

Université de Montréal

**Etude de la fonction des systèmes rénine-angiotensine tissulaires**

par  
Danielle Méthot

Département de biochimie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en biochimie

Mai, 1998

©Danielle Méthot, 1998



W  
4  
U58  
1999  
v. 003

Université de Montréal

Étude de la fonction des systèmes rétro-oculaires chez les primates

par  
Christine Milet

Département de psychologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue du diplôme de maîtrise en psychologie  
L'Université de Montréal (1999)

Mars 1999

Christine Milet, 1999



## IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Etude de la fonction des systèmes rénine-angiotensine tissulaires

présentée par:  
Danielle Méthot

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Philippe Crine, président du jury  
Dr Timothy Reudelhuber, directeur de recherche  
Dr David Silversides, codirecteur de recherche  
Dr David Lohnes, membre du jury  
Dr Gaétan Guillemette, examinateur externe  
Dr Ernesto Schiffrin, représentant du doyen

Thèse acceptée le 4 novembre 1998

## SOMMAIRE

Le système rénine-angiotensine (SRA) est reconnu comme un facteur prépondérant dans le maintien de la pression sanguine chez les mammifères. La description classique de ce système implique la rencontre de ses multiples composants dans la circulation en provenance de divers organes. La rénine catalyse la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I (Ang I). Le clivage de cette molécule par l'enzyme de conversion de l'angiotensine résulte par la suite en la production d'un octapeptide, l'angiotensine II (Ang II), responsable des nombreux effets physiologiques du SRA circulant. Alors que les effets de l'Ang II circulante sont bien définis, nos études concernent plutôt la production locale d'Ang II par de nombreux tissus.

Afin d'alléger l'analyse des lignées de souris transgéniques produites au cours de nos études, nous avons utilisé une stratégie de co-injection du minigène de la tyrosinase avec un transgène d'intérêt dans des embryons de souris dérivés d'une souche de type albino. La pigmentation résultant de l'expression de la tyrosinase a été caractérisée comme marqueur de la présence et du niveau d'expression du transgène d'intérêt, de même que pour l'identification de souris homozygotes ou double-transgéniques.

La principale objection à l'encontre du caractère fonctionnel des SRA tissulaires se situe au niveau de la conversion du précurseur de la rénine. En effet, à la différence du rein qui sécrète à la fois de la prorénine et de la rénine, les tissus extra-rénaux



sécrètent uniquement de la prorénine, un précurseur considéré enzymatiquement inactif. Une des hypothèses que nous avons explorée consiste en la possibilité que la prorénine exerce une activité enzymatique au sein d'un tissu sans clivage de son prosegment. Cette possibilité a été étudiée via une approche enzymatique *in vivo* à l'aide de souris double-transgéniques exprimant l'angiotensinogène humain et la prorénine humaine ou différents mutants du site de clivage du prosegment de la prorénine ont été produites. Ces transgènes ont été ciblés dans l'hypophyse antérieure et la production d'Ang I dans ce tissu a été utilisée comme marqueur de l'activité enzymatique des différentes prorénines. Nous avons démontré que la prorénine humaine est enzymatiquement active alors qu'elle est sous la forme d'un précurseur avec son prosegment attaché. Cumulés aux différentes évidences qui étayaient l'hypothèse d'une fonction physiologique des SRA tissulaires, ces travaux indiquent que la prorénine peut être activée en absence de protéolyse dans les tissus et contribuer à la fonction des SRA.

Un deuxième problème inhérent à l'étude de la fonction des SRA tissulaires est la difficulté de distinguer leurs effets locaux des effets systémiques du SRA circulant. Afin d'étudier la fonction spécifique des différents SRA tissulaires, nous avons produit une protéine de fusion permettant le ciblage de l'Ang II dans un tissu. L'intérêt de cette approche est de produire directement un court fragment peptidique résultant d'une cascade enzymatique et d'éviter de devoir exprimer tous les composants du système dans un même tissu. L'Ang II est clivée de la protéine de fusion par une endoprotéase ubiquitaire, la furine, et est sécrétée de façon constitutive

par la cellule. L'efficacité de cette approche a été validée *in vivo* par la démonstration de l'induction d'un marqueur d'hypertrophie cardiaque en absence d'effets systémiques, suite à l'expression transitoire d'Ang II dans le coeur de rat. Cette approche permettra de cibler par transgénèse l'Ang II dans le rein de souris déficientes pour le gène de l'angiotensinogène et de déterminer si l'expression locale du peptide peut corriger les défauts rénaux et le faible taux de survie des souris mutées. L'ensemble de ces projets nous a permis de développer des approches *in vivo* suggérant que les SRA tissulaires sont fonctionnels et qui devraient permettre de définir ces fonctions.

## TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTES DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiii
<b>CHAPITRE 1.....</b>	<b>1</b>
INTRODUCTION.....	2
1.1 Le système rénine-angiotensine circulant .....	2
1.2 Historique du système rénine-angiotensine .....	4
1.3 Les composants du système rénine-angiotensine circulant.....	9
1.3.1 La rénine.....	9
1.3.2 L'angiotensinogène.....	11
1.3.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine.....	12
1.3.4 Les angiotensines.....	14
1.3.5 Les récepteurs de l'angiotensine.....	14
1.4 Fonctions du système rénine-angiotensine circulant.....	15
1.4.1 Effets physiologiques régulant la pression sanguine.....	15
1.4.2 Autres effets physiologiques.....	18
1.5 Les systèmes rénine-angiotensine tissulaires.....	19
1.6 Localisation et fonctions potentielles des systèmes rénine- angiotensine tissulaires.....	26
1.6.1 Le cerveau.....	27
1.6.2 L'hypophyse.....	29
1.6.3 La surrénale.....	30
1.6.4 Le rein.....	31
1.6.5 Le système reproducteur.....	33
1.6.5.1 Le testicule.....	33

1.6.5.2 L'ovaire.....	35
1.6.5.3 L'unité utérus-placenta-embryon.....	37
1.6.6 Le système vasculaire.....	39
1.6.7 Le coeur.....	40
1.6.8 L'oeil.....	42
1.7 Problématique concernant la fonction des systèmes rénine- angiotensine tissulaires.....	43
1.8 Objet de l'étude.....	45
<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>47</b>
Article: Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice	
Abstract.....	48
Introduction.....	49
Materials and Methods.....	50
Results.....	53
Discussion.....	65
Acknowledgments.....	68
References.....	69
<b>CHAPITRE 3.....</b>	<b>72</b>
Article: Human prorenin exhibits enzymatic activity in tissues of transgenic mice	
Abstract.....	73
Introduction.....	74
Materials and Methods.....	76
Results.....	80
Discussion.....	85
Acknowledgments.....	88
References.....	89
<b>CHAPITRE 4.....</b>	<b>95</b>
Article: Tissue targeting of angiotensin peptides	

Abstract.....	96
Introduction.....	97
Materials and Methods.....	99
Results.....	107
Discussion.....	120
Acknowledgments.....	123
References.....	124
<b>CHAPITRE 5.....</b>	<b>130</b>
<b>RESULTATS ADDITIONNELS ET DISCUSSION.....</b>	<b>131</b>
5.1 Evaluation du minigène de la tyrosinase comme marqueur visuel pour l'analyse de souris transgéniques.....	131
5.2 Activité tissulaire de la prorénine humaine dans un modèle de souris transgénique.....	133
5.2.1 Dosage des angiotensines.....	133
5.2.2 Mécanisme d'activation de la prorénine tissulaire.....	136
5.2.3 Autres modèles d'expression de la prorénine.....	140
5.2.4 Conclusion.....	143
5.3 Ciblage tissulaire des peptides d'angiotensine.....	145
5.4 Perspectives.....	148
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>152</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 2.1A	Occurrence of pigmented phenotypes in transgenic mice using tyrosinase minigene co-injection.....	55
Tableau 2.1B	Integration patterns observed in transgenic mouse lines generated by co-injection of tyrosinase and a transgene of interest (TOI).....	58
Tableau 2.2	Relative expression of the tyrosinase minigene and two different (TOI)s .....	64
Tableau 4.1	Ang II values from transfected neonatal rat cardiocytes.....	116
Tableau 4.2	Summary of physiological changes following expression vector injection in rat hearts.....	117
Tableau 5.1	Relative expression of the tyrosinase minigene and different transgenes of interest (TOI).....	132

