup>

### **Physiological measurements**

Systolic blood pressure (SBP) was measured by tail-cuff plethysmography (BP-2000 system; Visitech Systems, Apex, NC). Mice were trained for 7 days and SBP was recorded for an additional 3 days. After the initial 10 days of SBP recording, mice were treated with an ACE inhibitor (Captopril, Sigma) at 100 mg/kg/day intraperitoneal in 0.9% NaCl or the AT<sub>1</sub> antagonist Candesartan (15 mg/kg/day by gavage in 5% gum Arabic) for a further 5 or 3 days while recording SBP.

### **Statistical Analysis**

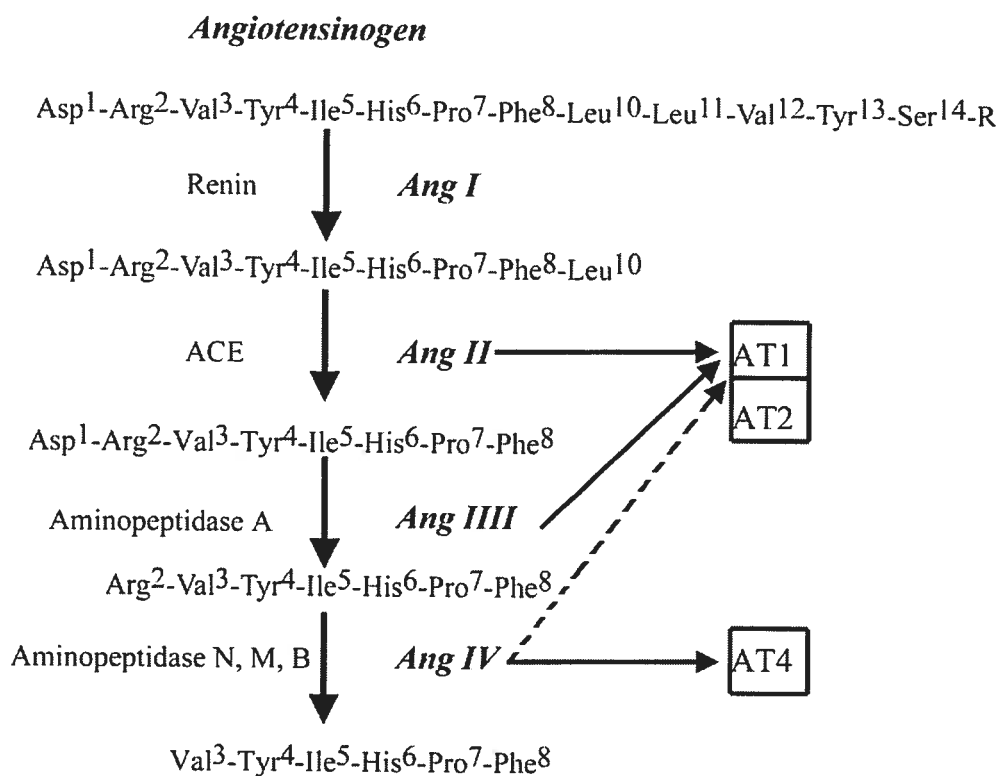
Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA with Dunnett's post test or unpaired *t* test was performed using GraphPad Prism version 3.00 (Graph Pad Software, San Diego, California USA).

## RESULTS

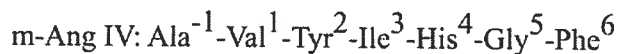
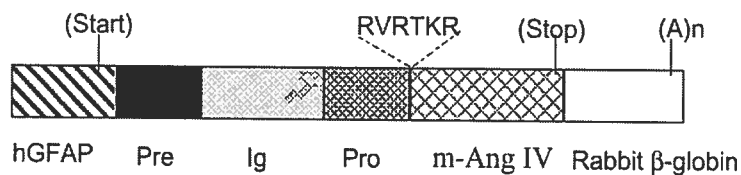
### **Affinity of Ang IV and m-Ang IV peptides for AT4 and AT1 receptors**

Because over-expressing the entire RAS in a given tissue would result in the formation of a variety of angiotensin peptides including Ang II, III and IV (Figure 3.1) we generated, a fusion protein that allows the targeted production of specific angiotensin metabolites in whole animals.<sup>28</sup> In the design of this fusion protein, a furin cleavage site is placed just before the sequence of the angiotensin peptide (Figure 3-2). Because of the furin cleavage preference, an alanine was added to N-terminus of the native Ang IV sequence (Figure 3.2) with the expectation that this extra amino acid would be removed by the abundant aminopeptidases present in brain. A second modification to the Ang IV sequence, substitution of a glycine residue for the proline normally found at position five (Compare Figure 3.1 and Figure 3.2), has two main advantages. First, this modification has been reported to increase the affinity of the peptide for AT4 receptors by approximately  $\approx 10$ -fold.<sup>29</sup> Second, using an antibody specific for this modified Ang IV it is possible to discriminate between the exogenous and endogenous Ang IV peptides in the brains of transgenic animals. The transgenic peptide and its metabolic derivatives are hereafter referred to as modified Ang IV (m-Ang IV) to distinguish them from the endogenous angiotensin peptides.

Radioligand binding studies were performed to evaluate the affinity of these peptides for the AT4 and AT1 receptors. Figure 3.3B illustrates the comparative binding of bona fide Ang IV and the m-Ang IV peptides with fresh brain membrane preparations from control mice. In order to unequivocally demonstrate that these peptides interact with the AT4 receptors the binding assay was performed in the presence of a mix of potent and specific AT1 and AT2 receptor antagonists ( $10^{-6}$  mol/L). Contrary to previous reports,<sup>29</sup> we found that the substitution of glycine for the proline normally found at the penultimate position in Ang IV had no significant

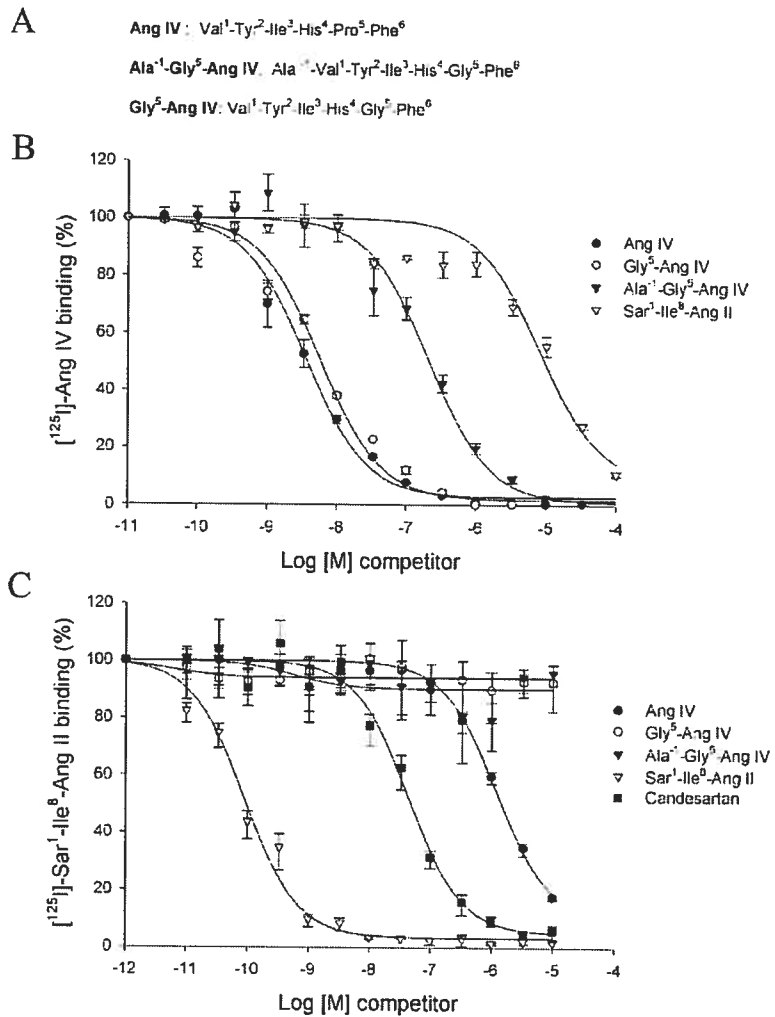


**Figure 3-1. Cascade of enzymatic reactions of the renin-angiotensin system (RAS) leading to the formation of Ang IV.**



**Figure 3-2. Diagram of the transgene used to target overexpression of Ang IV in brain**

The fusion protein contains a signal peptide sequence (Pre), a fragment of the heavy chain constant region of mouse immunoglobulin IgG2b (Ig), a human prorenin prosegment as molecular spacer (Pro), the furin cleavage site (RVRTKR) and a modified form of Ang IV peptide (m-Ang IV): Ala<sup>-1</sup>Gly<sup>5</sup>-Ang IV as shown in the peptide sequence below the diagram. A portion of the rabbit beta-globin gene provides an intron and polyadenylation signal. Expression of this fusion was targeted to the brain by a 2.2 Kb fragment of the hGFAP.



**Figure 3-3. Affinity of Ang IV and modified Ang IV peptides for the AT4 and AT1 receptors.**

**A**, Amino acid composition of Ang IV and m-Ang IV peptides used in this study. **B**, AT4 receptor affinity was determined by incubating crude membrane preparations from mouse brain with [<sup>125</sup>I]-Ang IV in the presence of a mix of AT1 and AT2 receptor antagonists (10<sup>-6</sup> mol/L each, candesartan, PD123 319) and the various peptides indicated. **C**, AT1 receptor affinity was determined by incubating CHO-AT1B with [<sup>125</sup>I]-Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-Ang II and the various peptides indicated. All experiments are performed in triplicate and the values are represented as mean ± SEM. The analyses were done with SigmaPlot 2002 with the ligand module.

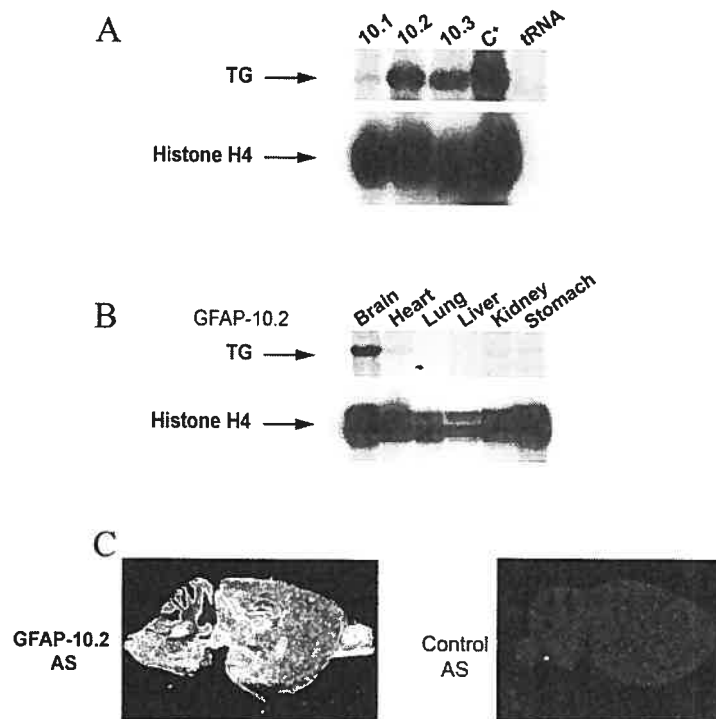
effect on the affinity for AT4 receptor (Kd: Ang IV,  $[6.78 \pm 0.59] \times 10^{-9}$  mol/L; Gly<sup>5</sup>-Ang IV,  $[3.02 \pm 0.56] \times 10^{-9}$  mol/L). In contrast, the presence of an alanine extension at the N-terminus of this peptide decreased the affinity of the mAng IV peptide for the AT4 receptor by roughly  $\approx 300$ -fold (Kd: Ang IV,  $6.78 \pm 0.59 \times 10^{-9}$  mol/L; Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV,  $2.06 \pm 0.43 \times 10^{-7}$  mol/L). Importantly, there was no evidence that any of the mAng IV peptides could displace Ang II from the AT1 receptor (Figure 3.3C).

### **Characterization of transgene expression**

To test for the cardiovascular effects of chronic over-expression of Ang IV in the brain, we have expressed a fusion protein capable of releasing Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV under the control of the hGFAP promoter (Figure 3.2), which targets expression to astrocytes.<sup>20</sup> The resulting transgenic mice were called GFAP-10.X. Three founder lines were established on the FVB/N background and were called GFAP10.1, GFAP10.2 and GFAP10.3. RNase protection assays were performed on transgenic animals to evaluate the tissue specificity and brain expression levels of the transgene. The results show that the 3 lines express the transgene at different levels in the brain (Figure 3.4A). In addition, line GFAP10.2 (which had the highest expression level in the brain and was used for most of the experiments in this study) was found to express the transgene exclusively (Figure 3.4B) and throughout the whole brain (Figure 3.4C). Expression of the fusion protein had no effect on the pattern of expression of the endogenous GFAP gene (data not shown).

### **Forms and levels of Ang IV present in the brain of GFAP-10.X mice**

Because we were obliged to produce Ala<sup>-1</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ang IV with the fusion protein and because the full-length peptide has a dramatically reduced affinity for the AT4 receptor (see above), we sought to determine the efficiency with which the N-terminal alanine was removed (to produce the Gly<sup>5</sup>-Ang IV form) in the brains of



**Figure 3-4. Transgene analysis in transgenic GFAP-10.X mice**

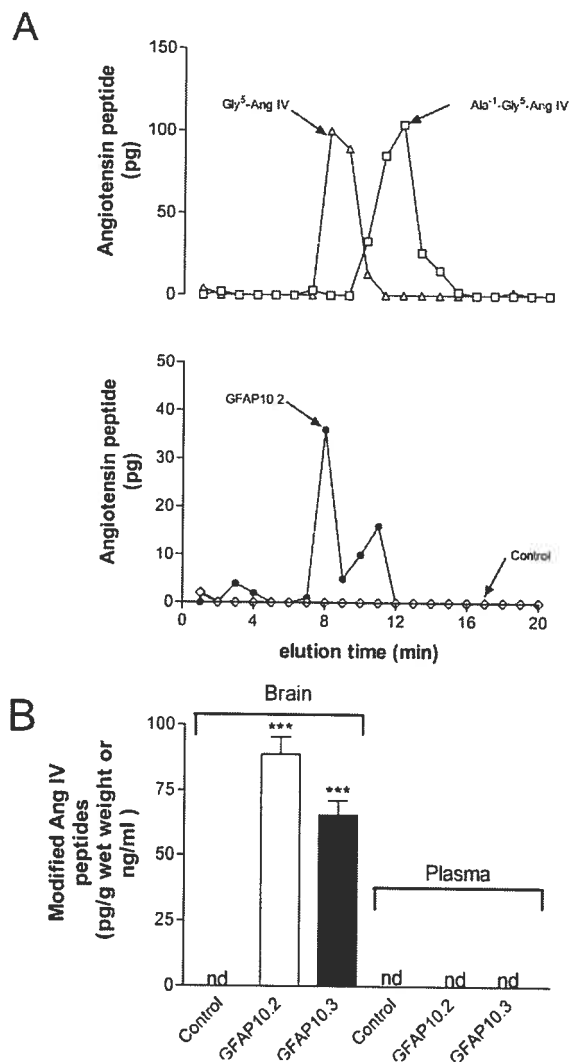
RNase protection on total RNA from brain of 3 lines of GFAP-10.X mice (A) or other tissues from line GFAP10.2 (B). TG, expected size of the protected transgene mRNA; Histone H4, expected size for internal control histone H4; tRNA, negative control; C+, RNA from GH4 cells transfected with an expression vector for the transgene. Transgene distribution in brain was demonstrated by in situ hybridization in GFAP10.2 (C) and control non-transgenic mice (D) using an antisense probe for the transgene.

transgenic mice. Brain acid/alcohol extracts from line GFAP10.2 and control were fractionated by HPLC and eluted peptides were detected by radioimmunoassay. We found that while both modified Ang IV peptides are detectable in the brains of transgenic mice, approximately half of the peptide is in the form of Gly<sup>5</sup>-Ang IV (Figure 3.5A), confirming that the N-terminal alanine is efficiently removed *in vivo*. Total modified Ang IV peptide synthesis in the brains of transgenic mice (Figure 3.5B) showed a direct correlation with the levels of transgene mRNA expression for the lines GFAP 10.2 and 10.3 (Figure 3.4A). Because the antibody used does not cross-react with endogenous RAS peptides, the values obtained can be used to estimate the absolute amount of mAng IV peptide produced in the brains of these mice. Assuming 50% conversion of the peptide to the Gly<sup>5</sup>-Ang IV, the line GFAP 10.2 expresses  $\approx 44 \pm 9$  pg of Gly<sup>5</sup>-Ang IV per gram wet weight of brain tissue. That represents  $\approx 4$  fold the level of endogenous angiotensin peptides (Ang II, Ang III and Ang IV:  $10.7 \pm 2.2$  pg/g wet weight of brain tissue).

### **Blood pressure measurement**

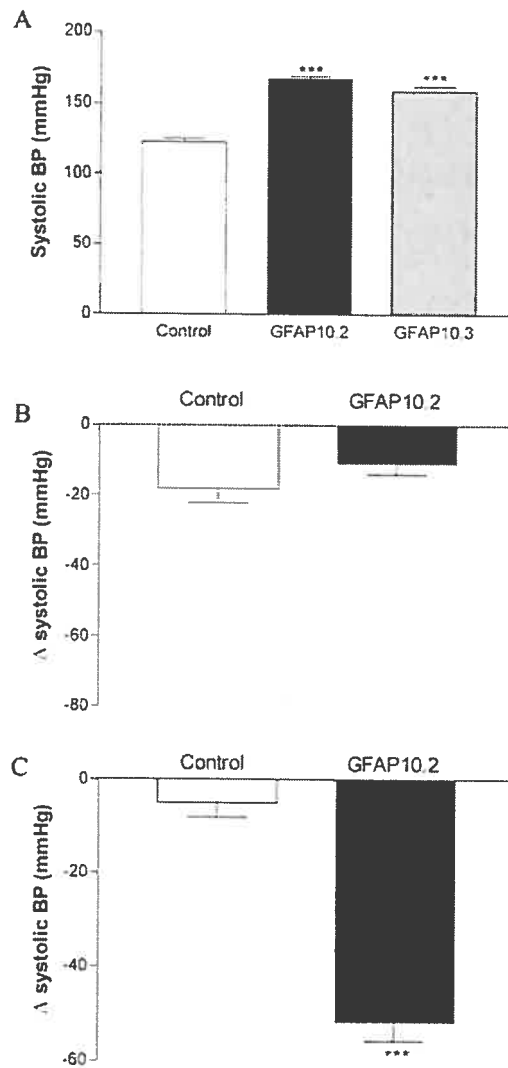
The major purpose of this study was to evaluate the effect of a chronic elevation of brain Ang IV on systolic blood pressure (SBP). We found a significant increase in the SBP of transgenic GFAP-10.X mice compared with control mice (Figure 3.6A). To rule out the possibility that this increase in SBP was caused by activation of the endogenous RAS we treated mice from line GFAP10.2 with an ACE inhibitor (captopril 100mg/kg/day intraperitoneally), which should only block the production of Ang II by the endogenous RAS (note that the transgene releases Ang IV directly). ACE inhibition did not decrease SBP in GFAP 10.2 mice to any greater extent than that seen in non-transgenic littermates (Figure 6B). This dose and regimen of Captopril has previously been shown to be effective in correcting RAS-dependent hypertension in mice.<sup>24</sup> These results support the conclusion that the increase in SBP of GFAP-10.2 mice is due to the direct action of the mAng IV peptide in brain. To rule out the role of the AT1 receptor in this hypertension,





**Figure 3-5. Characterization of Ang IV peptides present in brain and plasma of GFAP-10.X mice**

**A**, HPLC elution of Gly<sup>5</sup>-Ang IV (?), Ala<sup>1</sup>Gly<sup>5</sup>-Ang IV (?) peptide standards and RIA-coupled HPLC of pooled brain extracts from 5 transgenic line GFAP10.2 mice (●) or 5 control non-transgenic littermates (○). **(B)**: Radioimmunoassay for total brain and plasma content of modified Ang IV peptide in transgenic mice from lines GFAP-10.2 and GFAP-10.3. Values are represented as mean ± SEM minus the background from control mice; nd undetectable, n = 8 to 12.