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1.1	Représentation schématique du système rénine-angiotensine circulant.....	3
Figure 1.2	Sites de clivage de l'angiotensinogène humain et des angiotensines.....	5
Figure 2.1	Pigmentation phenotypes observed in F <sub>2</sub> transgenic mice.....	54
Figure 2.2	Using pigmentation as a marker of TOI homozygosity.....	59
Figure 2.3	Using pigmentation as a marker for homozygosity in backcrosses.....	61
Figure 2.4	Pigmentation as a marker for double TOI integration.....	62
Figure 3.1A	Schematic representation of the renin-angiotensin system.....	75
Figure 3.1B	Schematic representation of the approach used to test for enzymatic activity of prorenin <i>in vivo</i> .....	75
Figure 3.2	Diagram of the transgenes used in this study.....	77
Figure 3.3	Comparison of the mRNA levels of eight independent double transgenic lines by RNase protection assay.....	82

Figure 3.4	Comparison of the pituitary Ang I content of transgenic mice.....	84
Figure 3.5	Western blot analysis for pituitary prorenin and renin.....	86
Figure 4.1	Diagram of the expression vectors pIg (A), pIgPfsAngII (B), and pIgfsAngII (C).....	101
Figure 4.2A	Binding of fsAngII to membrane preparations of AT <sub>1</sub> receptor-transfected COS-1 cells.....	108
Figure 4.2B	Binding of fsAngII to AT <sub>2</sub> receptor in PC12W cell membrane preparations.....	108
Figure 4.3A	Biologic activity of fsAngII; dose response curves.....	111
Figure 4.3B	Biologic activity of fsAngII; time course of [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> recovery.....	111
Figure 4.4	Cleavage and secretion of the fusion protein in transfected cells.....	114
Figure 4.5	Ventricular ANP mRNA expression 7 days post-injection of rat hearts with pIg or pIgPfsAngII.....	118
Figure 5.1	Cleavage and secretion of the fusion proteins in transfected cells.....	146



**LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS**

Ang I	angiotensine I
Ang II	angiotensine II
Ang III	angiotensine III
Ang IV	angiotensine IV
ADN	acide desoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
AT <sub>1</sub>	récepteur de l'angiotensine de type 1
AT <sub>2</sub>	récepteur de l'angiotensine de type 2
AT <sub>4</sub>	récepteur de l'angiotensine de type 4
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis-Menten
nM	nanomolaire
PCR	amplification en chaîne par polymérase
RNase	ribonucléase
SRA	système rénine-angiotensine
TOI	transgene of interest
μM	micromolaire

## REMERCIEMENTS

Terminer un doctorat devrait être un moment particulier d'accomplissement. Pourtant ce moment est assombri par le fait qu'il signifie aussi un départ du laboratoire de biochimie moléculaire de l'hypertension, le "104A". A la sortie du baccalauréat, deux convictions dictaient le choix de mon futur laboratoire de recherche. Eviter le domaine de l'hypertension (!) et ne pas travailler directement sur des modèles animaux. Mon choix pour le moins contradictoire de me joindre à un laboratoire dont les travaux sur la rénine ont exigé la maîtrise des techniques de production et d'analyse de souris transgéniques a été en partie motivé par l'intuition que cet environnement serait unique. Cette perception s'est avérée juste. La motivation scientifique à poursuivre un travail de recherche est souvent tributaire de l'environnement de travail et celui du 104A est privilégié. Le quotidien à la paillasse n'y est jamais monotone, les réunions hebdomadaires sont stimulantes et prétextes à partager une collation qui s'est souvent transformée en festin, et l'esprit d'équipe tout comme l'enthousiasme scientifique qui y règnent ont toujours été conservés au cours des années. Le plaisir des discussions scientifiques avec le directeur de recherche, Timothy Reudelhuber, son souci de demeurer disponible et de s'investir dans la formation scientifique de ses étudiants sont exceptionnels. La confiance et la latitude qu'il accorde à chacun, son intégrité scientifique, l'originalité et la créativité de ses projets, son exigence d'excellence, font partie du bagage qu'il sait si bien transmettre à ses étudiants. J'aimerais lui exprimer toute ma gratitude pour le soutien constant

qu'il m'a accordé tout au long de ces années et pour le privilège d'avoir reçu une formation scientifique sous sa direction.

Ma gratitude envers la technicienne de ce laboratoire, Chantal Mercure, est débordante! Le quotidien du laboratoire et le plaisir des cafés matinaux ont soudé des liens précieux, mais aussi fait naître une grande reconnaissance pour ses judicieux conseils et ses mains magiques qu'aucun problème ne désarme. Son dévouement, son éthique professionnelle, sa débrouillardise légendaire et sa bonne humeur constante contribuent au succès de chacun des étudiants qu'elle forme à la paillasse. Ce fut aussi un plaisir que de travailler avec Véronique Brechler, Isabelle Jutras, Linda Sue Mei, Marc Vendette, Gary Prescott, et enfin notre excellente secrétaire, Viviane Jodoin, et je les remercie pour l'esprit d'équipe qu'ils ont tous eu à coeur de préserver.