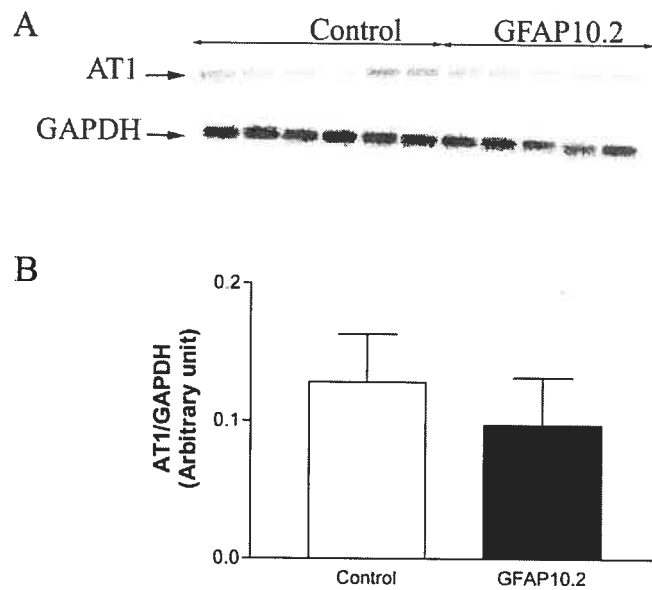


**Figure 3-6. Effect of brain Ang IV on blood pressure.**

**A**, SBP measurement by tail cuff of control (open bar), line GFAP10.2 (black bar) and line GFAP10.3 (gray bar). **B**, Difference in SBP after treatment with the ACE inhibitor Captopril (100 mg/Kg/day intraperitoneally). **C**, Difference in SBP after treatment with the AT1 receptor antagonist Candesartan (15 mg/kg/day by gavage). Values are represented as mean  $\pm$  SEM, n=6 to 12. \*\*\*P<0.0001 versus control.

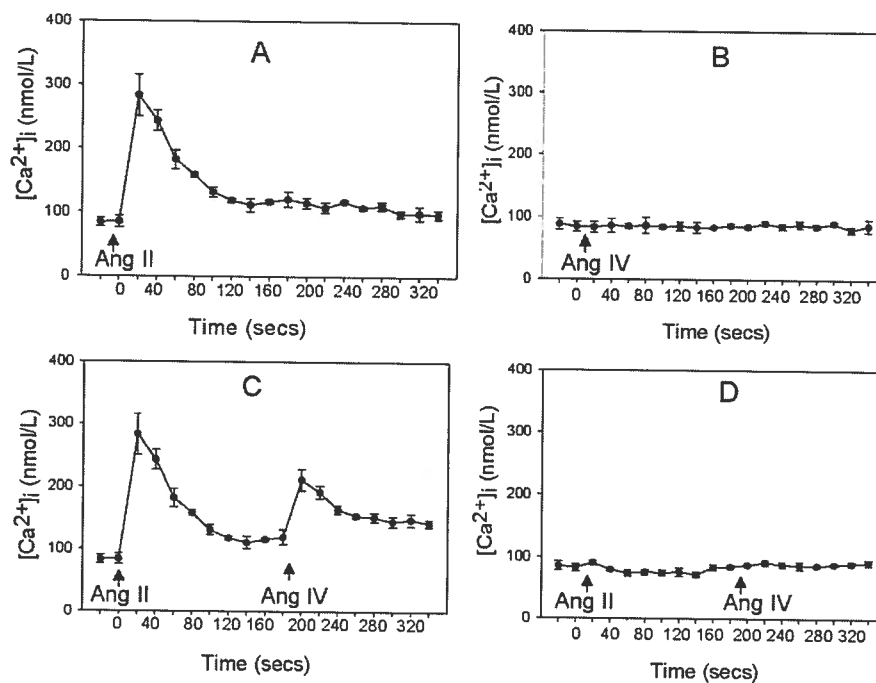
animals were treated with a potent and specific AT1 receptor antagonist, which has been shown to cross the blood-brain barrier (Candesartan 15 mg/kg/day orally).<sup>30</sup> Surprisingly, this treatment normalizes the SBP in mice from line GFAP10.2 (Figure 3.6C). The levels and tissue distribution of AT1 receptors were not different in the brains of transgenic and non-transgenic littermates as demonstrated by the RT-PCR (Figure 3.7A and 3.7B) and the in situ hybridization (data not shown). The levels of endogenous brain angiotensin peptides (Ang II, III and IV) were not increased in transgenic mice (control:  $10.7 \pm 2.2$ ; GFAP10.2:  $6.8 \pm 0.2$ , GFAP10.3:  $5.4 \pm 1.2$  pg Ang peptide/g wet weight; n=12 to 18). Taken together, these results suggest that a chronic but modest increase in brain Ang IV can lead to an increase in SBP that can be reversed by an AT1 receptor antagonist.

To better understand this phenomenon in light of the inability of the m-Ang IV peptides to displace Ang II from the AT1 receptor in binding studies (Figure 3.3C), we tested the possibility that Ang IV might potentiate the signaling capacity of the AT1 receptor in the presence of other angiotensin peptides. CHO-AT1B cells were tested for intracellular calcium mobilization after stimulation with Ang IV and Ang II either alone or in combination, using fluorescence microscopy (Figure 3.8). Treatment of the CHO-AT1B cells with  $10^{-8}$  mol/L Ang II elicited the characteristic transient increase in intracellular free calcium (Figure 8A), which was  $\approx 20\%$  of the maximal response achievable with Ang II in this system (data not shown). In contrast, treatment of the cells with  $10^{-7}$  mol/L Ang IV failed to elicit any response in calcium mobilization (Figure 3.8B). Surprisingly, if the cells were first stimulated with  $10^{-8}$  mol/L Ang II, the subsequent addition of  $10^{-7}$  mol/L Ang IV led to a biphasic pattern of calcium mobilization, characterized by an initial rapid transient increase followed by a continuous slow rise in intracellular calcium (Figure 3.8C). Pre-treatment of the cells with AT1 antagonist Candesartan prevented both responses (Figure 3.8D). These results suggest that Ang IV can synergize with Ang II to promote signaling through the AT1 receptor.



**Figure 3-7. Levels of AT1 receptor in brain of GFAP-10.X mice.**

AT1 receptor gene expression was analyzed in brain of transgenic mice from line GFAP10.2 (n=5) and control (n=6) by RT-PCR followed by a southern (A). Relative intensity of AT1 bands to the intensity of the GAPDH bands (B).



**Figure 3-8.** Effects of Ang II ( $10^{-8}$  mol/L) and Ang IV ( $10^{-7}$  mol/L) on intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in AT1-transfected CHO cells.

Cells were loaded with fura-2AM (4  $\mu$ mol/L) and fluorescence measured using alternating excitatory wavelengths of 340 and 380 nm. Arrows indicate time of agonist addition. **A** and **B**  $[Ca^{2+}]_i$  responses to Ang II and Ang IV, respectively. **C** Effects of Ang IV in Ang II-pre-stimulated cells. **D** Effects of Ang II and Ang IV in cells pretreated with candesartan ( $10^{-5}$  mol/L, 20 minutes). Each data point is the mean  $\pm$  SEM of 3 to 4 experiments, with each experimental field comprising 35-42 cells.

## DISCUSSION

Previous studies of the physiological functions of Ang IV in the brain have required the direct injection of this peptide in the brain ventricles.<sup>12;14;31</sup> In addition to being invasive this strategy precludes the evaluation of long-term effects of this peptide. To explore the role of chronic elevations of Ang IV in brain, we used a fusion protein capable of targeting the direct release of an Ang IV peptide in the brain. The major finding of the present study is that moderate over-production of Ang IV peptide in the brain of transgenic mice induced hypertension that could be reversed by an AT1 receptor antagonist. We have ruled out several of the more trivial explanations for this finding. First, the m-Ang IV peptides could display an increased affinity for the AT1 receptor or be produced in such large quantities that they are able to bind and activate the AT1 receptor. This is clearly not the case, however, because the m-Ang IV peptides show no capacity to displace Ang II from the AT1B receptor (Figure 3.3C) and thus the modest increases of m-Ang IV peptide content in the brain of the transgenic mice (as compared to endogenous peptides) cannot be replacing Ang II to activate the AT1 receptor. A second possible explanation would be that Gly<sup>5</sup>-Ang IV stimulates hypertension through its interaction with the AT4 receptor and that the doses of the AT1 antagonist used in this study were sufficient to block this interaction. This also seems like an unlikely explanation since micromolar concentrations of the AT1 antagonist did not have any significant effect on binding of Gly<sup>5</sup>-Ang IV to the AT4 receptor (Figure 3.3B). Another possibility is that the levels of endogenous angiotensin peptides have been increased by the expression of Gly<sup>5</sup>-Ang IV. It has recently been reported that the insulin regulated amino peptidase (IRAP; the putative AT4 receptor) has the ability to cleave many peptides in vitro, including Ang III.<sup>13</sup> If Gly<sup>5</sup>-Ang IV binding to IRAP decreased the metabolism of endogenous Ang III, the latter might accumulate to levels that would stimulate the AT1 receptor and result in an AT1 receptor antagonist-sensitive hypertension. However, the level of endogenous angiotensin peptides in the brain GFAP-10.X mice tends to be *lower* than in control mice, making this an unlikely explanation. It has been reported that Ang IV could act as an

endogenous ACE inhibitor and thereby block the conversion of Ang I to Ang II *in vitro*.<sup>32</sup> Perhaps such an effect explains the lower angiotensin peptide content in the brains of transgenic mice. Finally, no difference in the levels or distribution of AT1 receptors has been observed in the brain of GFAP-10.X mice as compared to the non-transgenic control mice.

A more compelling explanation for our findings is that angiotensin metabolites (including Ang III and Ang IV) exhibit a higher affinity for the AT1 receptor *in vivo* than is reflected in the *in vitro* Ang II displacement assays. Several lines of evidence support this possibility: Injected Ang III peptide in brain ventricles has previously been reported to elicit a similar dose-dependent pressor response to Ang II.<sup>33:34</sup> Likewise, injection of an aminopeptidase-resistant variant of Ang IV, N-hydroxyethylamine-Ang IV, into the brain ventricles has been shown to increase blood pressure.<sup>35</sup> Pretreatment with an AT1 receptor antagonist but not with an AT4 antagonist, divalinala<sup>35:36</sup> prevented this increase in blood pressure. In addition, it has been reported that AT1 antagonists inhibit the pressure response following injection of Ang II, III and IV in the systemic and hindquarter vascular beds in rat.<sup>37</sup> How, then, can the apparent differences in the *in vitro* and *in vivo* results be reconciled? Kinetic, mutagenesis and modeling studies support the notion that the AT1 receptor can adopt different conformations on stimulation by agonist.<sup>38</sup> A recent study demonstrates that the AT1 receptor can be partially activated by substituting an asparagine at position 111 for glycine (Asn111Gly).<sup>39</sup> While the affinity of Ang II is unchanged for this mutated form of the AT1 receptor, the affinity of Ang IV was increased by 900-fold.<sup>39</sup> Thus, it is possible that conditions could exist *in vivo* (e.g., lipid environment, pH, protein:protein interactions, local ligand concentration, etc) that would permit the AT1 receptor to adopt an Ang IV-sensitive conformation.

Alternatively, Ang IV might act as a potentiator of Ang II binding or signaling through the AT1 receptor. Consistent with this model, our calcium mobilization assays show that Ang IV can effectively activate the AT1 receptor only if Ang II is present (Figure 3.8C), although it does not compete for Ang II binding to this receptor (Figure 3.3C). This effect is specific to the activation of AT1, since it is

prevented in cells pre-treated with AT1 antagonist Candesartan (Figure 8D).

While such a model could explain the effect of Ang IV on blood pressure, it remains to be determined whether such an interaction could also explain the reported cognitive effects of Ang IV.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank Diana Raiwet for expert technical assistance and Dr. Christian Deschepper for helpful comments. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research to TLR.



## REFERENCES

1. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22 Suppl 4:S1-14.
2. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*. 1991; 351(6323):233-236.
3. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem*. 1993; 268(33):24539-24542.
4. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med*. 2001; 79(2-3):76-102.
5. Ganten D, Hermann K, Bayer C, Unger T, Lang RE. Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. *Science*. 1983; 221(4613):869-871.
6. Kubo T, Yamaguchi H, Tsujimura M, Hagiwara Y, Fukumori R. An angiotensin system in the anterior hypothalamic area anterior is involved in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull*. 2000; 52(4):291-296.
7. Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev*. 1992; 13(2):329-380.
8. Moeller I, Allen AM, Chai SY, Zhuo J, Mendelsohn FA. Bioactive angiotensin peptides. *J Hum Hypertens*. 1998; 12(5):289-293.
9. Wright JW, Morseth SL, Abhold RH, Harding JW. Pressor action and dipsogenicity induced by angiotensin II and III in rats. *Am J Physiol*. 1985; 249(5 Pt 2):R514-R521.
10. Reaux A, Fournie-Zaluski MC, David C, Zini S, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(23):13415-13420.
11. Harding JW, Cook VI, Miller-Wing AV, Hanesworth JM, Sardinia MF, Hall KL, Stobb JW, Swanson GN, Coleman JK, Wright JW, . Identification of an AII(3-8) [AIV] binding site in guinea pig hippocampus. *Brain Res*. 1992; 583(1-2):340-343.

12. Wright JW, Harding JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997; 25(1):96-124.
13. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem.* 2001; 276(52):48623-48626.
14. Braszko JJ, WLasienko J, Kupryszewski G, Witczuk B, Wisniewski K. Behavioral effects of angiotensin II and angiotensin II-(4-8)-pentapeptide in rats. *Physiol Behav.* 1988; 44(3):327-332.
15. Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW. The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol.* 1995; 16(1):23-52.
16. Li YD, Block ER, Patel JM. Activation of multiple signaling modules is critical in angiotensin IV-induced lung endothelial cell proliferation *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283(4):L707-L716.
17. Mustafa T, Lee JH, Chai SY, Albiston AL, McDowall SG, Mendelsohn FA. Bioactive angiotensin peptides: focus on angiotensin IV. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2001; 2(4):205-210.
18. Methot D, vanKats JP, Lochard N, Tremblay F, Silversides DW, Reudelhuber TL. Development and application of a biological peptide pump for the study of the in vivo actions of angiotensin peptides. *Am J Hypertens.* 2001; 14(6 Pt 2):38S-43S.
19. Lochard N, Silversides DW, van Kats JP, Mercure C, Reudelhuber TL. Brain-specific restoration of angiotensin II corrects renal defects seen in angiotensinogen-deficient mice. *J Biol Chem.* 2003; 278(4):2184-2189.
20. Brenner M, Kisseberth WC, Su Y, Besnard F, Messing A. GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci.* 1994; 14(3 Pt 1):1030-1037.
21. Methot D, Reudelhuber TL, Silversides DW. Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23(22):4551-4556.
22. Harlow E, Lane D. *Antibodies: A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
23. van Kats JP, Methot D, Paradis P, Silversides DW, Reudelhuber TL. Use of a biological peptide pump to study chronic peptide hormone action in transgenic mice. Direct and indirect effects of angiotensin II on the heart. *J Biol Chem.* 2001; 276(47):44012-44017.

24. Prescott G, Silversides DW, Chiu SM, Reudelhuber TL. Contribution of circulating renin to local synthesis of angiotensin peptides in the heart. *Physiol Genomics*. 2000; 4(1):67-73.
25. Bennett JP, Jr., Snyder SH. Angiotensin II binding to mammalian brain membranes. *J Biol Chem*. 1976; 251(23):7423-7430.
26. Touyz RM, Tolloczko B, Schiffrin EL. Mesenteric vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats display increased calcium responses to angiotensin II but not to endothelin-1. *J Hypertens*. 1994; 12(6):663-673.
27. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985; 260(6):3440-3450.
28. Methot D, LaPointe MC, Touyz RM, Yang XP, Carretero OA, Deschepper CF, Schiffrin EL, Thibault G, Reudelhuber TL. Tissue targeting of angiotensin peptides. *J Biol Chem*. 1997; 272(20):12994-12999.
29. Sardinia MF, Hanesworth JM, Krebs LT, Harding JW. AT<sub>4</sub> receptor binding characteristics: D-amino acid- and glycine-substituted peptides. *Peptides*. 1993; 14(5):949-954.
30. Gohlke P, Kox T, Jurgensen T, von Kugelgen S, Rascher W, Unger T, Culman J. Peripherally applied candesartan inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2002; 365(6):477-483.
31. Wright JW, Stublely L, Pederson ES, Kramar EA, Hanesworth JM, Harding JW. Contributions of the brain angiotensin IV-AT<sub>4</sub> receptor subtype system to spatial learning. *J Neurosci*. 1999; 19(10):3952-3961.
32. Fruitier-Arnaudin I, Cohen M, Bordenave S, Sannier F, Piot JM. Comparative effects of angiotensin IV and two hemorphins on angiotensin-converting enzyme activity. *Peptides*. 2002; 23(8):1465-1470.
33. Wright JW, Sullivan MJ, Petersen EP, Harding JW. Brain angiotensin II and III binding and dipsogenicity in the rabbit. *Brain Res*. 1985; 358(1-2):376-379.
34. Wright JW, Jensen LL, Roberts KA, Sardinia MF, Harding JW. Structure-function analyses of brain angiotensin control of pressor action in rats. *Am J Physiol*. 1989; 257(6 Pt 2):R1551-R1557.
35. Wright JW, Bechtholt AJ, Chambers SL, Harding JW. Angiotensin III and IV activation of the brain AT<sub>1</sub> receptor subtype in cardiovascular function. *Peptides*. 1996; 17(8):1365-1371.

36. Krebs LT, Kramar EA, Hanesworth JM, Sardinia MF, Ball AE, Wright JW, Harding JW. Characterization of the binding properties and physiological action of divalinal-angiotensin IV, a putative AT<sub>4</sub> receptor antagonist. *Regul Pept.* 1996; 67(2):123-130.
37. Champion HC, Czapla MA, Kadowitz PJ. Responses to angiotensin peptides are mediated by AT<sub>1</sub> receptors in the rat. *Am J Physiol.* 1998; 274(1 Pt 1):E115-E123.
38. Thomas WG, Qian H, Chang CS, Karnik S. Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin II (AT<sub>1A</sub>) receptor requires generation of a conformation that is distinct from the inositol phosphate-signaling state. *J Biol Chem.* 2000; 275(4):2893-2900.
39. Le MT, Vanderheyden PM, Szaszak M, Hunyady L, Vauquelin G. Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT<sub>1</sub> receptors. Distinct roles of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT<sub>1</sub> receptor activation. *J Biol Chem.* 2002; 277(26):23107-23110.

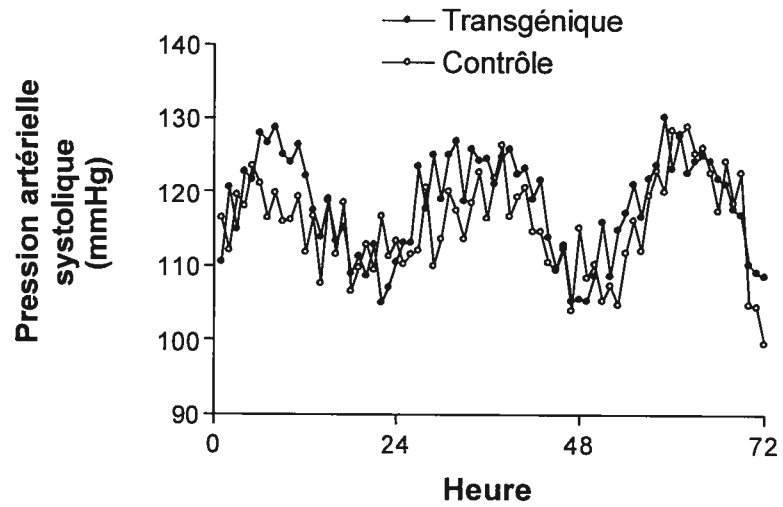
## **Chapitre 4**

### **Résultats additionnels et discussions**

#### 4.1 Caractérisation de l'hypertension artérielle des souris surexprimant les peptides Ang II et IV dans le SNC

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2, les souris transgéniques, surexprimant le peptide Ang II dans le cerveau, sont hypertendues (GFAP-Ang II :  $150 \pm 12$  vs  $123 \pm 6$  mmHg,  $n=10$  et  $P < 0.0001$ ). Pourtant, l'analyse histologique des cœurs de ces souris n'a révélé aucune trace d'hypertrophie cardiaque. On pourrait expliquer cette absence d'hypertrophie par une augmentation insuffisante de la PA, chez les souris GFAP-Ang II, pour déclencher les mécanismes compensatoires cardiaques. Or, des souris, avec sensiblement la même augmentation de PA (de  $114.8 \pm 4.9$  à  $145.6 \pm 6.7$  mmHg,  $n=8$  et  $P < 0.001$ ) que celle observée chez les souris GFAP-Ang II, après une libération chronique d'Ang II sous-cutanée ( $4.2$  ng/kg/min), développent une hypertrophie cardiaque (183). Ces résultats nous indiquent que l'augmentation de la PA, chez les souris GFAP-Ang II, devrait être suffisante pour déclencher une hypertrophie cardiaque. Il pourrait être avancé que l'hypertrophie cardiaque observée chez ces souris est le résultat d'un effet direct de l'Ang II sur le cœur et non secondaire à l'augmentation de la PA. Mais, rappelons que l'hypertrophie cardiaque est aussi présente chez les souris déficiente en Ang II (par inactivation de l'AGT) après une augmentation chronique de la PA provoquée par une surcharge de volume (153). Deux hypothèses pourraient expliquer l'absence d'hypertrophie cardiaque chez les souris GFAP-Ang II. La première hypothèse serait que les souris GFAP-Ang II développent une hypertension tardive, qui ne donnerait pas le temps aux mécanismes compensatoires cardiaques de se mettre en place avant le sacrifice de ces dernières pour les analyses histologiques (12 semaines d'âges). La deuxième hypothèse à considérer serait une hypertension artérielle transitoire, un phénomène qui s'apparenterait au "syndrome du sarreau blanc" chez l'humain. Une prise de la PA chez différents groupes d'âges de souris GFAP-Ang II (6, 8, 10 et 12 semaines) révèle que ces dernières étaient déjà hypertendues à l'âge de 6 semaines (GFAP-Ang II :  $147 \pm 10$ ; contrôle :  $123 \pm 10$  mmHg,  $n=8$  et  $P < 0.0001$ ). Ces résultats réfutent donc l'hypothèse de l'apparition d'une hypertension tardive de l'HTA chez les souris GFAP-Ang II.

La méthode de mesure de la PA par la queue a été utilisée au cours de cette étude. C'est une technique nécessitant que la souris soit restreinte par une chambre de contention et immobilisée sur une plaque chauffante (37°C), avec la queue fixée par un ruban adhésif, pour une période allant de 10 à 15 minutes. La prise de pression s'étale sur une période de 10 jours consécutifs, les 7 premiers jours permettent d'acclimater la souris à la chambre de contention et aux cycles gonflage/dégonflage du brassard placé autour de la queue. Les valeurs obtenues durant les 3 derniers jours sont compilées et analysées (341). Cette méthode s'est révélée très pratique, elle est non-invasive, elle favorise une lecture rapide et ne limite pas le nombre d'animaux qu'on peut utiliser au cours d'une expérience. Par contre, l'immobilisation requise, pour mesurer la pression par la queue, favorise une augmentation de la PA chez les animaux (10 à 20 mmHg) en comparaison à d'autres méthodes de mesure de la PA où l'animal est libre de ses mouvements, comme la radiotélémetrie ou le cathétérisme artériel (342-344). Aussi, une modulation à la hausse des récepteurs AT1 a été observée dans le cerveau, après une immobilisation aiguë ou chronique, chez la souris ou le rat (306;308). Dans un contexte de surexpression du peptide Ang II dans le cerveau, comme chez les souris GFAP-Ang II (GFAP-58.8 : 150±20, contrôle : 20±60 pg Ang II/g cerveau, n=6 et P<0.0001), ces récepteurs nouvellement exprimés pourraient être activés et favoriser ainsi une augmentation de la PA. Cette augmentation de la PA ne serait alors que transitoire et dépendrait de la durée d'application du facteur de stress et de la régulation de l'expression des récepteurs AT1. La technique de radiotélémetrie s'avère l'outil idéal pour tester cette hypothèse, chez les souris GFAP-Ang II. Dans cette technique, une fois que la sonde est implantée au niveau de la carotide de la souris, la PA est mesurée pendant que l'animal se promène librement dans sa cage. En utilisant la radiotélémetrie, nous n'avons observé aucune différence entre la PA des souris GFAP-Ang II et celle des souris contrôles (Figure 4.1). Ainsi, les souris GFAP-Ang II développent une hypertension artérielle transitoire, probablement reliée au stress généré par l'immobilisation. Ceci explique l'absence d'hypertrophie cardiaque chez les souris GFAP-Ang II.



**Figure 4-1. Mesure de la pression artérielle systolique par la radiotélémetrie**

Exemple de tracée de la pression artérielle systolique des souris GFAP-Ang II (lignée GFAP-58.8) et des souris contrôles sur une période de 72 heures (n=3 pour chaque groupe).



L'Ang II dans le SNC augmente directement la PA, en stimulant le système nerveux sympathique et indirectement, par la libération de la rénine par les reins, qui elle, contribue à augmenter le niveau de l'Ang II circulante (55;268). Ainsi, l'effet de l'activation du système nerveux sympathique, dans l'augmentation de la PA induite par l'immobilisation fut évalué chez les souris GFAP-Ang II en utilisant un bloqueur ganglionnaire : le chlorisondamine (5 mg/kg/ i.p, pour 4 jours). La pression est d'abord mesurée par la queue, comme décrit précédemment et le traitement est ensuite appliqué. Le chlorisondamine réduit de façon significative la PA des souris GFAP-Ang II et non celle des souris contrôles, suggérant une augmentation de l'activité sympathique chez les premières (GFAP-Ang II :  $144 \pm 8$  à  $118 \pm 12$  mmHg,  $n=6$  et  $P < 0.0001$ ; contrôle: de  $122 \pm 7$  à  $121 \pm 4$  mmHg,  $n=3$  et P ns).

Comme il a été décrit dans le chapitre 3, les souris, surexprimant le peptide Ang IV dans le cerveau, sont aussi hypertendues (GFAP-Ang IV :  $167 \pm 5$  mmHg; contrôle :  $123 \pm 12$  mmHg,  $n=10$  et  $P < 0.0001$ ). Par contre, un traitement avec un antagoniste du récepteur AT1 normalise la PA de ces dernières. Ainsi, les souris GFAP-Ang IV se comportent, du moins au point de vue de la PA, comme les souris GFAP-Ang II. Car, tout comme les souris GFAP-Ang II, les souris GFAP-Ang IV ne développent pas d'hypertrophie cardiaque et leur PA a pu être normalisée, par un traitement avec un bloqueur ganglionnaire, le chlorisondamine (GFAP-Ang IV :  $156 \pm 10$  à  $126 \pm 16$  mmHg,  $n=6$  et  $P < 0.0001$ ; contrôle: de  $122 \pm 7$  à  $121 \pm 4$  mmHg,  $n=3$  et P ns).

Nos résultats concordent avec les données contenues dans la littérature où, en dépit des différents modèles de transgéniques avec suractivation du SRA central, aucune présence d'hypertrophie cardiaque n'a été rapportée. Ces modèles se résument à la surexpression de l'AGT et de la rénine humaine dans le cerveau sous le contrôle du promoteur glial GFAP (glial fibrillary acidic protein) ou neuronal (synapsin-I promoter) (246;280;281). Contrairement à ce que nous avons observé, ces études rapportent une augmentation de la PA par radiotélémetrie (15 à 18 mmHg) chez ces transgéniques. Ces études ont utilisé la souche de souris C57BL/6 possédant une PA très basse, comparativement à la PA de la souche que nous avons

utilisée : la FVB/N ( $100 \pm 2$  mmHg versus  $120 \pm 8$  mmHg). Il se pourrait que cette différence dans la PA entre ces deux transgéniques soit reliée à une différence génétique. Le niveau de l'Ang II dans le cerveau serait aussi à considérer. Car, dans ces modèles transgéniques de suractivation du SRA le niveau des peptides angiotensines dans le cerveau n'a jamais été mesuré.

L'Ang II ou l'Ang IV dans le SNC pourrait contribuer à augmenter la PA, dans des situations de stress, probablement par l'activation des récepteurs AT1 qui semblent régulés à la hausse dans ces situations. Nous avons démontré dans nos études qu'un antagoniste du récepteur AT1 pouvait empêcher l'augmentation de la PA lors de la prise de pression par la queue chez les souris transgéniques GFAP-Ang II ou GFAP-Ang IV. Il reste toutefois à confirmer, par des méthodes autres que pharmacologiques, que l'expression des récepteurs AT1 est augmentée par l'immobilisation, dans le cerveau de ces souris.

#### **4.2 Importance de l'Ang II dans le SNC dans l'équilibre hydrique**

La polydipsie et la polyurie accompagnées d'une diminution de l'osmolalité urinaire caractérisent les souris déficientes en AGT (Figure 2.7). La polyurie semble être indépendante de la polydipsie, car même en absence d'eau les souris déficientes en AGT continuent d'excréter un volume excessif d'urine par rapport aux souris contrôles ( $1.55 \pm 0.08$  versus  $0.55 \pm 0.05$  ml/24 heures,  $P < 0.0001$ ) (Figure 2.7). Ce phénomène s'apparente au diabète insipide chez l'humain qui est caractérisé par un déficit dans la libération de la vasopressine. Le diabète insipide peut être aussi d'origine néphrogénique où, cette fois-ci, la vasopressine est libérée normalement mais les tubules rénaux ne répondent pas adéquatement à son action. La vasopressine est relâchée dans la circulation en réponse à une hypotension ou une augmentation de l'osmolalité plasmatique provoquée par une hypovolémie. Elle est une hormone à effet antidiurétique qui facilite la concentration de l'urine en stimulant la réabsorption d'eau au niveau des tubules rénaux. Il se pourrait qu'une combinaison des deux phénomènes précités soit présente chez les souris déficientes

en AGT. L'absence de l'Ang II dans le cerveau serait responsable d'un déficit dans la libération de la vasopressine et les problèmes rénaux, notamment la destruction de la médulla où sont logés les tubules collecteurs, empêcherait l'action de la vasopressine. À cet effet, une réduction significative du niveau plasmatique de la vasopressine ( $\approx 40\%$ ) a été observée chez les souris déficientes, soit en AGT, en AT1 ou en rénine, suggérant l'importance de l'Ang II dans la synthèse ou la libération de la vasopressine (237;282;283;345;346). La composante rénale dans la polyurie est mise en évidence par des études démontrant que l'injection intrapéritonéale de vasopressine n'est pas suffisante pour corriger le déficit dans la concentration urinaire des souris déficientes en AGT ou en rénine (Contrôle :  $583 \pm 84$  à  $2630 \pm 174$  mOsm, rénine-/- :  $624 \pm 19$  à  $656 \pm 25$  mOsm) (331;335). Cette incapacité de la vasopressine à stimuler la concentration de l'urine chez ces souris est probablement due à la destruction de la médulla.

En situation normale quand les souris ont libre accès à l'eau, la restitution de l'Ang II dans la circulation des souris déficientes en AGT (2C/AGT-/-) corrige l'osmolalité urinaire présente chez ces dernières. Par contre, la restitution de l'Ang II dans le cerveau des souris déficientes en AGT (GFAP-Ang II/AGT-/-) ne corrige pas l'osmolalité l'urinaire de ces souris (Figure 2.7). Cette correction de l'osmolalité urinaire par la restitution de l'Ang II circulante ne peut pas être uniquement attribuée à la correction de l'hydronéphrose, car les souris dont l'Ang II a été restituée dans le cerveau ont une osmolalité urinaire identique à celle des souris déficientes en AGT en dépit de l'absence de l'hydronéphrose. L'Ang II circulante pourrait exercer un effet direct sur les tubules rénaux et stimuler la réabsorption d'eau et de sodium; l'absence de l'hydronéphrose ne ferait que potentialiser cet effet. En revanche, la situation s'inverse en présence d'une restriction hydrique. Dans ce cas, la restitution de l'Ang II dans le cerveau permet aux souris déficientes en AGT de répondre adéquatement à cette restriction hydrique et non la restitution de l'Ang II dans la circulation (Figure 2.6). Si on compare l'efficacité de concentration urinaire, après une période de restriction hydrique de 24 heures, on constate qu'il n'y a pas de différence entre les souris déficientes en AGT qui surexpriment l'Ang II dans le cerveau et les contrôles (Contrôle : 104%; GFAP-Ang II/AGT-/- : 94%;

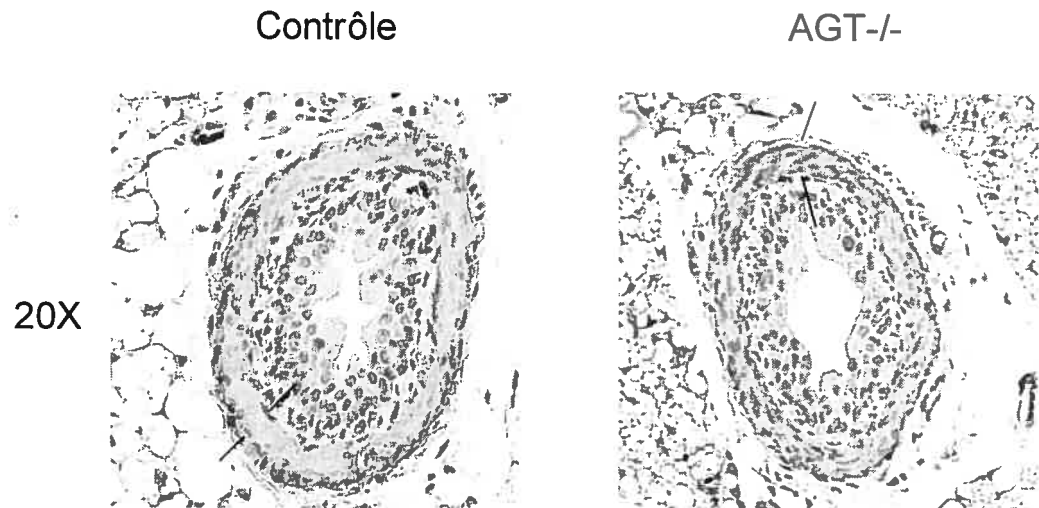
AGT<sup>-/-</sup> : 18%; 2C/AGT<sup>-/-</sup>: 20%). Le site de synthèse de la vasopressine se retrouve au niveau de l'hypothalamus (PVN), une région protégée par la barrière hémato-encéphalique et donc inaccessible à l'Ang II circulante. Il est possible que la synthèse et/ou la libération de la vasopressine soit en partie régulée par l'Ang II dans le cerveau, ce qui pourrait expliquer l'inefficacité de la restitution de l'Ang II dans la circulation des souris déficientes en AGT à favoriser la concentration de l'urine après une restriction hydrique. Une comparaison du niveau de la vasopressine dans le plasma et dans le cerveau des souris GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup> et des souris 2C/AGT<sup>-/-</sup> après une période de restriction hydrique serait appropriée et permettrait de vérifier cette hypothèse.

#### **4.3 Mécanismes d'action du SRA central dans la correction de l'hydronéphrose**

Nous avons rapporté dans le chapitre 2 une correction de l'hydronéphrose chez les souris déficientes en AGT, par la restitution de l'Ang II dans le cerveau ou dans la circulation (Figure 2.6). Nous pensons que le site d'action du SRA, dans la correction de l'hydronéphrose se situe au niveau du cerveau pour les raisons suivantes. Premièrement, la surexpression de l'Ang II chez les souris GFAP-Ang II est limitée au cerveau et ne se déverse pas dans la circulation; de plus, l'Ang II dans le cerveau est plus efficace (22/22) que l'Ang II circulante (8/10) à corriger l'hydronéphrose des souris déficientes en AGT. Deuxièmement, l'Ang II dans la circulation peut agir sur le cerveau par l'intermédiaire des régions du CVOs, qui elles, sont dépourvues d'une barrière hémato-encéphalique. Rappelons que les souris déficientes en AGT naissent avec des reins normaux et que l'hydronéphrose n'apparaît que 3 semaines après la naissance. Les mécanismes impliqués semblent être un défaut d'adaptation des reins à produire et à excréter l'urine adéquatement, au lieu d'un problème de développement proprement dit. Il a été rapporté que les souris déficientes en AT1, sur le fond génétique C57BL/6, ont une diminution significative de la couche des cellules musculaires lisses entourant l'uretère, ainsi qu'une absence de mouvement péristaltique (347;348). Ces deux phénomènes combinés seraient responsables d'un reflux urinaire de la vessie vers les reins, résultant en une

destruction de la médulla et de l'apparition de l'hydronéphrose. Par contre, nos résultats démontrent la même fréquence de mouvements péristaltiques de l'uretère, chez les souris contrôles que chez les souris déficientes en AGT sur le fond génétique FVB/N (AGT-FVB/N) (Contrôle :  $8.4 \pm 1.7$ ; AGT-/- :  $6.4 \pm 2.5$ ; mouvements/minute, ns), déterminée pendant qu'elles étaient sous anesthésie et perfusées avec une solution saline (0.9%). De même, la couche de cellules musculaires lisses entourant l'uretère de ces souris, vérifiée par immunohistochimie, demeure normale (Figure 4.2). L'absence de cellules musculaires lisses ou de mouvements péristaltiques, au niveau de l'uretère, ne semblent pas être la cause de l'hydronéphrose chez les souris déficientes en AGT-FVB/N. Plusieurs indices pointent vers un défaut de fonctionnement au niveau de l'uretère ou de l'urètre. Nous avons souvent observé, chez les souris déficientes en AGT, des reins complètement détruits où ils ne restaient que la capsule rénale et la vessie complètement engorgées d'urine (Figure 4.3). Ces observations suggèrent la présence d'une obstruction dans les conduits urinaires, uretère et/ou urètre, ou celle d'un défaut de relaxation du sphincter urétral contrôlant la miction.