S'il est déjà très agréable de travailler dans un tel laboratoire, avoir eu la chance de participer aux travaux d'un second laboratoire dont l'ambiance est tout aussi stimulante devient fort appréciable. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler dans le laboratoire de mon co-directeur de recherche, David Silversides, et j'aimerais le remercier pour la patience inouïe qu'il m'a manifestée lorsqu'il m'a enseigné les techniques associées à la production de souris transgéniques. Il a aussi à coeur de donner une formation de qualité à ses étudiants et sa disponibilité est toujours accompagnée d'une bonne humeur vivifiante. Je remercie aussi Isabelle Daneau et Diana Raiwet qui ont contribué avec beaucoup de générosité à la production et à la

gestion des lignées de souris transgéniques, et enfin les animaliers Normand, Florian, et Paul qui ont si gentiment allégé les corvées de prélèvement de queues de souris.

Je suis très reconnaissante envers Gaétan Thibault, David Lohnes, et Christian Deschepper pour leur intérêt scientifique tout au long de ma thèse. Les bons conseils et l'aide technique de Christian Charbonneau au niveau photographique ont aussi été fort appréciés à chaque soumission d'articles. Enfin, les nombreuses conversations scientifiques avec mon voisin d'étage, Christian Lanctôt, ont été inspirantes, et ses encouragements dans les moments où "rien ne marche" ont toujours fait une différence.

Ces remerciements ne seraient pas complets s'ils n'incluaient pas les gens extérieurs au laboratoire de recherche, mais qui ont parfois une influence si grande sur le cheminement scientifique de ceux qu'ils cotoient. D'abord ma grande copine, Elise Ledoux, dont l'énergie et l'enthousiasme qui l'animaient tout au long de ses études graduées ont été une inspiration et une motivation à quitter le milieu du travail et à entrer tardivement à l'université. Et enfin, ce charmant démonstrateur d'un certain cours de techniques biochimiques, Yves Gélinas, dont l'intérêt tant apprécié pour ma thèse en a fait un érudit de la biologie moléculaire. La contribution qu'il a apportée à ce travail, par sa patience, ses encouragements, et ses nombreuses attentions est inestimable.

Cette thèse a été effectuée grâce au support financier du Conseil de recherches médicales du Canada (CRM), du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), de la Fondation des maladies du coeur du Canada (HSFC), du Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR), de l'Université de Montréal et de la Fondation Desjardins-Association canadienne-française pour l'avancement des sciences (ACFAS).

## **CHAPITRE 1**

### **INTRODUCTION**

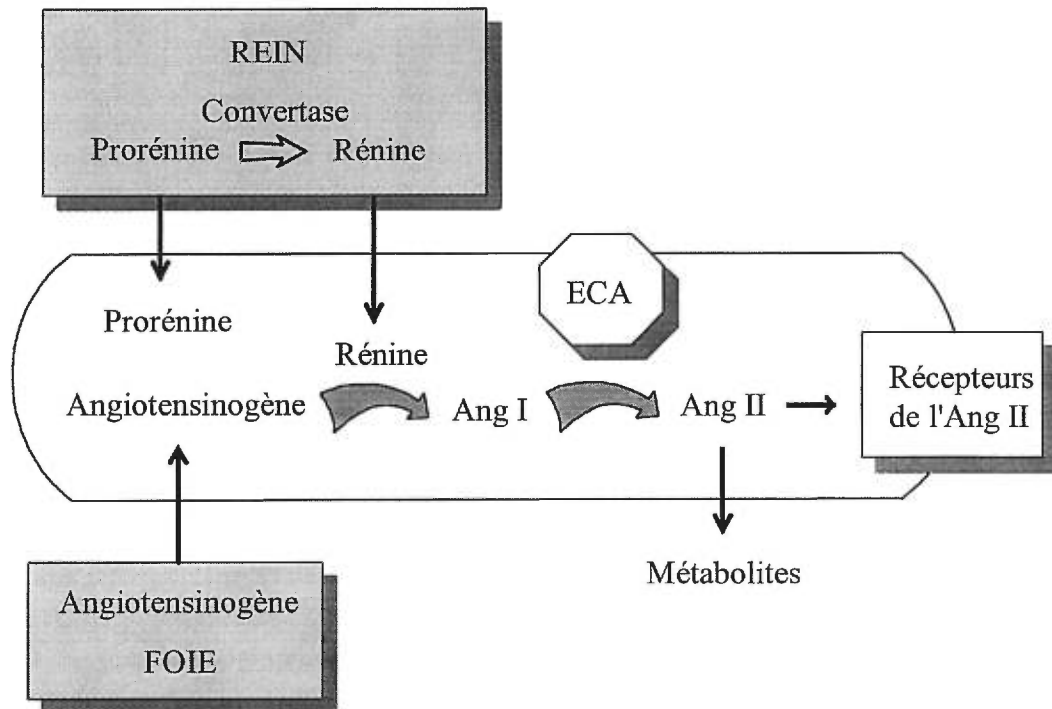


## INTRODUCTION

### 1.1 Le système rénine-angiotensine circulant

Le système rénine-angiotensine (SRA) est maintenant reconnu comme un facteur prépondérant dans le maintien de la pression sanguine chez les mammifères. La description classique de ce système implique la rencontre de ses multiples composants dans la circulation en provenance de divers organes (Figure 1.1). La rénine, une enzyme de type aspartyle protéase, est sécrétée par le rein et agit sur son substrat, l'angiotensinogène. C'est le foie qui synthétise et sécrète l'angiotensinogène, une protéine globulaire qui, une fois clivée par la rénine, génère l'angiotensine I (Ang I), un décapeptide correspondant à la partie N-terminale du précurseur. Les deux résidus d'acides aminés localisés en position C-terminale de l'Ang I sont par la suite éliminés par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), une enzyme ancrée à la membrane des cellules endothéliales tapissant la paroi des vaisseaux sanguins. Ce clivage résulte en la production d'un octapeptide, l'angiotensine II (Ang II), responsable des effets physiologiques du SRA. L'Ang II exerce un effet vasoconstricteur en agissant sur des récepteurs spécifiques à la surface des cellules,  $AT_1$  et  $AT_2$ , et est rapidement dégradée par des aminopeptidases. Les fragments plus petits produits, appelés métabolites, sont l'angiotensine III (Ang III ou Ang 2-8), auquel manque le premier résidu en position N-terminale, et l'angiotensine IV (Ang IV ou Ang 3-8), auquel manque les deux premiers résidus en position N-terminale.





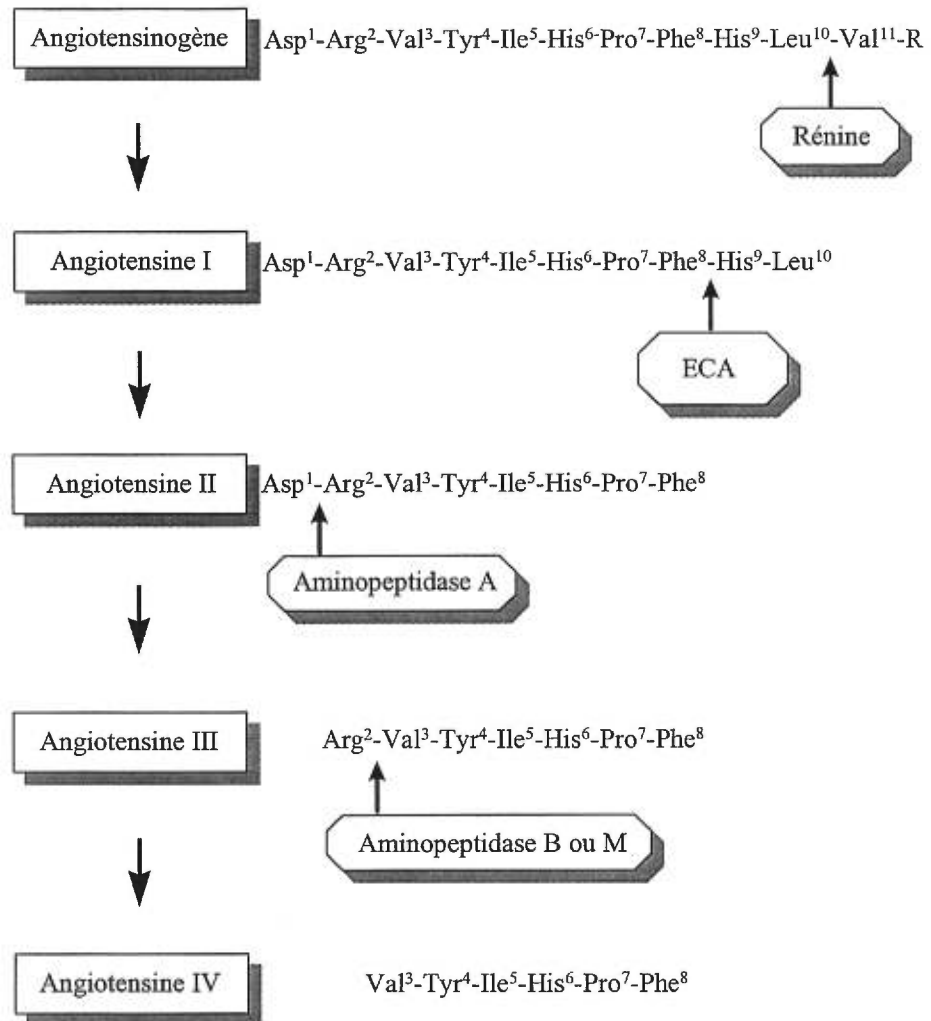
**Figure 1.1** Représentation schématique du système rénine-angiotensine circulant.