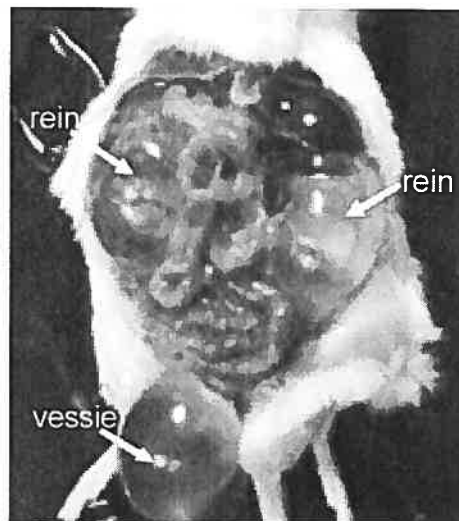
Nous avons évalué par rayons X la possibilité que des calculs soient présents dans le système urinaire des souris déficientes en AGT, ce qui pourrait résulter en un blocage physique de l'écoulement de l'urine. Les résultats obtenus se sont révélés négatifs. Le seul phénotype que nous avons pu relever chez les souris déficientes en AGT, est une atrophie urétrale se caractérisant par une augmentation des fibres musculaires lisses entourant la lumière de l'urètre, de même qu'un épaississement de la paroi urétrale (Figure 4.3). Ce changement de morphologie pourrait altérer les contractions normales de l'urètre et empêcher l'écoulement normal de l'urine, ce qui aurait pour conséquence un engorgement de la vessie et éventuellement un reflux de l'urine vers les reins. La présence de cette hypertrophie urétrale, chez les souris déficientes en AGT aurait pu s'expliquer par une diminution de l'apoptose, lors de la néphrogenèse, en absence d'Ang II pour stimuler les récepteurs AT2. Cette hypothèse n'est pas plausible, car chez les souris GFAP-Ang II/AGT-/- il n'y a pas d'Ang II dans la circulation et pourtant ces souris ne développent aucune hydronéphrose. Nous avançons donc l'hypothèse d'un défaut de stimulation



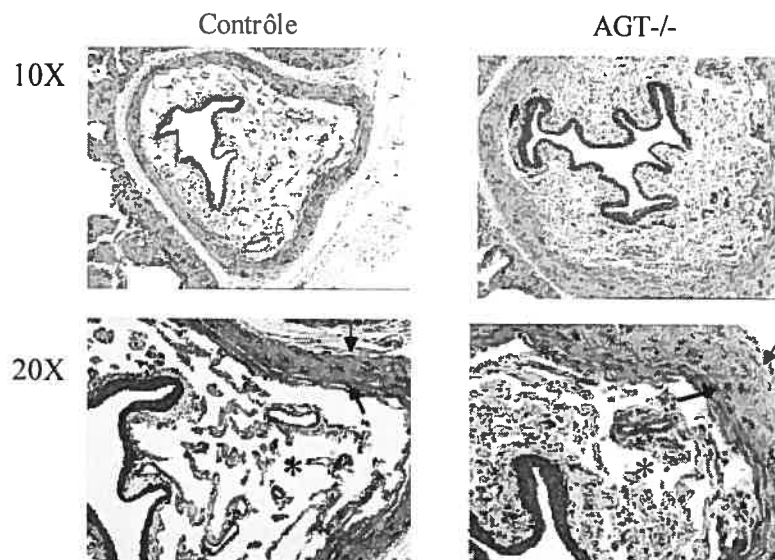
**Figure 4-2. Histologie de l'uretère des souris déficientes en AGT**

La couche de cellules musculaires lisses (entre les deux flèches), entourant l'uretère, a été révélée par un anticorps dirigé contre l'actine de muscle lisse (SMA pour smooth muscle actin)

A



B



**Figure 4-3. Pathophysiologie et histologie du système urinaire des souris déficientes en AGT**

A) Photo d'une souris déficiente en AGT avec les reins et la vessie engorgés d'urine  
 B) Coupe histologique de l'urètre colorée à l'hématoxyline-éosine. L'épaisseur de la paroi urétrale est indiquée entre les deux flèches et l'astérisque montre les fibres musculaires lisses.

sympathique de l'urètre, chez les souris déficientes en AGT, qui se traduirait à long terme par une rigidité au niveau de l'urètre et/ou du sphincter urétral, empêchant l'écoulement normal de l'urine, ceci aurait pour conséquence, un reflux urinaire amenant à l'hydronéphrose. Cette hypothèse est appuyée par le délai qu'on observe avant l'apparition de l'hydronéphrose, chez les souris déficientes en AGT; un délai nécessaire pour donner le temps au reflux urinaire de causer les dommages au niveau de la médulla. L'analyse histologique de l'urètre des souris GFAP-Ang II/AGT<sup>-/-</sup> et des souris 2C/AGT<sup>-/-</sup> serait nécessaire afin de valider cette hypothèse.

Il y a des évidences dans la littérature qui soutiennent le rôle du SNC dans l'apparition de l'hydronéphrose. Des études ont démontré qu'une obstruction partielle de la vessie chez le lapin entraînait une hypertrophie urétrale se traduisant par une diminution ( $\approx 50\%$ ) de la force contractile de l'urètre en réponse à une stimulation électrique ou de la phényléphrine (349). Les personnes ayant une blessure de la moelle épinière, entre autres, les paraplégiques, développent de l'hydronéphrose, le plus souvent associée à un défaut de relaxation du sphincter urétral. Ces gens doivent alors utiliser un moyen mécanique pour évacuer leur urine (350;351). En outre, l'analyse histologique de l'urètre, prélevé lors de chirurgies reconstructives chez des enfants souffrant d'hydronéphrose, démontre une réduction significative de l'innervation. Ce défaut d'innervation a été mis en évidence par des études immunohistochimiques regardant la distribution du récepteur NGF-R (nerve growth factor receptor), un marqueur neuronal (352)

#### **4.4 L'activation des récepteurs AT1 par l'Ang IV**

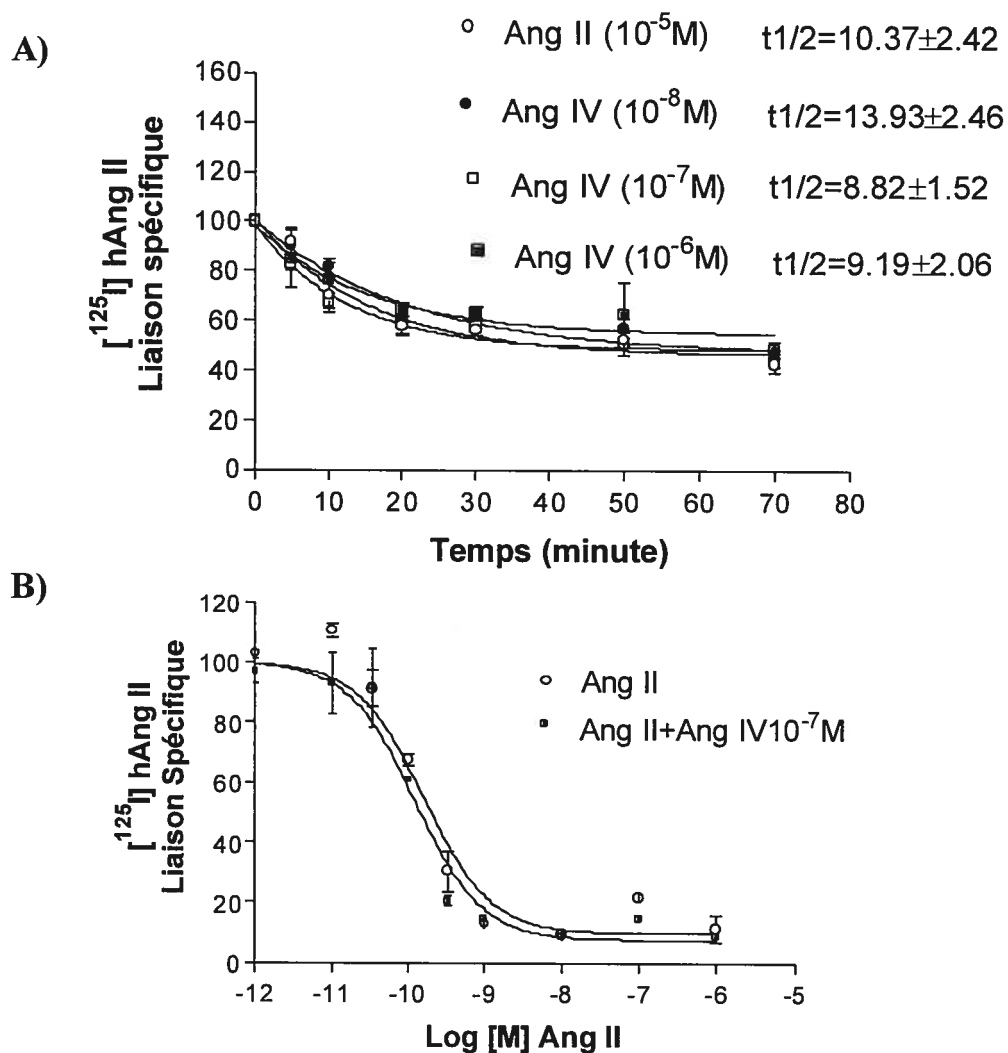
La caractérisation des souris transgéniques, surexprimant le peptide Ang IV (GFAP-Ang IV) dans le cerveau, est présentée dans le chapitre 3. Comme il y est mentionné, les souris GFAP-Ang IV sont hypertendues et le traitement à l'aide d'un antagoniste du récepteur AT1, le candesartan, prévient l'augmentation de la PA chez ces dernières. Cette activation du récepteur AT1 par l'Ang IV semble dépendre de la présence du peptide Ang II. En effet, l'Ang IV ne peut stimuler une libération de calcium intracellulaire par les cellules CHO exprimant le récepteur AT1



(CHO-AT1), si ces dernières ne sont pas préalablement traitées avec l'Ang II (Figure 3.8). De plus, l'Ang IV ne peut déplacer le peptide Ang II radioactive des cellules CHO-AT1, suggérant une liaison ailleurs que sur le site actif du récepteur AT1. En se basant sur ces résultats, nous avons proposé un mécanisme d'activation allostérique du récepteur AT1 par l'Ang IV.

L'effet d'un modulateur allostérique sur un récepteur peut se traduire soit, par un changement de l'affinité de ce dernier pour son agoniste, ou de son activité proprement dite. Nous avons évalué l'effet de l'Ang IV sur l'affinité du récepteur AT1 pour Ang II, par des études de dissociation ou de déplacement de l'Ang II, en présence des concentrations croissantes d'Ang IV et ceci en utilisant des cellules CHO-AT1 en culture. La présence de l'Ang IV ne semble affecter ni la dissociation, ni l'affinité du récepteur AT1 pour l'Ang II (Figure 4-4). Ces résultats suggèrent que l'effet de l'Ang IV sur AT1 s'effectue par la modulation de l'activité du récepteur, comme il a été observé lors des essais sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules CHO-AT1 en culture (Figure 3.8). Avant de confirmer le rôle de l'Ang IV dans la modulation de l'activité du récepteur AT1, il faudrait regarder d'autres voies de signalisations qui sont en aval du récepteur AT1, comme la production d'IP3 et la phosphorylation des kinases, comme par exemple : ERK. Aussi, des courbes doses-réponses de l'Ang II en présence ou absence d'Ang IV seraient aussi appropriées.

Le fait que le peptide Ang IV médie ses effets sur la PA, en activant les récepteurs AT1, nous porte à reconsidérer un autre aspect de l'activation de ces récepteurs. L'affinité du récepteur AT1 pour le peptide Ang II est de l'ordre du nanomolaire ( $K_d = 10^{-9}$  M), mais les études de stimulation du récepteur AT1 *in vitro* requièrent une concentration d'Ang II qui est de 10 à 100 fois plus élevée ( $10^{-8}$  à  $10^{-7}$  M) que le  $K_d$  du récepteur AT1 pour stimuler une réponse, comme la phosphorylation de la kinase ERK. Il se pourrait qu'*in vivo*, la présence des autres peptides angiotensines, comme l'Ang III et l'Ang IV, contribue aux effets physiologiques du récepteur AT1, où la concentration circulante d'Ang II est de l'ordre de  $10^{-12}$  M (353). L'existence des différentes formes de transition lors de



**Figure 4-4. Effet de l'Ang IV sur l'affinité du récepteur AT1 pour l'Ang II**

A) Les cellules CHO-AT1 sont préalablement incubées avec l'Ang II radioactive, pour une période initiale de 90 minutes, et la dissociation évaluée en fonction du temps par l'Ang II en absence ou en présence de différentes concentrations d'Ang IV;  $t_{1/2}$  : en minute.

B) La courbe B représente le déplacement de l'Ang II humaine marquée ( $[^{125}I]$ -Ang II) des cellules CHO-AT1 par l'Ang II en absence ou en présence d'Ang IV.

l'activation du récepteur AT1 pourrait faciliter la liaison des autres peptides angiotensines et contribuer aux effets médiés par l'activation des récepteurs AT1. À cet effet, il a été démontré que le récepteur AT1, constitutivement actif (N111G-AT1) peut lier le peptide Ang IV avec une affinité 900 fois plus élevée que celle du récepteur AT1 natif ( $\approx 1000$  à  $14.5 \pm 3.4$  nM), et ce sans affecter l'ordre d'affinité de liaison des peptides Ang II et Ang III ( $K_d$ : Ang II:  $13.9 \pm 3.2$  à  $1.08 \pm 0.23$ ; Ang III:  $18.2 \pm 0.9$  à  $3.38 \pm 0.64$  nM) (354). On pourrait toujours se questionner sur l'existence de ces formes de transition *in vivo*, mais le fait est qu'on a une différence dans les concentrations d'Ang II nécessaires pour stimuler l'activation des récepteurs AT1 *in vivo* et de celles requises pour avoir un effet *in vitro*. Il est possible que l'absence des peptides Ang III et Ang IV, lors des études de stimulation *in vitro*, justifie la forte concentration d'Ang II nécessaire pour stimuler le récepteur AT1.

L'activation des récepteurs AT1 par le peptide Ang IV est rapportée dans plusieurs phénomènes produits par l'Ang IV comme la stimulation de la soif, l'augmentation de la PA et l'activation des tyrosines kinases (98;113;339;355). Par contre, les effets de l'Ang IV, dans la facilitation des processus de mémorisation et d'apprentissage semblent se faire par l'activation des récepteurs AT4, car ils sont inhibés par l'antagoniste des récepteurs AT4, le divalinal, et non par les antagonistes des récepteurs AT1 ou AT2 (106;311;356). Ainsi, le peptide Ang IV peut activer deux types de récepteurs (AT1 ou AT4) et déclencher des effets physiologiques différents. La concentration d'Ang IV présent pourrait jouer un rôle dans le choix du récepteur qui serait activé. L'affinité du récepteur AT4 pour le peptide Ang IV est de l'ordre du nanomolaire ( $10^{-9}$ M), tandis que l'affinité du récepteur AT1 pour l'Ang IV est de l'ordre du micromolaire ( $10^{-6}$ M); ainsi l'Ang IV lierait préférentiellement les récepteurs AT4. L'augmentation de la PA observée chez les souris GFAP-Ang IV dépend de l'activation des récepteurs AT1, tandis que la concentration du peptide Ang IV est de l'ordre du picogramme ( $88.8 \pm 17.6$  pg/g cerveau). Aussi, des concentrations équivalentes d'Ang IV (100 pM) injectées dans les ventricules cérébraux sont effectives, tant dans la stimulation de la PA (par l'activation des

récepteurs AT1) que dans la facilitation des fonctions cognitives (par l'activation des récepteurs AT4) (102;105;303). Le niveau d'expression des récepteurs, à la surface membranaire, pourrait être un mécanisme à considérer dans l'activation des récepteurs AT1 ou AT4 par l'Ang IV. L'IRAP, identifiée comme étant le récepteur d'AT4, se retrouve principalement ( $\approx 90\%$ ) dans les endosomes ainsi que le transporteur du glucose GLUT4, en absence d'insuline; l'IRAP est cependant relocalisée à la membrane plasmique, en même temps que GLUT4, lorsqu'en présence d'insuline (194). Ainsi, le récepteur n'est pas disponible pour lier le peptide Ang IV. Plusieurs évidences, dans la littérature, supportent le rôle du glucose dans les fonctions cognitives. Les neurones ne synthétisent ni n'emmagasinent le glucose, puisant leur énergie du glucose présent dans le milieu extracellulaire transporté par la circulation (357). Lors des tests évaluant les fonctions cognitives chez le rat, le niveau de glucose extracellulaire diminue dans les régions où les neurones sont activés (hippocampe), et cette diminution de glucose est d'autant plus importante que la tâche demandée est difficile (358). Il a été rapporté que l'injection de glucose dans les ventricules cérébraux, chez le rat, corrige les pertes de mémoire provoquées par une injection de morphine (359). Des problèmes de mémoire ont été rapportés chez des gens diabétiques, chez qui, le métabolisme du glucose est altéré (360). L'activation des neurones engendre donc un métabolisme accru du glucose, qui favorise la relocalisation du transporteur du glucose GLUT4 des endosomes à la membrane plasmique et aussi de l'IRAP. Ainsi, l'IRAP serait présent principalement dans les régions du cerveau où les neurones sont activés et il favoriserait la liaison du peptide Ang IV. Notre modèle de souris transgéniques exprimant le peptide Ang IV, dans le cerveau, pourrait s'avérer un excellent outil pour évaluer cette hypothèse concernant l'activation des récepteurs AT4.

## 4.5 Conclusion

Les modèles de transgéniques ayant une suractivation du SRA nécessitent la surexpression d'au moins deux composants du SRA, soit la rénine et l'AGT. Dans ces modèles, le niveau et l'identité des peptides angiotensines impliqués dans les effets observés ne sont pas connus. Les effets d'une production chronique de l'Ang IV dans le cerveau, un des métabolites de l'Ang II, possédant son propre récepteur, n'a jamais été étudié. Nous avons, au long de cette étude, utilisé une autre approche pour suractiver le SRA du cerveau en utilisant une protéine de fusion capable de relâcher directement les peptides Ang II ou Ang IV, sous le contrôle du promoteur GFAP. Cette approche s'est révélée efficace et on a pu démontrer une augmentation significative des peptides Ang II ou Ang IV dans le cerveau des souris transgéniques respectives. Cette méthode pourra être mise à profit dans des études futures pour étudier les effets des autres SRA tissulaires. Nous avons démontré que la surexpression des peptides Ang II ou Ang IV dans le cerveau rendait les souris susceptibles à développer une forme d'hypertension artérielle, conditionnelle et reliée à un facteur de stress. Ainsi, l'activation du SRA pourrait être un facteur important à considérer dans les cas d'hypertensions artérielles médiés par le stress. Nos résultats confirment que le peptide Ang IV, tout comme l'Ang II, est un peptide actif du SRA. Nous avons démontré que l'effet de l'Ang IV sur la PA est relié à l'activation des récepteurs AT1 et non des récepteurs AT4. Ainsi, notre modèle de souris transgéniques, exprimant le peptide Ang IV dans le cerveau, serait un outil excellent pour étudier et mieux comprendre le rôle des récepteurs AT4 dans le cerveau, qui eux semblent impliqués dans les fonctions cognitives. Nous avons aussi évalué l'effet de l'Ang II, dans le cerveau sur les anomalies rénales chez les souris déficientes en AGT. L'importance de l'Ang II dans le SNC a été mise en évidence dans la prévention de l'hydronéphrose ainsi que dans la correction de l'incapacité à concentrer l'urine, après une restriction hydrique, chez les souris déficientes en AGT.

Ces résultats constituent un pas important vers l'élucidation des mécanismes par lesquels le SRA affecte les structures rénales.

#### 4.6 Perspectives

Les modèles de transgéniques générés et les résultats obtenus pourraient être utilisés pour initier de nouveaux projets de recherches sur le rôle du SRA dans le SNC ainsi que pour évaluer les effets du peptide Ang IV en périphérie.

1. Nous avons constaté la présence d'une hypertrophie urétrale chez les souris déficientes en AGT. Si cette atrophie urétrale est une des causes de l'hydronéphrose, elle devrait disparaître chez les souris déficientes en AGT chez qui l'hydronéphrose a été corrigée par la restitution de l'Ang II dans le cerveau ou dans la circulation. Une analyse histologique de l'urètre de ces souris permettrait de répondre à cette question. L'innervation de l'uretère et de l'urètre pourrait être aussi examinée par immunohistochimie en regardant la distribution du récepteur neuronal NGF-R.
2. L'Alzheimer est une affection neurodégénérative se caractérisant par la formation des plaques amyloïdes causant la mort des cellules neuronales et affectant particulièrement les fonctions cognitives de la personne atteinte. Selon statistiques Canada, cette maladie toucherait 10% de la population de 60 ans et plus, et elle atteindrait jusqu'à 40% dans le groupe d'âge des 85 ans et plus. Des modèles de souris transgéniques, pour l'Alzheimer, ont été générés par la surexpression du précurseur de la protéine amyloïde humaine. Ces souris développent les caractéristiques pathologiques de l'Alzheimer (361;362). Les études d'injection i.c.v du peptide Ang IV ont démontré la capacité de ce peptide à faciliter les fonctions cognitives après une destruction des cellules neuronales, par des méthodes chimiques (injection de scopolamine, un inhibiteur des récepteurs muscariniques) ou mécaniques (perforation ciblée de l'hippocampe) (105;106). Bien que les effets de l'Ang IV, dans la stimulation des fonctions cognitives, soient bien connus, l'absence d'un modèle animal, surexprimant le peptide Ang IV constitue l'étape

limitante dans la mise en place des études qui pourraient évaluer son effet, dans la perte de mémoire générée par les maladies neurodégénératives. A notre connaissance, notre modèle de souris transgéniques surexprimant le peptide Ang IV dans le cerveau est une première et pourrait être un excellent outil pour répondre à ce genre de question. On pourrait croiser les souris GFAP-Ang IV avec celles qui souffrent d'Alzheimer et évaluer l'effet de l'Ang IV sur la fonction cognitive de ces dernières. Il serait aussi important d'évaluer, dans des études cliniques, la relation entre les inhibiteurs du SRA et la progression de la perte de mémoire chez les personnes atteintes d'Alzheimer. Car, une diminution significative de l'activité de l'ECA est observée dans le liquide cébrospinal des patients souffrant d'Alzheimer (314). Ces études cliniques pourraient donner une meilleure idée sur la relation entre les peptides angiotensines et les fonctions cognitives.

3. En plus du cerveau, les récepteurs AT4 sont présents dans plusieurs organes en périphérie comme le cœur, les reins, les surrénales et les poumons (101;188;363). Les fonctions reliées à l'activation de ces récepteurs dans ces différents tissus ne sont pas encore connues. La protéine de fusion libérant le peptide Ang IV pourrait être utilisée afin d'étudier le rôle de l'Ang IV dans ces différents tissus. Un effet vasodilatateur de l'Ang IV a été rapporté au niveau des vaisseaux pulmonaire isolés, et serait du à l'activation des récepteurs AT4 (363;364). L'hypertension artérielle pulmonaire est secondaire à une vasoconstriction anormale au niveau des poumons. Elle se caractérise par un essoufflement lors de l'effort et une fatigue chronique, probablement reliée à l'hypoxie. Les moyens de traitement de l'hypertension pulmonaire n'incluent pas les inhibiteurs du SRA et font plutôt appel à des molécules qui favorisent la vasodilatation, comme les prostacyclines et les inhibiteurs de l'endothéline (365;366). Il serait intéressant de surexprimer le peptide Ang IV dans les cellules endothéliales, dans un modèle animal d'hypertension artérielle pulmonaire, et d'évaluer son effet sur la vasodilatation pulmonaire.

4. Il est généralement accepté que le peptide Ang IV puisse activer les récepteurs AT1, mais il n'y a pas de consensus sur les mécanismes qui sont impliqués. Nous avons démontré, au cours de cette étude, que l'Ang IV peut stimuler une augmentation du niveau de calcium intracellulaire dans les cellules CHO transfectées avec le récepteur AT1. La provenance du calcium pourrait être investiguée en utilisant des inhibiteurs spécifiques aux canaux calciques (influx de calcium) ou des récepteurs ryanodines sur le réticulum sarcoplasmique (libération intracellulaire). Il serait aussi intéressant de regarder les voies de signalisation, en aval du récepteur AT1 dans les cellules stimulées par l'Ang IV, comme la production d'IP3, l'activité des tyrosines kinases ainsi que la phosphorylation des kinases comme ERK. Dans ces études, il faudrait utiliser des lignées cellulaires qui n'expriment pas l'IRAP de façon endogène, comme les cellules HEK, afin de démontrer que les effets sont dus exclusivement à l'activation des récepteurs AT1. Les effets de l'Ang IV sur AT1 semblent moduler l'activité sans pour autant affecter l'affinité du récepteur AT1 pour l'Ang II. Une façon d'évaluer l'effet de l'Ang IV, sur l'activité du récepteur AT1, serait de réaliser des études de stimulation où serait comparée l'efficacité de l'Ang II à stimuler le récepteur AT1 ( $EC_{50}$ ) en absence ou présence de différentes concentrations d'Ang IV.
5. Il existe des liens entre le stress et la susceptibilité de développer une hypertension artérielle. Les gens qui répondent à un stress émotionnel, par une augmentation de leur PA, sont susceptibles de développer l'hypertension artérielle à long terme (367). Nos modèles de transgéniques, surexprimant le peptide Ang II et l'Ang IV dans le cerveau, sont susceptibles au stress (immobilisation) et répondent par une augmentation significative de leur PA. On pourrait utiliser ces souris comme modèles animaux pour étudier le lien entre un stress chronique et le développement d'une hypertension artérielle soutenue.



## Bibliographie

1. Bright, R. (1836) Case and observations illustrative of renal disease accompanied with the secretion of albuminous urine, *Guy's Hospital Report* 1, 338.
2. Tigestedt, R. and Bergman, P.G (1898) Niere und Kreislauf (Kidney and Circulation), *Skandinavisches Archiv fur Physiologie* 8, 223-271.
3. Goldblatt, H. L, Lynch, J., Hanzal, R. F, and Summerville, W.W (1934) Studies on experimental hypertension, I: The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia, *J Exp Med* 59, 347-380.
4. Kohlstaedt, K. G., Helmer O. M., Page, I. H. (1938) Activation of renin by blood colloids, *Proc Soc Exp Biol Med* 39, 214-215.
5. Braun-Menéndez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L.F., Munoz, J.M. (1939) La sustancia hipertensora de la sangre del riñón isquemiado, *Rev Soc Arg Biol* 15, 420-425.
6. Page, I. H. and Helmer, O. H. (1940) A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the interaction between renin and renin-activator, *J Exp Med* 71, 29-42.
7. Braun-Menéndez E; Page, I. H. (1958) Suggested revision of nomenclature: angiotensin, *Science* 127, 242.
8. Skeggs L.T., Jr., Marsh, W. H., Kahn, J. R., and Shumway, N. P. (1954) The existence of two forms of hypertensin, *J Exp Med* 99, 275-282.
9. Skeggs, L. T., Jr., Kahn, J. R., and Shumway, N. P. (1956) The purification of hypertensin II, *J Exp Med* 103, 301-307.
10. Skeggs, L. T. Jr., Lentz, K. E., Kahn, J. R., Shumway, N. P., and Woods, K. R. (1956) The amino acid sequence of hypertensin. II, *J Exp Med* 104, 193-197.
11. Skeggs, L. T. Jr., Kahn, J. R., and Shumway, N. P. (1956) The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme, *J. Exp. Med.* 103, 295-299.
12. Bumpus, F. M., Schwarz, H., and Page, I. H. (1957) Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin, *Science* 125, 886-887.

13. Laragh, J. H., Angers, M., Kelly, W. G., and Lieberman, S. (1960) Hypotensive agents and pressor substances. The effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II, and others on the secretory rate of aldosterone in man, *JAMA* 174, 234-240.
14. Boyd, G. W., Fitz, A. E., Adamson, A. R., and Peart, W. S. (1969) Radioimmunoassay determination of plasma-renin activity, *Lancet* 1, 213-218.
15. Mulrow, P. J. and Ganong, W. F. (1961) Stimulation of aldosterone secretion by angiotensin. II. A preliminary report, *Yale J Biol. Med* 33, 386-395.
16. Ondetti, M. A., Rubin, B., and Cushman, D. W. (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents, *Science* 196, 441-444.
17. Brunner, H. R., Gavras, H., Turini, G. A., Waeber, B., Cappuis, P., and McKinsty, D. N. (1978) Long-term treatment of hypertension in man by an orally active angiotensin-converting enzyme inhibitor, *Clin. Sci. Mol. Med. Suppl* 4, 293s-295s.
18. Antonaccio, M. J., Harris, D., Goldenberg, H., High, J. P., and Rubin, B. (1979) The effects of captopril, propranolol, and indomethacin on blood pressure and plasma renin activity in spontaneously hypertensive and normotensive rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 162, 429-433.
19. Harris, D. N., Heran, C. L., Goldenberg, H. J., High, J. P., Laffan, R. J., Rubin, B., Antonaccio, M. J., and Goldberg, M. E. (1978) Effects of SQ 14,225, an orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme on blood pressure, heart rate and plasma renin activity of conscious normotensive dogs, *Eur. J. Pharmacol.* 51, 345-349.
20. Matthews, P. G. and Johnston, C. I. (1979) Responses of the renin-angiotensin system and kallikrein-kinin system to sodium and converting enzyme inhibitor (SQ 14,225), *Adv. Exp. Med. Biol.* 120B, 447-457.
21. Ignjacev-Lazich, I., Kintsurashvili, E., Johns, C., Vitseva, O., Duka, A., Shenouda, S., Gavras, I., and Gavras, H. (2005) Angiotensin-converting enzyme regulates bradykinin receptor gene expression, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 289, H1814-H1820.
22. Christen, Y., Waeber, B., Nussberger, J., Porchet, M., Borland, R. M., Lee, R. J., Maggon, K., Shum, L., Timmermans, P. B., and Brunner, H. R. (1991) Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II, *Circulation* 83, 1333-1342.

23. Weber, C., Birnbock, H., Leube, J., Kobrin, I., Kleinbloesem, C. H., and Van, B. P. (1993) Multiple dose pharmacokinetics and concentration effect relationship of the orally active renin inhibitor remikiren (Ro 42-5892) in hypertensive patients, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 36, 547-554.
24. Rongen, G. A., Lenders, J. W., Kleinbloesem, C. H., Weber, C., Welker, H., Fahrner, E., Pozenel, H., Woittiez, A. J., Haug, G., Buchmann, M. S., and . (1993) Efficacy and tolerability of the renin inhibitor Ro 42-5892 in patients with hypertension, *Clin. Pharmacol. Ther.* 54, 567-577.
25. Ohkubo, H., Kageyama, R., Ujihara, M., Hirose, T., Inayama, S., and Nakanishi, S. (1983) Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 2196-2200.
26. Roy, S. N., Kusari, J., Soffer, R. L., Lai, C. Y., and Sen, G. C. (1988) Isolation of cDNA clones of rabbit angiotensin converting enzyme: identification of two distinct mRNAs for the pulmonary and the testicular isozymes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 678-684.
27. Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J. E., Pratt, R. E., Kobilka, B. K., and Dzau, V. J. (1992) Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 253-259.
28. Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T., and Inagami, T. (1993) Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition, *J. Biol. Chem.* 268, 24543-24546.
29. Murakami, K. and Fukamizu, A. (1999) Transgenic and knockout models in renin-angiotensin system, *Immunopharmacology* 44, 1-7.
30. Taniguchi, K., Sugiyama, F., Kakinuma, Y., Uehara, S., Nishijho, N., Tanimoto, K., Murakami, K., Fukamizu, A., and Yagami, K. I. (1998) Pathologic characterization of hypotensive C57BL/6J-agt: angiotensinogen-deficient C57BL/6J mice, *Int. J. Mol. Med.* 1, 583-587.
31. Kim, H. S., Krege, J. H., Kluckman, K. D., Hagaman, J. R., Hodgin, J. B., Best, C. F., Jennette, J. C., Coffman, T. M., Maeda, N., and Smithies, O. (1995) Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 2735-2739.
32. Mullins, J. J., Peters, J., and Ganten, D. (1990) Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene, *Nature* 344, 541-544.

33. Unger, T., Ganten, D., and Lang, R. E. (1986) Tissue converting enzyme and cardiovascular actions of converting enzyme inhibitors, *J. Cardiovasc. Pharmacol. 8 Suppl 10*, S75-S81.
34. Ganten, D., Hermann, K., Unger, T., and Lang, R. E. (1983) The tissue renin-angiotensin systems: focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall, *Clin. Exp. Hypertens. A 5*, 1099-1118.
35. Lew, R. A., Mustafa, T., Ye, S., McDowall, S. G., Chai, S. Y., and Albiston, A. L. (2003) Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP), *J. Neurochem. 86*, 344-350.
36. Albiston, A. L., McDowall, S. G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F. A., Simpson, R. J., Connolly, L. M., and Chai, S. Y. (2001) Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase, *J. Biol. Chem. 276*, 48623-48626.
37. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., and Acton, S. (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9, *Circ. Res. 87*, E1-E9.
38. Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M., LeDuc, J. W., Bellini, W. J., and Anderson, L. J. (2003) A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, *N. Engl. J. Med. 348*, 1953-1966.
39. Nicholls, J. M., Poon, L. L., Lee, K. C., Ng, W. F., Lai, S. T., Leung, C. Y., Chu, C. M., Hui, P. K., Mak, K. L., Lim, W., Yan, K. W., Chan, K. H., Tsang, N. C., Guan, Y., Yuen, K. Y., and Peiris, J. S. (2003) Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome, *Lancet 361*, 1773-1778.
40. Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., and Farzan, M. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus, *Nature 426*, 450-454.
41. Thom, T., Haase, N., Rosamond, W., Howard, V. J., Rumsfeld, J., Manolio, T., Zheng, Z. J., Flegal, K., O'Donnell, C., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., Goff, D. C., Jr., Hong, Y., Adams, R., Friday, G., Furie, K., Gorelick, P., Kissela, B., Marler, J., Meigs, J., Roger, V., Sidney, S., Sorlie, P., Steinberger, J., Wasserthiel-Smoller, S., Wilson, M., and Wolf, P. (2006) Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association

- Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation*. 113, e85-151.
42. Dzau, V. J., Burt, D. W., and Pratt, R. E. (1988) Molecular biology of the renin-angiotensin system, *Am. J. Physiol* 255, F563-F573.
  43. Blundell, T., Sibanda, B. L., and Pearl, L. (1983) Three-dimensional structure, specificity and catalytic mechanism of renin, *Nature* 304, 273-275.
  44. Naruse, K., Inagami, T., Celio, M. R., Workman, R. J., and Takii, Y. (1982) Immunohistochemical evidence that angiotensins I and II are formed by intracellular mechanism in juxtaglomerular cells, *Hypertension*. 4, 70-74.
  45. Briggs, J. P. and Schnermann, J. B. (1996) Whys and wherefores of juxtaglomerular apparatus function, *Kidney Int.* 49, 1724-1726.
  46. Skott, O. and Briggs, J. P. (1987) Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion, *Science* 237, 1618-1620.
  47. Mullins, J. J., Burt, D. W., Windass, J. D., McTurk, P., George, H., and Brammar, W. J. (1982) Molecular cloning of two distinct renin genes from the DBA/2 mouse, *EMBO J.* 1, 1461-1466.
  48. Rougeon, F., Chambraud, B., Foote, S., Panthier, J. J., Nageotte, R., and Corvol, P. (1981) Molecular cloning of a mouse submaxillary gland renin cDNA fragment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 6367-6371.
  49. Sigmund, C. D. and Gross, K. W. (1991) Structure, expression, and regulation of the murine renin genes, *Hypertension* 18, 446-457.
  50. Suzuki, F., Yamashita, S., Ito, M., Nagata, Y., and Nakamura, Y. (1990) Ren-2 as well as Ren-1 renin exists in the kidney and plasma of a two-renin gene mouse, *Agric. Biol. Chem.* 54, 2407-2412.
  51. Clark, A. F., Sharp, M. G., Morley, S. D., Fleming, S., Peters, J., and Mullins, J. J. (1997) Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology, *J. Biol. Chem.* 272, 18185-18190.
  52. Pentz, E. S., Lopez, M. L., Kim, H. S., Carretero, O., Smithies, O., and Gomez, R. A. (2001) Ren1d and Ren2 cooperate to preserve homeostasis: evidence from mice expressing GFP in place of Ren1d, *Physiol Genomics* 6, 45-55.
  53. Catanzaro, D. F., Mullins, J. J., and Morris, B. J. (1983) The biosynthetic pathway of renin in mouse submandibular gland, *J. Biol. Chem.* 258, 7364-7368.

54. Dubin, D., Pratt, R. E., Hui, K. Y., and Dzau, V. J. (1991) Characterization of prorenin activation using a synthetic peptide substrate, *J. Hypertens.* 9, 483-486.
55. Bunag, R. D., Page, I. H., and McCubbin, J. W. (1966) Neural stimulation of release of renin, *Circ. Res.* 19, 851-858.
56. Campbell, W. G., Jr., Gahnem, F., Catanzaro, D. F., James, G. D., Camargo, M. J., Laragh, J. H., and Sealey, J. E. (1996) Plasma and renal prorenin/renin, renin mRNA, and blood pressure in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats, *Hypertension* 27, 1121-1133.
57. Nielsen, A. H. and Poulsen, K. (1987) Quantitative activation and determination of inactive renin by high performance liquid chromatography, *J. Hypertens.* 5, 25-29.
58. Methot, D., Silversides, D. W., and Reudelhuber, T. L. (1999) In vivo enzymatic assay reveals catalytic activity of the human renin precursor in tissues, *Circ. Res.* 84, 1067-1072.
59. Saris, J. J., Derkx, F. H., Lamers, J. M., Saxena, P. R., Schalekamp, M. A., and Danser, A. H. (2001) Cardiomyocytes bind and activate native human prorenin : role of soluble mannose 6-phosphate receptors, *Hypertension* 37, 710-715.
60. Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzahir, L., Giller, T., and Sraer, J. D. (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin, *J. Clin. Invest* 109, 1417-1427.
61. Hsueh, W. A. and Baxter, J. D. (1991) Human prorenin, *Hypertension* 17, 469-477.
62. Campbell, D. J., Kladis, A., Skinner, S. L., and Whitworth, J. A. (1991) Characterization of angiotensin peptides in plasma of anephric man, *J. Hypertens.* 9, 265-274.
63. Clauser, E., Gaillard, I., Wei, L., and Corvol, P. (1989) Regulation of angiotensinogen gene, *Am. J. Hypertens.* 2, 403-410.
64. Campbell, D. J., Bouhnik, J., Coezy, E., Menard, J., and Corvol, P. (1985) Characterization of precursor and secreted forms of human angiotensinogen, *J. Clin. Invest* 75, 1880-1893.
65. Morgan, L., Broughton, P. F., and Kalsheker, N. (1996) Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 1211-1222.

66. Skinner, S. L., Lumbers, E. R., and Symonds, E. M. (1972) Analysis of changes in the renin-angiotensin system during pregnancy, *Clin. Sci.* 42, 479-488.
67. Daniels, C. R., Eisen, V., and Slater, J. D. (1987) The renin-angiotensinogen reaction during pregnancy and oral contraception: estimation of kinetic parameters by an autologous plasma renin assay, *J. Endocrinol.* 112, 465-472.
68. Kang, A. K., Duncan, J. A., Cattran, D. C., Floras, J. S., Lai, V., Scholey, J. W., and Miller, J. A. (2001) Effect of oral contraceptives on the renin angiotensin system and renal function, *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 280, R807-R813.
69. Printz, M. P., Printz, J. M., and Dworschack, R. T. (1977) Human angiotensinogen. Purification partial characterization, and a comparison with animal prohormones, *J. Biol. Chem.* 252, 1654-1662.
70. Do, Y. S., Shinagawa, T., Tam, H., Inagami, T., and Hsueh, W. A. (1987) Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure, *J. Biol. Chem.* 262, 1037-1043.
71. Menard, J., el Amrani, A. I., Savoie, F., and Bouhnik, J. (1991) Angiotensinogen: an attractive and underrated participant in hypertension and inflammation, *Hypertension* 18, 705-707.
72. Meneton, P., Ichikawa, I., Inagami, T., and Schnermann, J. (2000) Renal physiology of the mouse, *Am. J. Physiol Renal Physiol* 278, F339-F351.
73. Mullins, J. J., Sigmund, C. D., Kane-Haas, C., Gross, K. W., and McGowan, R. A. (1989) Expression of the DBA/2J Ren-2 gene in the adrenal gland of transgenic mice, *EMBO J.* 8, 4065-4072.
74. Doolittle, R. F. (1983) Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family, *Science* 222, 417-419.
75. Kageyama, R., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1985) Induction of rat liver angiotensinogen mRNA following acute inflammation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 826-832.
76. Okamoto, H., Hanaoka, M., Yayama, K., Ohtani, R., and Itoh, N. (1989) Acute-phase response of angiotensinogen in rat adjuvant arthritis, *Int. J. Tissue React.* 11, 123-127.
77. Coates, D. (2003) The angiotensin converting enzyme (ACE), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 769-773.