Ang I, angiotensine I; Ang II, angiotensine II; ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine.

Ces métabolites seraient en fait responsable de certains des effets ayant été attribués à l'Ang II. La présence d'un troisième récepteur du SRA, le récepteur AT<sub>4</sub>, est aussi postulée. Les sites de clivage des différents composants du SRA sont illustrés à la Figure 1.2.

## 1.2 Historique du système rénine-angiotensine

L'élucidation de la cascade enzymatique menant à la formation de la molécule effectrice du système, l'Ang II, a nécessité de nombreuses années de recherche. L'étude du SRA a débuté par la découverte de la protéine initiant le début de cette réaction en chaîne, la rénine. Brown-Sequard est le premier à avoir proposé un mécanisme de production par un organe d'une substance voyageant dans le sang et affectant la fonction de tout l'organisme. La découverte de la rénine remonte à 1898 lorsque deux chercheurs danois, Tigerstedt et Bergmann, s'inspirant de cette hypothèse, ont eu l'idée d'injecter dans le sang d'animaux anesthésiés des extraits de rein de lapin et d'en vérifier l'effet sur la pression sanguine (1). La dénomination de la rénine, l'agent postulé responsable de l'effet vasopresseur observé, leur revient. L'expérience a cependant été sujette à controverse et n'a pas été considérée par les scientifiques de l'époque. C'est seulement en 1934 que les expériences de Goldblatt et ses collaborateurs ont convaincu la communauté scientifique de la relation entre le rein et la pression artérielle (2). Par des manipulations visant à priver le rein d'oxygène, ils ont provoqué une hypertension chez le chien et établi un premier modèle expérimental d'animal hypertendu. Deux groupes ont démontré par la suite



**Figure 1.2** Sites de clivage de l'angiotensinogène humain et des angiotensines. ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine.

que des extraits de reins provenant d'animaux hypertendus augmentaient la pression sanguine de façon plus marquée que des extraits provenant d'animaux non hypertendus (3,4), suscitant ainsi un vaste intérêt pour la prétendue substance hypertensive. En 1938, Page et ses collaborateurs ont appliqué des extraits rénaux directement sur des organes isolés plutôt que de les injecter dans la circulation et ont observé que les extraits avaient un effet vasopresseur uniquement lorsque mélangés à du plasma, alors qu'ils étaient inactifs dans une solution saline (5). Ils ont judicieusement conclu que l'effet résultant de l'extrait rénal n'était pas directement vasopresseur mais plutôt de nature enzymatique et nécessitait la présence d'un co-facteur (substrat) retrouvé dans le plasma. Le produit actif généré par cette réaction enzymatique a par la suite été isolé par Page et Helmer et nommé angiotonine (6). A la même époque, Braun-Menendez et ses collaborateurs, cherchant à purifier la rénine sur la base de son effet vasoconstricteur, ont abouti à la purification partielle d'une protéine à effet vasopresseur distincte de la rénine et ne nécessitant pas la présence d'un co-facteur (7). Ils ont nommé cette substance hypertensine. C'est seulement en 1958 que la combinaison des appellations angiotonine et hypertensine, alors reconnues synonymes, a engendré le nom angiotensine.

Les résultats des groupes de Page et de Braun-Menendez ont stimulé une course à la purification de l'angiotensine et c'est Skeggs et ses collaborateurs en 1954 qui ont été à l'origine de la découverte de l'existence des deux formes de l'angiotensine, le décapeptide Ang I et l'octapeptide Ang II (8). En 1958, la synthèse de l'Ang I et de l'Ang II (9,10) a permis de réaliser des études pharmacologiques et de développer les

méthodes de mesure des composants du SRA. Ces études ont mené à la reconnaissance du deuxième effet majeur de l'Ang II au début des années 60. Outre son effet vasoconstricteur, l'Ang II stimule la sécrétion d'aldostérone, exerçant ainsi un contrôle à la fois sur la pression sanguine et sur l'homéostasie du sodium (11,12).

Quant aux autres composants du système, c'est Braun-Menendez qui identifia en 1946 le foie comme site de synthèse du co-facteur pressenti par le groupe de Page (13). Il a démontré que la concentration de ce co-facteur de la rénine, l'angiotensinogène, diminuait suite à une hépatectomie ou à un empoisonnement au chloroforme. De 1956 à 1970, différents travaux ont permis la purification de l'ECA et la description de son activité à la fois sur l'Ang I et la bradykinine (14-16). L'existence d'un précurseur ou zymogène de la rénine, la prorénine, a ensuite été identifié dans les fluides amniotiques humains par Lumbers en 1971 (17). Elle a constaté que l'activité enzymatique de la rénine mesurée dans ces fluides augmentait lorsque ces derniers étaient soumis à l'acidification et conclu qu'ils contenaient une forme inactive de la rénine pouvant être activée. La prorénine s'est aussi avérée présente dans le plasma.

Les décennies suivantes ont été prolifiques quant au développement de molécules inhibitrices du SRA, permettant le raffinement de l'étude physiologique du système et offrant de nouvelles possibilités de thérapie pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Les années 70 ont été marquées par la mise au point d'inhibiteurs efficaces de l'ECA (18). Les nombreuses études utilisant ces inhibiteurs de l'ECA ont

confirmé l'importance du SRA dans le contrôle de la pression sanguine et ont suscité un intérêt pour le développement d'inhibiteurs interférant à d'autres étapes dans la cascade du SRA. La recherche d'inhibiteurs de la rénine a débuté dans les années 80 et elle est toujours d'actualité, tout comme la production d'antagonistes de l'Ang II qui a atteint son apogée au cours des années 90. Alors que la chimie des protéines du SRA (purification, quantification et localisation) a marqué la fin des années 70 et le début des années 80 (19-24), l'explosion des techniques de biologie moléculaire a donné lieu au clonage des différents composants du SRA, incluant les récepteurs de l'angiotensine, dans les années 80-90 (25-30). Ont suivi les études de recombinaison homologue de ces mêmes composants chez la souris, ainsi que diverses études de transgénèse chez le rat et la souris dans les années 90, produisant de nombreux modèles animaux pour l'étude cellulaire, physiologique et pharmacologique du système. Ces résultats ont aussi confirmé l'importance physiologique du SRA dans le maintien de la pression sanguine. Les souris mutantes à l'un des loci de la rénine, du gène de l'angiotensinogène, de l'ECA, et de certains des récepteurs de l'angiotensine sont hypotensives (31-38), alors que les souris et rats double-transgéniques exprimant la rénine et l'angiotensinogène humains développent une hypertension chronique (39-41). Chez l'humain, quelques études ont statistiquement démontré une corrélation entre des niveaux élevés d'angiotensinogène plasmatique et l'hypertension (42-44). En outre, une mutation de la partie codante du gène de l'angiotensinogène (méthionine en position 235 mutée pour thréonine) est plus fréquente chez les sujets hypertendus et est associée à des niveaux élevés d'angiotensinogène plasmatique (45-

47). Une association génétique avec les autres composants du SRA et l'hypertension humaine n'a pas été démontrée.

A ce jour, la compréhension du système demeure partielle et les avancées les plus prévisibles devraient permettre (i) l'identification de la convertase responsable du clivage du précurseur de la rénine dans le rein, (ii) la détermination de la fonction des différents métabolites et récepteurs du système, et enfin, (iii) l'élucidation de la fonction des SRA présents dans de nombreux tissus.