78. Jaspard, E., Wei, L., and henc-Gelas, F. (1993) Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides, *J. Biol. Chem.* 268, 9496-9503.
79. Wei, L., henc-Gelas, F., Soubrier, F., Michaud, A., Corvol, P., and Clauser, E. (1991) Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes, *J. Biol Chem.* 266, 5540-5546.
80. Esther, C. R., Marino, E. M., Howard, T. E., Machaud, A., Corvol, P., Capecchi, M. R., and Bernstein, K. E. (1997) The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice, *J. Clin. Invest* 99, 2375-2385.
81. Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., and Corvol, P. (1988) Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 9386-9390.
82. Wei, L., henc-Gelas, F., Corvol, P., and Clauser, E. (1991) The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active, *J. Biol Chem.* 266, 9002-9008.
83. Wei, L., Clauser, E., henc-Gelas, F., and Corvol, P. (1992) The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors, *J. Biol Chem.* 267, 13398-13405.
84. Fuchs, S., Xiao, H. D., Cole, J. M., Adams, J. W., Frenzel, K., Michaud, A., Zhao, H., Keshelava, G., Capecchi, M. R., Corvol, P., and Bernstein, K. E. (2004) Role of the N-terminal catalytic domain of angiotensin-converting enzyme investigated by targeted inactivation in mice, *J. Biol. Chem.* 279, 15946-15953.
85. Ehlers, M. R., Fox, E. A., Strydom, D. J., and Riordan, J. F. (1989) Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 7741-7745.
86. Jaiswal, A., Joshi, P., Kumar, M. V., Panda, J. N., and Singh, L. N. (1984) Angiotensin converting enzyme in the testis and epididymis of mammals, *Andrologia* 16, 410-416.
87. Kumar, R. S., Thekkumkara, T. J., and Sen, G. C. (1991) The mRNAs encoding the two angiotensin-converting isozymes are transcribed from the



same gene by a tissue-specific choice of alternative transcription initiation sites, *J. Biol. Chem.* 266, 3854-3862.

88. Hagaman, J. R., Moyer, J. S., Bachman, E. S., Sibony, M., Magyar, P. L., Welch, J. E., Smithies, O., Kregge, J. H., and O'Brien, D. A. (1998) Angiotensin-converting enzyme and male fertility, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2552-2557.
89. Kondoh, G., Tojo, H., Nakatani, Y., Komazawa, N., Murata, C., Yamagata, K., Maeda, Y., Kinoshita, T., Okabe, M., Taguchi, R., and Takeda, J. (2005) Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization, *Nat. Med.* 11, 160-166.
90. Hooper, N. M. and Turner, A. J. (2003) An ACE structure, *Nat. Struct. Biol.* 10, 155-157.
91. Guy, J. L., Lambert, D. W., Warner, F. J., Hooper, N. M., and Turner, A. J. (2005) Membrane-associated zinc peptidase families: comparing ACE and ACE2, *Biochim. Biophys. Acta* 1751, 2-8.
92. Crackower, M. A., Sarao, R., Oudit, G. Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S. E., Oliveira-dos-Santos, A. J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C. M., Manoukian, A. S., Chappell, M. C., Backx, P. H., Yagil, Y., and Penninger, J. M. (2002) Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function, *Nature* 417, 822-828.
93. Kohlstedt, K., Shoghi, F., Muller-Esterl, W., Busse, R., and Fleming, I. (2002) CK2 phosphorylates the angiotensin-converting enzyme and regulates its retention in the endothelial cell plasma membrane, *Circ. Res.* 91, 749-756.
94. Fleming, I., Kohlstedt, K., and Busse, R. (2005) New FACES to the renin-angiotensin system, *Physiology. (Bethesda.)* 20, 91-95.
95. Kohlstedt, K., Busse, R., and Fleming, I. (2005) Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells, *Hypertension* 45, 126-132.
96. Moeller, I., Allen, A. M., Chai, S. Y., Zhuo, J., and Mendelsohn, F. A. (1998) Bioactive angiotensin peptides, *J. Hum. Hypertens.* 12, 289-293.
97. Pendleton, R. G., Gessner, G., and Horner, E. (1991) Comparative effects of angiotensin II and angiotensin III in rabbit adrenal and aortic tissues, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 614-620.
98. Wright, J. W. and Harding, J. W. (1994) Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18, 21-53.

99. Chansel, D. and Ardaillou, R. (1998) [Active metabolites derived from angiotensin II], *Nephrologie*. 19, 427-432.
100. Jarvis, M. F., Gessner, G. W., and Ly, C. Q. (1992) The angiotensin hexapeptide 3-8 fragment potently inhibits [125I]angiotensin II binding to non-AT1 or -AT2 recognition sites in bovine adrenal cortex, *Eur. J Pharmacol*. 219, 319-322.
101. Swanson, G. N., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., Coleman, J. K., Wright, J. W., Hall, K. L., Miller-Wing, A. V., Stobb, J. W., Cook, V. I., Harding, E. C., and . (1992) Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor, *Regul. Pept*. 40, 409-419.
102. Wright, J. W., Bechtholt, A. J., Chambers, S. L., and Harding, J. W. (1996) Angiotensin III and IV activation of the brain AT1 receptor subtype in cardiovascular function, *Peptides*. 17, 1365-1371.
103. Krebs, L. T., Kramar, E. A., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., Ball, A. E., Wright, J. W., and Harding, J. W. (1996) Characterization of the binding properties and physiological action of divalinal-angiotensin IV, a putative AT4 receptor antagonist, *Regul. Pept*. 67, 123-130.
104. Moeller, I., Lew, R. A., Mendelsohn, F. A., Smith, A. I., Brennan, M. E., Tetaz, T. J., and Chai, S. Y. (1997) The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain, *J Neurochem*. 68, 2530-2537.
105. Wright, J. W., Stublely, L., Pederson, E. S., Kramar, E. A., Hanesworth, J. M., and Harding, J. W. (1999) Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning, *J. Neurosci*. 19, 3952-3961.
106. Olson, M. L., Olson, E. A., Qualls, J. H., Stratton, J. J., Harding, J. W., and Wright, J. W. (2004) Norleucine1-Angiotensin IV alleviates mecamylamine-induced spatial memory deficits, *Peptides* 25, 233-241.
107. Hamilton, T. A., Handa, R. K., Harding, J. W., and Wright, J. W. (2001) A role for the angiotensin IV/AT4 system in mediating natriuresis in the rat, *Peptides*. 22, 935-944.
108. Kramar, E. A., Krishnan, R., Harding, J. W., and Wright, J. W. (1998) Role of nitric oxide in angiotensin IV-induced increases in cerebral blood flow, *Regul. Pept*. 74, 185-192.
109. Kramar, E. A., Harding, J. W., and Wright, J. W. (1997) Angiotensin II- and IV-induced changes in cerebral blood flow. Roles of AT1, AT2, and AT4 receptor subtypes, *Regul. Pept*. 68, 131-138.

110. Fitzgerald, S. M., Evans, R. G., Bergstrom, G., and Anderson, W. P. (1999) Renal hemodynamic responses to intrarenal infusion of ligands for the putative angiotensin IV receptor in anesthetized rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34, 206-211.
111. Naveri, L., Stromberg, C., and Saavedra, J. M. (1994) Angiotensin IV reverses the acute cerebral blood flow reduction after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14, 1096-1099.
112. Loufrani, L., Henrion, D., Chansel, D., Ardaillou, R., and Levy, B. I. (1999) Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries, *J Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 583-588.
113. Li, X. C., Campbell, D. J., Ohishi, M., Yuan, S., and Zhuo, J. L. (2005) AT1 Receptor-activated signaling mediates angiotensin IV-induced renal cortical vasoconstriction in rats, *Am. J. Physiol Renal Physiol.* ..
114. Wang, L., Eberhard, M., and Erne, P. (1995) Stimulation of DNA and RNA synthesis in cultured rabbit cardiac fibroblasts by angiotensin IV, *Clin. Sci. (Lond).* 88, 557-562.
115. Mustafa, T., Chai, S. Y., Mendelsohn, F. A., Moeller, I., and Albiston, A. L. (2001) Characterization of the AT(4) receptor in a human neuroblastoma cell line (SK-N-MC), *J Neurochem.* 76, 1679-1687.
116. Moeller, I., Clune, E. F., Fennessy, P. A., Bingley, J. A., Albiston, A. L., Mendelsohn, F. A., and Chai, S. Y. (1999) Up regulation of AT4 receptor levels in carotid arteries following balloon injury, *Regul. Pept.* 83, 25-30.
117. Kerins, D. M., Hao, Q., and Vaughan, D. E. (1995) Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV, *J Clin. Invest.* 96, 2515-2520.
118. Vaughan, D. E., Lazos, S. A., and Tong, K. (1995) Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis, *J Clin. Invest.* 95, 995-1001.
119. Brosnihan, K. B., Li, P., Tallant, E. A., and Ferrario, C. M. (1998) Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation, *Biol Res.* 31, 227-234.
120. Benter, I. F., Ferrario, C. M., Morris, M., and Diz, D. I. (1995) Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Physiol.* 269, H313-H319.

121. Li, P., Chappell, M. C., Ferrario, C. M., and Brosnihan, K. B. (1997) Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide, *Hypertension*. 29, 394-400.
122. Kucharewicz, I., Pawlak, R., Matys, T., Chabielska, E., and Buczko, W. (2002) Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system, *J Physiol Pharmacol*. 53, 533-540.
123. Walther, T., Balschun, D., Voigt, J. P., Fink, H., Zuschratter, W., Birchmeier, C., Ganten, D., and Bader, M. (1998) Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene, *J. Biol. Chem*. 273, 11867-11873.
124. Gross, V., Schunck, W. H., Honeck, H., Milia, A. F., Kargel, E., Walther, T., Bader, M., Inagami, T., Schneider, W., and Luft, F. C. (2000) Inhibition of pressure natriuresis in mice lacking the AT2 receptor, *Kidney Int*. 57, 191-202.
125. Huentelman, M. J., Grobe, J. L., Vazquez, J., Stewart, J. M., Mecca, A. P., Katovich, M. J., Ferrario, C. M., and Raizada, M. K. (2005) Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats, *Exp. Physiol*. 90, 783-790.
126. Iyer, S. N., Chappell, M. C., Averill, D. B., Diz, D. I., and Ferrario, C. M. (1998) Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan, *Hypertension*. 31, 699-705.
127. Iyer, S. N., Ferrario, C. M., and Chappell, M. C. (1998) Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system, *Hypertension*. 31, 356-361.
128. Grobe, J. L., Mecca, A. P., Mao, H., and Katovich, M. J. (2006) Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in the DOCA-salt model of hypertension, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*. ..
129. Burrell, L. M., Risvanis, J., Kubota, E., Dean, R. G., MacDonald, P. S., Lu, S., Tikellis, C., Grant, S. L., Lew, R. A., Smith, A. I., Cooper, M. E., and Johnston, C. I. (2005) Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans, *Eur. Heart J*. 26, 369-375.
130. Gallagher, P. E. and Tallant, E. A. (2004) Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7), *Carcinogenesis*. 25, 2045-2052.
131. Tallant, E. A., Ferrario, C. M., and Gallagher, P. E. (2005) Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor, *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*. 289, H1560-H1566.

132. Tallant, E. A., Diz, D. I., and Ferrario, C. M. (1999) State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle, *Hypertension*. 34, 950-957.
133. Tallant, E. A. and Clark, M. A. (2003) Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7), *Hypertension*. 42, 574-579.
134. de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., and Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors, *Pharmacol. Rev.* 52, 415-472.
135. Gunther, S. (1984) Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat liver, *J Biol. Chem.* 259, 7622-7629.
136. Iwai, N., Inagami, T., Ohmichi, N., Nakamura, Y., Saeki, Y., and Kinoshita, M. (1992) Differential regulation of rat AT1a and AT1b receptor mRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 298-303.
137. Burson, J. M., Aguilera, G., Gross, K. W., and Sigmund, C. D. (1994) Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse, *Am. J Physiol.* 267, E260-E267.
138. Sandberg, K., Ji, H., and Catt, K. J. (1994) Regulation of angiotensin II receptors in rat brain during dietary sodium changes, *Hypertension*. 23, I137-I141.
139. Wang, D. H., Du, Y., Yao, A., and Hu, Z. (1996) Regulation of type 1 angiotensin II receptor and its subtype gene expression in kidney by sodium loading and angiotensin II infusion, *J. Hypertens.* 14, 1409-1415.
140. Chiu, A. T., Dunscomb, J., Kosierowski, J., Burton, C. R., Santomena, L. D., Corjay, M. H., and Benfield, P. (1993) The ligand binding signatures of the rat AT1A, AT1B and the human AT1 receptors are essentially identical, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 440-449.
141. Yamano, Y., Ohyama, K., Chaki, S., Guo, D. F., and Inagami, T. (1992) Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1426-1431.
142. Feng, Y. H., Miura, S., Husain, A., and Karnik, S. S. (1998) Mechanism of constitutive activation of the AT1 receptor: influence of the size of the agonist switch binding residue Asn(111), *Biochemistry.* 37, 15791-15798.
143. Leff, P. (1995) The two-state model of receptor activation, *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 89-97.

144. Black, J. W. and Shankley, N. P. (1995) Drug receptors. Inverse agonists exposed, *Nature*. 374, 214-215.
145. Noda, K., Feng, Y. H., Liu, X. P., Saad, Y., Husain, A., and Karnik, S. S. (1996) The active state of the AT1 angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction, *Biochemistry*. 35, 16435-16442.
146. Le, M. T., Vanderheyden, P. M., Szaszak, M., Hunyady, L., Kersemans, V., and Vauquelin, G. (2003) Peptide and nonpeptide antagonist interaction with constitutively active human AT1 receptors, *Biochem. Pharmacol.* 65, 1329-1338.
147. Thomas, W. G., Qian, H., Chang, C. S., and Karnik, S. (2000) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin II (AT(1A)) receptor requires generation of a conformation that is distinct from the inositol phosphate-signaling state, *J. Biol. Chem.* 275, 2893-2900.
148. Touyz, R. M. and Berry, C. (2002) Recent advances in angiotensin II signaling, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 1001-1015.
149. Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Konig, S., Wittig, B., and Egido, J. (2000) Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms, *Circ. Res.* 86, 1266-1272.
150. Dhalla, N. S., Xu, Y. J., Sheu, S. S., Tappia, P. S., and Panagia, V. (1997) Phosphatidic acid: a potential signal transducer for cardiac hypertrophy, *J Mol. Cell Cardiol.* 29, 2865-2871.
151. Lee, M. W. and Severson, D. L. (1994) Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action, *Am. J Physiol.* 267, C659-C678.
152. Jard, S., Cantau, B., and Jakobs, K. H. (1981) Angiotensin II and alpha-adrenergic agonists inhibit rat liver adenylate cyclase, *J. Biol. Chem.* 256, 2603-2606.
153. Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., Toko, H., Tamura, K., Kihara, M., Nagai, T., Fukamizu, A., Umemura, S., Iiri, T., Fujita, T., and Komuro, I. (2004) Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II, *Nat. Cell Biol.* 6, 499-506.
154. Paradis, P., li-Youcef, N., Paradis, F. W., Thibault, G., and Nemer, M. (2000) Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 931-936.

155. Hein, L., Stevens, M. E., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Kobilka, B. K., and Dzau, V. J. (1997) Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6391-6396.
156. Zhai, P., Yamamoto, M., Galeotti, J., Liu, J., Masurekar, M., Thaisz, J., Irie, K., Holle, E., Yu, X., Kupersmidt, S., Roden, D. M., Wagner, T., Yatani, A., Vatner, D. E., Vatner, S. F., and Sadoshima, J. (2005) Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking  $\alpha_q/\alpha_i$  coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice, *J. Clin. Invest* 115, 3045-3056.
157. Saito, Y. and Berk, B. C. (2001) Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors, *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 3-7.
158. Uchiyama-Tanaka, Y., Matsubara, H., Nozawa, Y., Murasawa, S., Mori, Y., Kosaki, A., Maruyama, K., Masaki, H., Shibasaki, Y., Fujiyama, S., Nose, A., Iba, O., Hasagawa, T., Tateishi, E., Higashiyama, S., and Iwasaka, T. (2001) Angiotensin II signaling and HB-EGF shedding via metalloproteinase in glomerular mesangial cells, *Kidney Int.* 60, 2153-2163.
159. Shah, B. H. and Catt, K. J. (2003) A central role of EGF receptor transactivation in angiotensin II -induced cardiac hypertrophy, *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 239-244.
160. Yang, X., Zhu, M. J., Sreejayan, N., Ren, J., and Du, M. (2005) Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway, *Mol. Cells.* 20, 263-270.
161. Castro, C. H., Santos, R. A., Ferreira, A. J., Bader, M., Alenina, N., and Almeida, A. P. (2005) Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart, *Hypertension.* 46, 937-942.
162. Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-Ferrer, C. F., Heringer-Walther, S., Sexton, P. M., Gembardt, F., Kellett, E., Martini, L., Vanderheyden, P., Schultheiss, H. P., and Walther, T. (2005) G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor, *Circulation.* 111, 1806-1813.
163. Bader, M. (2001) Molecular interactions of vasoactive systems in cardiovascular damage, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38 Suppl 2:S7-9., S7-S9.
164. AbdAlla, S., Lothar, H., and Quitterer, U. (2000) AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration, *Nature.* 407, 94-98.

165. AbdAlla, S., Lothar, H., bdeł-tawab, A. M., and Quitterer, U. (2001) The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist, *J. Biol. Chem.* 276, 39721-39726.
166. AbdAlla, S., Lothar, H., Langer, A., el, F. Y., and Quitterer, U. (2004) Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis, *Cell.* 119, 343-354.
167. Quitterer, U., Lothar, H., and AbdAlla, S. (2004) AT1 receptor heterodimers and angiotensin II responsiveness in preeclampsia, *Semin. Nephrol.* 24, 115-119.
168. bdAlla, S., Lothar, H., el, M. A., and Quitterer, U. (2001) Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness, *Nat. Med.* 7, 1003-1009.
169. Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Ohkubo, N., Mori, Y., Nozawa, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Kamihata, H., Inada, M., and Iwasaka, T. (1998) Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression, *Circ. Res.* 83, 1035-1046.
170. Bottari, S. P., Taylor, V., King, I. N., Bogdal, Y., Whitebread, S., and de Gasparo, M. (1991) Angiotensin II AT2 receptors do not interact with guanine nucleotide binding proteins, *Eur. J. Pharmacol.* 207, 157-163.
171. Nakajima, M., Mukoyama, M., Pratt, R. E., Horiuchi, M., and Dzau, V. J. (1993) Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 393-399.
172. Zhang, J. and Pratt, R. E. (1996) The AT2 receptor selectively associates with  $G_{i\alpha 2}$  and  $G_{i\alpha 3}$  in the rat fetus, *J Biol. Chem.* 271, 15026-15033.
173. Tsutsumi, K., Zorad, S., and Saavedra, J. M. (1992) The AT2 subtype of the angiotensin II receptors has differential sensitivity to dithiothreitol in specific brain nuclei of young rats, *Eur. J Pharmacol.* 226, 169-173.
174. Reagan, L. P., Yee, D. K., He, P. F., and Fluharty, S. J. (1996) Heterogeneity of angiotensin type 2 (AT2) receptors, *Adv. Exp. Med Biol.* 396:199-208., 199-208.
175. Nouet, S. and Nahmias, C. (2000) Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor, *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 1-6.
176. Nakajima, M., Hutchinson, H. G., Fujinaga, M., Hayashida, W., Morishita, R., Zhang, L., Horiuchi, M., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1995) The



- angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10663-10667.
177. Yamada, T., Akishita, M., Pollman, M. J., Gibbons, G. H., Dzau, V. J., and Horiuchi, M. (1998) Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study, *Life Sci.* 63, L289-L295.
  178. Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Suzuki, Y., and Egido, J. (2001) Angiotensin II activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice, *Nephrol. Dial. Transplant.* 16 Suppl 1, 27-33.
  179. Miura, S., Karnik, S. S., and Saku, K. (2005) Constitutively active homo-oligomeric angiotensin II type 2 receptor induces cell signaling independent of receptor conformation and ligand stimulation, *J. Biol. Chem.* 280, 18237-18244.
  180. Horiuchi, M., Hayashida, W., Kambe, T., Yamada, T., and Dzau, V. J. (1997) Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis, *J Biol. Chem.* 272, 19022-19026.
  181. Oishi, Y., Ozono, R., Yano, Y., Teranishi, Y., Akishita, M., Horiuchi, M., Oshima, T., and Kambe, M. (2003) Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling, *Hypertension.* 41, 814-818.
  182. Adachi, Y., Saito, Y., Kishimoto, I., Harada, M., Kuwahara, K., Takahashi, N., Kawakami, R., Nakanishi, M., Nakagawa, Y., Tanimoto, K., Saitoh, Y., Yasuno, S., Usami, S., Iwai, M., Horiuchi, M., and Nakao, K. (2003) Angiotensin II type 2 receptor deficiency exacerbates heart failure and reduces survival after acute myocardial infarction in mice, *Circulation* 107, 2406-2408.
  183. Ichihara, S., Senbonmatsu, T., Price E Jr, Ichiki, T., Gaffney, F. A., and Inagami, T. (2001) Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension, *Circulation.* 104, 346-351.
  184. Senbonmatsu, T., Ichihara, S., Price E Jr, Gaffney, F. A., and Inagami, T. (2000) Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload, *J. Clin. Invest.* 106, R25-R29.
  185. Miura, S. and Karnik, S. S. (2000) Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis, *EMBO J.* 19, 4026-4035.

186. D'Amore, A., Black, M. J., and Thomas, W. G. (2005) The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy, *Hypertension*. 46, 1347-1354.
187. Moeller, I., Paxinos, G., Mendelsohn, F. A., Aldred, G. P., Casley, D., and Chai, S. Y. (1996) Distribution of AT4 receptors in the Macaca fascicularis brain, *Brain Res*. 712, 307-324.
188. Chai, S. Y., Bastias, M. A., Clune, E. F., Matsacos, D. J., Mustafa, T., Lee, J. H., McDowall, S. G., Paxinos, G., Mendelsohn, F. A., and Albiston, A. L. (2000) Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography, *J Chem. Neuroanat*. 20, 339-348.
189. Miller-Wing, A. V., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., Hall, K. L., Wright, J. W., Speth, R. C., Grove, K. L., and Harding, J. W. (1993) Central angiotensin IV binding sites: distribution and specificity in guinea pig brain, *J Pharmacol. Exp. Ther*. 266, 1718-1726.
190. Briand, S. I., Bellemare, J. M., Bernier, S. G., and Guillemette, G. (1998) Study on the functionality and molecular properties of the AT4 receptor, *Endocr. Res*. 24, 315-323.
191. Bernier, S. G., Bellemare, J. M., Escher, E., and Guillemette, G. (1998) Characterization of AT4 receptor from bovine aortic endothelium with photosensitive analogues of angiotensin IV, *Biochemistry*. 37, 4280-4287.
192. Zhang, J. H., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., Alt, J. A., Wright, J. W., and Harding, J. W. (1999) Structural analysis of angiotensin IV receptor (AT4) from selected bovine tissues, *J Pharmacol. Exp. Ther*. 289, 1075-1083.
193. Keller, S. R., Scott, H. M., Mastick, C. C., Aebersold, R., and Lienhard, G. E. (1995) Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles, *J Biol. Chem*. 270, 23612-23618.
194. Keller, S. R. (2003) The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of GLUT4, *Front Biosci*. 8:s410-20., s410-s420.
195. Matsumoto, H., Nagasaka, T., Hattori, A., Rogi, T., Tsuruoka, N., Mizutani, S., and Tsujimoto, M. (2001) Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides, *Eur. J. Biochem*. 268, 3259-3266.
196. Caron, A. Z., Arguin, G., and Guillemette, G. (2003) Angiotensin IV interacts with a juxtamembrane site on AT(4)/IRAP suggesting an allosteric mechanism of enzyme modulation, *Regul. Pept*. 113, 9-15.

197. Keller, S. R., Davis, A. C., and Clairmont, K. B. (2002) Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis, *J. Biol. Chem.* 277, 17677-17686.
198. Fruitier-Arnaudin, I., Cohen, M., Bordenave, S., Sannier, F., and Piot, J. M. (2002) Comparative effects of angiotensin IV and two hemorphins on angiotensin-converting enzyme activity, *Peptides*. 23, 1465-1470.
199. Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., and Wigler, M. (1986) Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains, *Cell*. 45, 711-719.
200. Pinheiro, S. V., Simoes e Silva AC, Sampaio, W. O., de Paula, R. D., Mendes, E. P., Bontempo, E. D., Pesquero, J. B., Walther, T., Alenina, N., Bader, M., Bleich, M., and Santos, R. A. (2004) Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney, *Hypertension* 44, 490-496.
201. Jackson, T. R., Blair, L. A., Marshall, J., Goedert, M., and Hanley, M. R. (1988) The mas oncogene encodes an angiotensin receptor, *Nature* 335, 437-440.
202. Ambroz, C., Clark, A. J., and Catt, K. J. (1991) The mas oncogene enhances angiotensin-induced  $[Ca^{2+}]_i$  responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors, *Biochim. Biophys. Acta*. 1133, 107-111.
203. Santos, R. A., Simoes e Silva AC, Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., de B., I, Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., and Walther, T. (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8258-8263.
204. Santos, R. A., Simoes e Silva AC, Magaldi, A. J., Khosla, M. C., Cesar, K. R., Passaglio, K. T., and Baracho, N. C. (1996) Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance, *Hypertension*. 27, 875-884.
205. Walther, T., Wessel, N., Kang, N., Sander, A., Tschope, C., Malberg, H., Bader, M., and Voss, A. (2000) Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene, *Braz. J Med Biol. Res.* 33, 1-9.
206. Bikkavilli, R. K., Tsang, S. Y., Tang, W. M., Sun, J. X., Ngai, S. M., Lee, S. S., Ko, W. H., Wise, H., and Cheung, W. T. (2006) Identification and characterization of surrogate peptide ligand for orphan G protein-coupled

- receptor mas using phage-displayed peptide library, *Biochem. Pharmacol.* 71, 319-337.
207. Husain, A., DeSilva, P., Speth, R. C., and Bumpus, F. M. (1987) Regulation of angiotensin II in rat adrenal gland, *Circ. Res.* 60, 640-648.
  208. O'Mahony, O. A., Djahanbakhch, O., Mahmood, T., Puddefoot, J. R., and Vinson, G. P. (2000) Angiotensin II in human seminal fluid, *Hum. Reprod.* 15, 1345-1349.
  209. Naruse, M. and Inagami, T. (1982) Markedly elevated specific renin levels in the adrenal in genetically hypertensive rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 3295-3299.
  210. Aguilera, G., Schirar, A., Baukal, A., and Catt, K. J. (1981) Circulating angiotensin II and adrenal receptors after nephrectomy, *Nature.* 289, 507-509.
  211. Mendelsohn, F. A. (1982) Angiotensin II is concentrated or locally produced in rat adrenal gland, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol Suppl.* 7:3-7., 3-7.
  212. Trollet, M. R. and Phillips, M. I. (1992) The effect of chronic bilateral nephrectomy on plasma and brain angiotensin, *J. Hypertens.* 10, 29-36.
  213. Gregory, T. J., Wallis, C. J., and Printz, M. P. (1982) Regional changes in rat brain angiotensinogen following bilateral nephrectomy, *Hypertension.* 4, 827-838.
  214. Doi, Y. and Mulrow, P. J. (1984) Effects of sodium, potassium, ACTH and nephrectomy on adrenal renin, *Jpn. Circ. J.* 48, 1280-1281.
  215. Nakamaru, M., Misono, K. S., Naruse, M., Workman, R. J., and Inagami, T. (1985) A role for the adrenal renin-angiotensin system in the regulation of potassium-stimulated aldosterone production, *Endocrinology.* 117, 1772-1778.
  216. Tokita, Y., Oda, H., Franco-Saenz, R., and Mulrow, P. J. (1995) Role of the tissue renin-angiotensin system in the action of angiotensin-converting enzyme inhibitors, *Proc. Soc Exp. Biol Med.* 208, 391-396.
  217. Waeber, B., Brunner, H. R., Brunner, D. B., Curtet, A. L., Turini, G. A., and Gavras, H. (1980) Discrepancy between antihypertensive effect and angiotensin converting enzyme inhibition by captopril, *Hypertension.* 2, 236-242.
  218. Mervaala, E. M., Muller, D. N., Park, J. K., Schmidt, F., Lohn, M., Breu, V., Dragun, D., Ganten, D., Haller, H., and Luft, F. C. (1999) Monocyte

- infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension, *Hypertension*. 33, 389-395.
219. Muller, D. N., Dechend, R., Mervaala, E. M., Park, J. K., Schmidt, F., Fiebeler, A., Theuer, J., Breu, V., Ganten, D., Haller, H., and Luft, F. C. (2000) NF- $\kappa$ B inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats, *Hypertension*. 35, 193-201.
220. Alvarez, A., Cerda-Nicolas, M., Naim Abu, N. Y., Mata, M., Issekutz, A. C., Panes, J., Lobb, R. R., and Sanz, M. J. (2004) Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II, *Blood*. 104, 402-408.
221. Mazzolai, L., Nussberger, J., Aubert, J. F., Brunner, D. B., Gabbiani, G., Brunner, H. R., and Pedrazzini, T. (1998) Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system, *Hypertension*. 31, 1324-1330.
222. Nagano, M., Higaki, J., Mikami, H., Nakamaru, M., Higashimori, K., Katahira, K., Tabuchi, Y., Moriguchi, A., Nakamura, F., and Ogihara, T. (1991) Converting enzyme inhibitors regressed cardiac hypertrophy and reduced tissue angiotensin II in spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens*. 9, 595-599.
223. van Kats, J. P., Methot, D., Paradis, P., Silversides, D. W., and Reudelhuber, T. L. (2001) Use of a biological peptide pump to study chronic peptide hormone action in transgenic mice. Direct and indirect effects of angiotensin II on the heart, *J. Biol. Chem*. 276, 44012-44017.
224. Hamawaki, M., Coffman, T. M., Lashus, A., Koide, M., Zile, M. R., Oliverio, M. I., DeFreyte, G., Cooper, G., and Carabello, B. A. (1998) Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors, *Am. J. Physiol* 274, H868-H873.
225. Harada, K., Komuro, I., Zou, Y., Kudoh, S., Kijima, K., Matsubara, H., Sugaya, T., Murakami, K., and Yazaki, Y. (1998) Acute pressure overload could induce hypertrophic responses in the heart of angiotensin II type 1a knockout mice, *Circ. Res*. 82, 779-785.
226. De, N., I, Salvati, G., Genovesi, G., Paolini, P., Marcellini, L., Schiavello, V., and Re, M. (1999) Physiopathology of the renin-angiotensin system in the ovary, *Minerva Endocrinol*. 24, 77-81.
227. Ganong, W. F. (1995) Reproduction and the renin-angiotensin system, *Neurosci. Biobehav. Rev*. 19, 241-250.
228. Ramaraj, P., Kessler, S. P., Colmenares, C., and Sen, G. C. (1998) Selective restoration of male fertility in mice lacking angiotensin-converting enzymes

- by sperm-specific expression of the testicular isozyme, *J. Clin. Invest* 102, 371-378.
229. Harding, J. W., Sullivan, M. J., Hanesworth, J. M., Cushing, L. L., and Wright, J. W. (1988) Inability of [<sup>125</sup>I]Sar1, Ile<sup>8</sup>-angiotensin II to move between the blood and cerebrospinal fluid compartments, *J. Neurochem.* 50, 554-557.
  230. McKinley, M. J., Albiston, A. L., Allen, A. M., Mathai, M. L., May, C. N., McAllen, R. M., Oldfield, B. J., Mendelsohn, F. A., and Chai, S. Y. (2003) The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 901-918.
  231. Lynch, K. R., Hawelu-Johnson, C. L., and Guyenet, P. G. (1987) Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry, *Brain Res.* 388, 149-158.
  232. Schelling, P., Ganten, U., Sponer, G., Unger, T., and Ganten, D. (1980) Components of the renin-angiotensin system in the cerebrospinal fluid of rats and dogs with special consideration of the origin and the fate of angiotensin II, *Neuroendocrinology.* 31, 297-308.
  233. Intebi, A. D., Flaxman, M. S., Ganong, W. F., and Deschepper, C. F. (1990) Angiotensinogen production by rat astroglial cells in vitro and in vivo, *Neuroscience.* 34, 545-554.
  234. Stornetta, R. L., Hawelu-Johnson, C. L., Guyenet, P. G., and Lynch, K. R. (1988) Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain, *Science.* 242, 1444-1446.
  235. Thomas, W. G., Greenland, K. J., Shinkel, T. A., and Sernia, C. (1992) Angiotensinogen is secreted by pure rat neuronal cell cultures, *Brain Res.* 588, 191-200.
  236. Thomas, W. G. and Sernia, C. (1988) Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat brain, *Neuroscience.* 25, 319-341.
  237. Schinke, M., Baltatu, O., Bohm, M., Peters, J., Rascher, W., Bricca, G., Lippoldt, A., Ganten, D., and Bader, M. (1999) Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3975-3980.
  238. Osman, M. Y., Smeby, R. R., and Sen, S. (1979) Separation of dog brain renin-like activity from acid protease activity, *Hypertension.* 1, 53-60.

239. Rettig, R., Speck, G., Simon, W., Schelling, P., Fahrner, A., and Ganten, D. (1978) In vivo enzyme activity of purified human brain renin, *Klin. Wochenschr.* 56 Suppl 1:43-5., 43-45.
240. Dzau, V. J., Ingelfinger, J., Pratt, R. E., and Ellison, K. E. (1986) Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains, *Hypertension.* 8, 544-548.
241. Araujo, R. C., Lima, M. P., Lomez, E. S., Bader, M., Pesquero, J. B., Sumitani, M., and Pesquero, J. L. (2002) Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II, *Physiol Behav.* 76, 327-333.
242. Hackenthal, E., Hackenthal, R., and Hilgenfeldt, U. (1978) Isorenin, pseudorenin, cathepsin D and renin. A comparative enzymatic study of angiotensin-forming enzymes, *Biochim. Biophys. Acta.* 522, 574-588.
243. Lavoie, J. L., Cassell, M. D., Gross, K. W., and Sigmund, C. D. (2004) Localization of renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model, *Physiol Genomics.* 16, 240-246.
244. Lee-Kirsch, M. A., Gaudet, F., Cardoso, M. C., and Lindpaintner, K. (1999) Distinct renin isoforms generated by tissue-specific transcription initiation and alternative splicing, *Circ. Res.* 84, 240-246.
245. Slater, E. E. and Strout, H. V., Jr. (1981) Pure human renin. Identification and characterization and of two major molecular weight forms, *J. Biol. Chem.* 256, 8164-8171.
246. Lavoie, J. L., Liu, X., Bianco, R. A., Beltz, T. G., Johnson, A. K., and Sigmund, C. D. (2006) Evidence Supporting a Functional Role for Intracellular Renin in the Brain, *Hypertension.* ..
247. Arregui, A. and Iversen, L. L. (1978) Angiotensin-converting enzyme: presence of high activity in choroid plexus of mammalian brain, *Eur. J. Pharmacol.* 52, 147-150.
248. Zhuo, J., Moeller, I., Jenkins, T., Chai, S. Y., Allen, A. M., Ohishi, M., and Mendelsohn, F. A. (1998) Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors, *J. Hypertens.* 16, 2027-2037.
249. Zini, S., Masdehors, P., Lenkei, Z., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1997) Aminopeptidase A: distribution in rat brain nuclei and increased activity in spontaneously hypertensive rats, *Neuroscience.* 78, 1187-1193.

250. Larrinaga, G., Callado, L. F., Agirregoitia, N., Varona, A., and Gil, J. (2005) Subcellular distribution of membrane-bound aminopeptidases in the human and rat brain, *Neurosci. Lett.* *383*, 136-140.
251. Noble, F., Banisadr, G., Jardinaud, F., Popovici, T., Lai-Kuen, R., Chen, H., Bischoff, L., Parsadaniantz, S. M., Fournie-Zaluski, M. C., and Roques, B. P. (2001) First discrete autoradiographic distribution of aminopeptidase N in various structures of rat brain and spinal cord using the selective iodinated inhibitor [125I]RB 129, *Neuroscience.* *105*, 479-488.
252. Healy, D. P. and Wilk, S. (1993) Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II, *Brain Res.* *606*, 295-303.
253. Song, L., Wilk, E., Wilk, S., and Healy, D. P. (1993) Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. I. Association with cerebral microvessels, *Brain Res.* *606*, 286-294.
254. Lind, R. W., Swanson, L. W., and Ganten, D. (1984) Angiotensin II immunoreactive pathways in the central nervous system of the rat: evidence for a projection from the subfornical organ to the paraventricular nucleus of the hypothalamus, *Clin. Exp. Hypertens. A.* *6*, 1915-1920.
255. Lavoie, J. L., Cassell, M. D., Gross, K. W., and Sigmund, C. D. (2004) Adjacent expression of renin and angiotensinogen in the rostral ventrolateral medulla using a dual-reporter transgenic model, *Hypertension.* *43*, 1116-1119.
256. Harding, J. W., Yoshida, M. S., Dilts, R. P., Woods, T. M., and Wright, J. W. (1986) Cerebroventricular and intravascular metabolism of [125I]angiotensins in rat, *J. Neurochem.* *46*, 1292-1297.
257. Wright, J. W., Morseth, S. L., Abhold, R. H., and Harding, J. W. (1985) Pressor action and dipsogenicity induced by angiotensin II and III in rats, *Am. J. Physiol.* *249*, R514-R521.
258. Song, L., Wilk, S., and Healy, D. P. (1997) Aminopeptidase A antiserum inhibits intracerebroventricular angiotensin II-induced dipsogenic and pressor responses, *Brain Res.* *744*, 1-6.
259. Reaux, A., Fournie-Zaluski, M. C., David, C., Zini, S., Roques, B. P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1999) Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 13415-13420.
260. von Bohlen und, H. O. (2003) Angiotensin IV in the central nervous system, *Cell Tissue Res.* *311*, 1-9.



261. Fitzsimons, J. T. (1998) Angiotensin, thirst, and sodium appetite, *Physiol Rev.* 78, 583-686.
262. Landas, S., Phillips, M. I., Stamler, J. F., and Raizada, M. K. (1980) Visualization of specific angiotensin II binding sites in the brain by fluorescent microscopy, *Science.* 210, 791-793.
263. van, H. M., Schiffrin, E. L., Mann, J. F., Posner, B. I., and Boucher, R. (1980) Radioautographic localization of specific binding sites for blood-borne angiotensin II in the rat brain, *Brain Res.* 186, 480-485.
264. Wright, J. W. and Harding, J. W. (1997) Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 25, 96-124.
265. Kakar, S. S., Riel, K. K., and Neill, J. D. (1992) Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 688-692.
266. Nuyt, A. M., Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1999) Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain, *J. Comp Neurol.* 407, 193-206.
267. Fernando, R. N., Larm, J., Albiston, A. L., and Chai, S. Y. (2005) Distribution and cellular localization of insulin-regulated aminopeptidase in the rat central nervous system, *J Comp Neurol.* 487, 372-390.
268. Ganog, W. F. (1984) The brain renin-angiotensin system, *Annu. Rev. Physiol.* 46:17-31., 17-31.
269. Unger, T., Rascher, W., Schuster, C., Pavlovitch, R., Schomig, A., Dietz, R., and Ganten, D. (1981) Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin, *Eur. J. Pharmacol.* 71, 33-42.
270. Falcon, J. C., Phillips, M. I., Hoffman, W. E., and Brody, M. J. (1978) Effects of intraventricular angiotensin II mediated by the sympathetic nervous system, *Am. J. Physiol.* 235, H392-H399.
271. Severs, W. B., Summy-Long, J., Taylor, J. S., and Connor, J. D. (1970) A central effect of angiotensin: release of pituitary pressor material, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 174, 27-34.
272. Hutchinson, J. S., Schelling, P., Mohring, J., and Ganten, D. (1976) Pressor action of centrally perfused angiotensin II in rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus, *Endocrinology.* 99, 819-823.

273. Kubo, T., Yamaguchi, H., Tsujimura, M., Hagiwara, Y., and Fukumori, R. (2000) An angiotensin system in the anterior hypothalamic area anterior is involved in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats, *Brain Res. Bull.* 52, 291-296.
274. Gyurko, R., Wielbo, D., and Phillips, M. I. (1993) Antisense inhibition of AT1 receptor mRNA and angiotensinogen mRNA in the brain of spontaneously hypertensive rats reduces hypertension of neurogenic origin, *Regul. Pept.* 49, 167-174.
275. Baltatu, O., Silva, J. A., Jr., Ganten, D., and Bader, M. (2000) The brain renin-angiotensin system modulates angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy, *Hypertension.* 35, 409-412.
276. Peng, J. F. and Phillips, M. I. (2001) Opposite regulation of brain angiotensin type 1 and type 2 receptors in cold-induced hypertension, *Regul. Pept.* 97, 91-102.
277. Sun, Z., Cade, R., and Morales, C. (2002) Role of central angiotensin II receptors in cold-induced hypertension, *Am. J. Hypertens.* 15, 85-92.
278. Sun, Z., Cade, R., Zhang, Z., Alouidor, J., and Van, H. (2003) Angiotensinogen gene knockout delays and attenuates cold-induced hypertension, *Hypertension.* 41, 322-327.
279. Nakamura, S., Moriguchi, A., Morishita, R., Yamada, K., Nishii, T., Tomita, N., Ohishi, M., Kaneda, Y., Higaki, J., and Ogihara, T. (1999) Activation of the brain angiotensin system by in vivo human angiotensin-converting enzyme gene transfer in rats, *Hypertension.* 34, 302-308.
280. Morimoto, S., Cassell, M. D., Beltz, T. G., Johnson, A. K., Davisson, R. L., and Sigmund, C. D. (2001) Elevated blood pressure in transgenic mice with brain-specific expression of human angiotensinogen driven by the glial fibrillary acidic protein promoter, *Circ. Res.* 89, 365-372.
281. Morimoto, S., Cassell, M. D., and Sigmund, C. D. (2002) Glia- and neuron-specific expression of the renin-angiotensin system in brain alters blood pressure, water intake, and salt preference, *J. Biol. Chem.* 277, 33235-33241.
282. Kihara, M., Umemura, S., Sumida, Y., Yokoyama, N., Yabana, M., Nyui, N., Tamura, K., Murakami, K., Fukamizu, A., and Ishii, M. (1998) Genetic deficiency of angiotensinogen produces an impaired urine concentrating ability in mice, *Kidney Int.* 53, 548-555.
283. Morris, M., Li, P., Callahan, M. F., Oliverio, M. I., Coffman, T. M., Bosch, S. M., and Diz, D. I. (1999) Neuroendocrine effects of dehydration in mice lacking the angiotensin AT1a receptor, *Hypertension* 33, 482-486.

284. Lazartigues, E., Dunlay, S. M., Loihl, A. K., Sinnayah, P., Lang, J. A., Espelund, J. J., Sigmund, C. D., and Davisson, R. L. (2002) Brain-selective overexpression of angiotensin (AT1) receptors causes enhanced cardiovascular sensitivity in transgenic mice, *Circ. Res.* 90, 617-624.
285. Phillips, M. I. (1978) Angiotensin in the brain, *Neuroendocrinology.* 25, 354-377.
286. Mangiapane, M. L., Thrasher, T. N., Keil, L. C., Simpson, J. B., and Ganong, W. F. (1984) Role for the subfornical organ in vasopressin release, *Brain Res. Bull.* 13, 43-47.
287. Phillips, M. I. (1987) Functions of angiotensin in the central nervous system, *Annu. Rev. Physiol.* 49:413-35., 413-435.
288. Johnson, A. K. and Buggy, J. (1978) Periventricular preoptic-hypothalamus is vital for thirst and normal water economy, *Am. J. Physiol.* 234, R122-R129.
289. Robinson, M. M., McLennan, G. P., Thunhorst, R. L., and Johnson, A. K. (1999) Interactions of the systemic and brain renin-angiotensin systems in the control of drinking and the central mediation of pressor responses, *Brain Res.* 842, 55-61.
290. Thunhorst, R. L., Fitts, D. A., and Simpson, J. B. (1989) Angiotensin-converting enzyme in subfornical organ mediates captopril-induced drinking, *Behav. Neurosci.* 103, 1302-1310.
291. Galaverna, O., Polidori, C., Sakai, R. R., Lienard, F., Chow, S. Y., and Fluharty, S. J. (1996) Blockade of central angiotensin II type 1 and type 2 receptors suppresses adrenalectomy-induced NaCl intake in rats, *Regul. Pept.* 66, 47-50.
292. Fitzsimons, J. T. (1984) The renin-angiotensin system and sodium appetite, *J. Physiol (Paris).* 79, 461-465.
293. Bryant, R. W., Epstein, A. N., Fitzsimons, J. T., and Fluharty, S. J. (1980) Arousal of a specific and persistent sodium appetite in the rat with continuous intracerebroventricular infusion of angiotensin II, *J. Physiol.* 301:365-82., 365-382.
294. Chen, Y., da Rocha, M. J., and Morris, M. (2003) Osmotic regulation of angiotensin AT1 receptor subtypes in mouse brain, *Brain Res.* 965, 35-44.
295. Chen, Y. and Morris, M. (2001) Differentiation of brain angiotensin type 1a and 1b receptor mRNAs: A specific effect of dehydration, *Hypertension.* 37, 692-697.

296. Davisson, R. L., Oliverio, M. I., Coffman, T. M., and Sigmund, C. D. (2000) Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain, *J. Clin. Invest.* 106, 103-106.
297. Yang, H., Shaw, G., and Raizada, M. K. (2002) ANG II stimulation of neuritogenesis involves protein kinase B in brain neurons, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.* 283, R107-R114.
298. Laflamme, L., Gasparo, M., Gallo, J. M., Payet, M. D., and Gallo-Payet, N. (1996) Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT<sub>2</sub> receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT<sub>1</sub> receptors, *J. Biol. Chem.* 271, 22729-22735.
299. von Bohlen und, H. O., Walther, T., Bader, M., and Albrecht, D. (2001) Genetic deletion of angiotensin AT<sub>2</sub> receptor leads to increased cell numbers in different brain structures of mice, *Regul. Pept.* 99, 209-216.
300. Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J., and Kobilka, B. K. (1995) Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice, *Nature.* 377, 744-747.
301. Okuyama, S., Sakagawa, T., Chaki, S., Imagawa, Y., Ichiki, T., and Inagami, T. (1999) Anxiety-like behavior in mice lacking the angiotensin II type-2 receptor, *Brain Res.* 821, 150-159.
302. Vervoort, V. S., Beachem, M. A., Edwards, P. S., Ladd, S., Miller, K. E., de, M., X, Clarkson, K., DuPont, B., Schwartz, C. E., Stevenson, R. E., Boyd, E., and Srivastava, A. K. (2002) AGTR2 mutations in X-linked mental retardation, *Science.* 296, 2401-2403.
303. Kakinuma, Y., Hama, H., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Murakami, K., and Fukamizu, A. (1998) Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice, *Nat. Med.* 4, 1078-1080.
304. Sherrod, M., Liu, X., Zhang, X., and Sigmund, C. D. (2005) Nuclear localization of angiotensinogen in astrocytes, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.* 288, R539-R546.
305. Yanai, K., Saito, T., Kakinuma, Y., Kon, Y., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Nishijo, N., Shigematsu, Y., Horiguchi, H., Kasuya, Y., Sugiyama, F., Yagami, K., Murakami, K., and Fukamizu, A. (2000) Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice, *J. Biol. Chem.* 275, 5-8.
306. Leong, D. S., Terron, J. A., Falcon-Neri, A., Armando, I., Ito, T., Johren, O., Tonelli, L. H., Hoe, K. L., and Saavedra, J. M. (2002) Restraint stress

- modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors, *Neuroendocrinology*. 75, 227-240.
307. Mouginot, D. and Drolet, G. (2003) [Brain angiotensin receptors and adaptation to stress], *Med. Sci. (Paris)* 19, 972-975.
308. Saavedra, J. M., Ando, H., Armando, I., Baiardi, G., Bregonzio, C., Jezova, M., and Zhou, J. (2004) Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1018:76-84., 76-84.
309. Bregonzio, C., Armando, I., Ando, H., Jezova, M., Baiardi, G., and Saavedra, J. M. (2003) Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury, *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G414-G423.
310. Albiston, A. L., Pederson, E. S., Burns, P., Purcell, B., Wright, J. W., Harding, J. W., Mendelsohn, F. A., Weisinger, R. S., and Chai, S. Y. (2004) Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms, *Behav. Brain Res.* 154, 239-243.
311. Lee, J., Albiston, A. L., Allen, A. M., Mendelsohn, F. A., Ping, S. E., Barrett, G. L., Murphy, M., Morris, M. J., McDowall, S. G., and Chai, S. Y. (2004) Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE<sup>1</sup>-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats, *Neuroscience*. 124, 341-349.
312. Lee, J., Chai, S. Y., Mendelsohn, F. A., Morris, M. J., and Allen, A. M. (2001) Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7, *Neuropharmacology* 40, 618-623.
313. Ge, J. and Barnes, N. M. (1996) Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders, *Eur. J. Pharmacol.* 297, 299-306.
314. Zubenko, G. S., Volicer, L., Direnfeld, L. K., Freeman, M., Langlais, P. J., and Nixon, R. A. (1985) Cerebrospinal fluid levels of angiotensin-converting enzyme in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy, *Brain Res.* 328, 215-221.
315. Lin, J. J., Yueh, K. C., Chang, D. C., and Lin, S. Z. (2002) Association between genetic polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and Parkinson's disease, *J. Neurol. Sci.* 199, 25-29.
316. Mellick, G. D., Buchanan, D. D., McCann, S. J., Davis, D. R., Le Couteur, D. G., Chan, D., and Johnson, A. G. (1999) The ACE deletion polymorphism is not associated with Parkinson's disease, *Eur. Neurol.* 41, 103-106.

317. Lehmann, D. J., Cortina-Borja, M., Warden, D. R., Smith, A. D., Slegers, K., Prince, J. A., van Duijn, C. M., and Kehoe, P. G. (2005) Large meta-analysis establishes the ACE insertion-deletion polymorphism as a marker of Alzheimer's disease, *Am. J. Epidemiol.* 162, 305-317.
318. Lopez-Real, A., Rey, P., Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., and Labandeira-Garcia, J. L. (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsonism, *J. Neurosci. Res.* 81, 865-873.
319. Hemming, M. L. and Selkoe, D. J. (2005) Amyloid  $\beta$ -protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor, *J. Biol. Chem.* 280, 37644-37650.
320. Oba, R., Igarashi, A., Kamata, M., Nagata, K., Takano, S., and Nakagawa, H. (2005) The N-terminal active centre of human angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide, *Eur. J. Neurosci.* 21, 733-740.
321. Broughton, P. F., Turner, S. R., and Symonds, E. M. (1980) Possible risk with captopril in pregnancy: some animal data, *Lancet.* 1, 1256.
322. Duminy, P. C. and Burger, P. D. (1981) Fetal abnormality associated with the use of captopril during pregnancy, *S. Afr. Med. J.* 60, 805.
323. Plouin, P. F. and Tchobroutsky, C. (1985) [Inhibition of angiotensin converting enzyme in human pregnancy. 15 cases], *Presse Med.* 14, 2175-2178.
324. Niimura, F., Okubo, S., Fogo, A., and Ichikawa, I. (1997) Temporal and spatial expression pattern of the angiotensinogen gene in mice and rats, *Am. J. Physiol.* 272, R142-R147.
325. Costerousse, O., Allegrini, J., Huang, H., Bounhik, J., and henc-Gelas, F. (1994) Regulation of ACE gene expression and plasma levels during rat postnatal development, *Am. J. Physiol.* 267, E745-E753.
326. Gomez, R. A., Lynch, K. R., Sturgill, B. C., Elwood, J. P., Chevalier, R. L., Carey, R. M., and Peach, M. J. (1989) Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney, *Am. J. Physiol.* 257, F850-F858.
327. Norwood, V. F., Craig, M. R., Harris, J. M., and Gomez, R. A. (1997) Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis, *Am. J. Physiol.* 272, R662-R668.
328. Guron, G. and Friberg, P. (2000) An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development, *J. Hypertens.* 18, 123-137.

329. Matsusaka, T., Miyazaki, Y., and Ichikawa, I. (2002) The renin angiotensin system and kidney development, *Annu. Rev. Physiol* 64, 551-561.
330. Tanimoto, K., Sugiyama, F., Goto, Y., Ishida, J., Takimoto, E., Yagami, K., Fukamizu, A., and Murakami, K. (1994) Angiotensinogen-deficient mice with hypotension, *J. Biol. Chem.* 269, 31334-31337.
331. Takahashi, N., Lopez, M. L., Cowhig, J. E., Jr., Taylor, M. A., Hatada, T., Riggs, E., Lee, G., Gomez, R. A., Kim, H. S., and Smithies, O. (2005) Ren1c homozygous null mice are hypotensive and polyuric, but heterozygotes are indistinguishable from wild-type, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 125-132.
332. Kregge, J. H., John, S. W., Langenbach, L. L., Hodgin, J. B., Hagaman, J. R., Bachman, E. S., Jennette, J. C., O'Brien, D. A., and Smithies, O. (1995) Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice, *Nature.* 375, 146-148.
333. Tsuchida, S., Matsusaka, T., Chen, X., Okubo, S., Niimura, F., Nishimura, H., Fogo, A., Utsunomiya, H., Inagami, T., and Ichikawa, I. (1998) Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes, *J. Clin. Invest.* 101, 755-760.
334. Ding, Y., Stec, D. E., and Sigmund, C. D. (2001) Genetic evidence that lethality in angiotensinogen-deficient mice is due to loss of systemic but not renal angiotensinogen, *J. Biol. Chem.* 276, 7431-7436.
335. Niimura, F., Labosky, P. A., Kakuchi, J., Okubo, S., Yoshida, H., Oikawa, T., Ichiki, T., Naftilan, A. J., Fogo, A., Inagami, T., and . (1995) Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation, *J. Clin. Invest.* 96, 2947-2954.
336. Sharp, M. G., Fettes, D., Brooker, G., Clark, A. F., Peters, J., Fleming, S., and Mullins, J. J. (1996) Targeted inactivation of the Ren-2 gene in mice, *Hypertension.* 28, 1126-1131.
337. Ito, M., Oliverio, M. I., Mannon, P. J., Best, C. F., Maeda, N., Smithies, O., and Coffman, T. M. (1995) Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 3521-3525.
338. Morimoto, S. and Sigmund, C. D. (2002) Angiotensin mutant mice: a focus on the brain renin-angiotensin system, *Neuropeptides* 36, 194-200.
339. Wright, J. W., Roberts, K. A., and Harding, J. W. (1988) Drinking to intracerebroventricularly infused angiotensin II, III, and IV in the SHR, *Peptides* 9, 979-984.

340. Methot, D., vanKats, J. P., Lochard, N., Tremblay, F., Silversides, D. W., and Reudelhuber, T. L. (2001) Development and application of a biological peptide pump for the study of the in vivo actions of angiotensin peptides, *Am. J. Hypertens.* 14, 38S-43S.
341. Krege, J. H., Hodgin, J. B., Hagaman, J. R., and Smithies, O. (1995) A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice, *Hypertension.* 25, 1111-1115.
342. Mattson, D. L. (1998) Long-term measurement of arterial blood pressure in conscious mice, *Am. J. Physiol* 274, R564-R570.
343. Gross, V. and Luft, F. C. (2003) Exercising restraint in measuring blood pressure in conscious mice, *Hypertension.* 41, 879-881.
344. Whitesall, S. E., Hoff, J. B., Vollmer, A. P., and D'Alecy, L. G. (2004) Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.* 286, H2408-H2415.
345. Okubo, S., Niimura, F., Matsusaka, T., Fogo, A., Hogan, B. L., and Ichikawa, I. (1998) Angiotensinogen gene null-mutant mice lack homeostatic regulation of glomerular filtration and tubular reabsorption, *Kidney Int.* 53, 617-625.
346. Kagiya, S., Tsuchihashi, T., Abe, I., Matsumura, K., and Fujishima, M. (1999) Antisense inhibition of angiotensinogen attenuates vasopressin release in the paraventricular hypothalamic nucleus of spontaneously hypertensive rats, *Brain Res.* 829, 120-124.
347. Miyazaki, Y. and Ichikawa, I. (2001) Role of the angiotensin receptor in the development of the mammalian kidney and urinary tract, *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* 128, 89-97.
348. Miyazaki, Y., Tsuchida, S., Nishimura, H., Pope, J. C., Harris, R. C., McKanna, J. M., Inagami, T., Hogan, B. L., Fogo, A., and Ichikawa, I. (1998) Angiotensin induces the urinary peristaltic machinery during the perinatal period, *J. Clin. Invest.* 102, 1489-1497.
349. Hypolite, J. A., Chang, S., Zheng, Y., DiSanto, M. E., Zderic, S. A., Wein, A. J., and Chacko, S. (2006) Partial bladder outlet obstruction induces urethral smooth muscle hypertrophy and decreased force generation, *J. Urol.* 175, 777-782.
350. Benevento, B. T. and Sipski, M. L. (2002) Neurogenic bladder, neurogenic bowel, and sexual dysfunction in people with spinal cord injury, *Phys. Ther.* 82, 601-612.



351. Lawrenson, R., Wyndaele, J. J., Vlachonikolis, I., Farmer, C., and Glickman, S. (2001) Renal failure in patients with neurogenic lower urinary tract dysfunction, *Neuroepidemiology*. 20, 138-143.
352. Niedzielski, J. K. (2005) Innervation of narrowed segment of upper ureter in children with ureteropelvic junction obstruction, *J. Pediatr. Surg.* 40, 1219.
353. Yasunaga, F., Kawano, A., Morikawa, N., and Takeyama, M. (1992) Enzyme immunoassay of angiotensin II in human plasma, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 40, 792-794.
354. Le, M. T., Vanderheyden, P. M., Szaszak, M., Hunyady, L., and Vauquelin, G. (2002) Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation, *J. Biol. Chem.* 277, 23107-23110.
355. Rebas, E., Lachowicz-Ochedalska, A., and Pawlikowski, M. (2004) Angiotensin IV stimulates the activity of tyrosine kinases in rat anterior pituitary gland acting via AT1-like receptors?, *J. Physiol Pharmacol.* 55, 107-111.
356. Albiston, A. L., Mustafa, T., McDowall, S. G., Mendelsohn, F. A., Lee, J., and Chai, S. Y. (2003) AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement, *Trends Endocrinol. Metab* 14, 72-77.
357. Sokoloff, L. (1977) Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system, *J. Neurochem.* 29, 13-26.
358. McNay, E. C., Fries, T. M., and Gold, P. E. (2000) Decreases in rat extracellular hippocampal glucose concentration associated with cognitive demand during a spatial task, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 2881-2885.
359. McNay, E. C., Canal, C. E., Sherwin, R. S., and Gold, P. E. (2006) Modulation of memory with septal injections of morphine and glucose: Effects on extracellular glucose levels in the hippocampus, *Physiol Behav.* 87, 298-303.
360. Convit, A. (2005) Links between cognitive impairment in insulin resistance: an explanatory model, *Neurobiol. Aging* 26 Suppl 1, 31-35.
361. Spires, T. L. and Hyman, B. T. (2005) Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals, *NeuroRx*. 2, 423-437.
362. Masliah, E., Sisk, A., Mallory, M., Mucke, L., Schenk, D., and Games, D. (1996) Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice

- overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein and Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 16, 5795-5811.
363. Patel, J. M., Martens, J. R., Li, Y. D., Gelband, C. H., Raizada, M. K., and Block, E. R. (1998) Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation, *Am. J. Physiol* 275, L1061-L1068.
364. Chen, S., Patel, J. M., and Block, E. R. (2000) Angiotensin IV-mediated pulmonary artery vasorelaxation is due to endothelial intracellular calcium release, *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 279, L849-L856.
365. Voswinckel, R., Ghofrani, H. A., Grimminger, F., Seeger, W., and Olschewski, H. (2006) Inhaled treprostinil for treatment of chronic pulmonary arterial hypertension, *Ann. Intern. Med.* 144, 149-150.
366. Montani, D., Sitbon, O., Jais, X., Cabrol, S., Simonneau, G., and Humbert, M. (2005) [Treatment of pulmonary arterial hypertension], *Presse Med.* 34, 1445-1455.
367. Carroll, D., Ring, C., Hunt, K., Ford, G., and Macintyre, S. (2003) Blood pressure reactions to stress and the prediction of future blood pressure: effects of sex, age, and socioeconomic position, *Psychosom. Med.* 65, 1058-1064.