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

#### ***1.3.1 La rénine***

La rénine n'exerce aucun autre effet physiologique connu que la protéolyse de son unique substrat, l'angiotensinogène. Son appartenance à la classe des aspartyle protéases lui confère les trois caractéristiques suivantes: (i) la rénine contient deux domaines N- et C-terminaux similaires qui forment deux lobes entourant le site actif lorsque la protéine est repliée (48), (ii) un résidu d'acide aspartique est présent au sein de chaque domaine; ces deux résidus se rencontrent au niveau du site actif et sont essentiels à l'activité protéolytique de l'enzyme (49), et (iii) la rénine est synthétisée sous la forme d'un précurseur (la prorénine) contenant un prosegment en position N-terminale (50). La prorénine, dont le poids moléculaire est de 47 000 daltons, contient 406 acides aminés. Un présegment de 23 acides aminés dirigeant la protéine dans la

voie de sécrétion est d'abord éliminé dès que la prorénine atteint le réticulum endoplasmique. Dans le rein, un prosegment de 43 acides aminés est ensuite éliminé dans la voie de sécrétion régulée et génère la rénine dont le poids moléculaire est de 40 000 daltons (51). La prorénine n'a pas d'activité autocatalytique et la protéase responsable de la conversion de la prorénine en rénine n'est pas encore identifiée. Le clivage du prosegment est très spécifique et s'effectue en aval de deux résidus basiques du prosegment (lysine<sup>42</sup>-arginine<sup>43</sup>) (52). Ce sont les cellules juxtaglomérulaires du rein qui synthétisent, emmagasinent, et sécrètent la rénine (53). Ces cellules sécrètent aussi abondamment la prorénine, en quantité plusieurs fois supérieure à celle de la rénine (4 et 10 fois chez le rat et l'humain respectivement), mais la prorénine n'est jamais convertie en rénine une fois relarguée dans la circulation (54-56). La prorénine constitue donc environ 75% à 90% du contenu total de prorénine et de rénine circulantes chez le rat et l'humain.

La rénine diffère des autres membres de la classe des aspartyle protéases sous deux aspects. Elle est hautement sélective quant à son substrat et à la séquence d'acides aminés adjacents au lien peptidique clivé, et son pH optimum est près de la neutralité, alors que les autres aspartyle protéases sont moins spécifiques et actives à un pH acide (57). La rénine est par conséquent active dans le plasma, et elle démontre une spécificité d'espèce puisque la séquence d'acides aminés de l'angiotensinogène, son unique substrat, varie d'une espèce à l'autre. Chez le rat et autres mammifères, le lien de l'angiotensinogène clivé par la rénine correspond aux résidus d'acides aminés



leucine<sup>10</sup>-leucine<sup>11</sup>. L'angiotensinogène humain contient un lien leucine<sup>10</sup>-valine<sup>11</sup> et n'est clivable que par la rénine humaine ou celle de primate (22,58).

### *1.3.2 L'angiotensinogène*

L'angiotensinogène appartient à la superfamille des serpinines (serine protease inhibitor) (59). C'est une molécule globulaire d'un poids moléculaire de 57 000 daltons, contenant 485 acides aminés dont un signal peptide de 33 acides aminés. Elle est synthétisée de façon constitutive par les hépatocytes. Son clivage par la rénine circulante libère un décapeptide, l'Ang I, correspondant à la partie N-terminale de l'angiotensinogène. Il est intrigant de constater la sous-utilisation de l'angiotensinogène, une molécule de 485 acides aminés, utilisée à la seule fin connue de produire un peptide de 10 acides aminés.

La seule réaction limitante du SRA est la conversion de l'angiotensinogène en Ang I par la rénine. La constante d'affinité ( $K_m$ ) de la rénine pour l'angiotensinogène,  $1,25 \pm 0,1 \mu\text{M}$ , est similaire à la concentration normale de l'angiotensinogène dans le plasma humain et de rat,  $1 \mu\text{M}$  (60). Le substrat n'est donc pas présent en excès dans le plasma et il semble que les variations de sécrétion à la fois du substrat et de l'enzyme (plus fréquentes) limitent le système (60). A la différence de plusieurs enzymes retrouvées dans le plasma, la rénine n'a pas d'inhibiteur. Seule sa sécrétion est modulée. Une fois sécrétée dans le sang, elle produit continuellement de l'Ang I. La situation s'avère différente chez la souris, chez qui la concentration en

angiotensinogène est le principal facteur limitant du SRA. De fait, la surexpression d'angiotensinogène de rat dans un modèle de souris transgéniques, de même que l'augmentation du nombre de copies du gène de l'angiotensinogène par recombinaison homologue, cause une hypertension (32,61), alors que la surexpression de rénine de souris est sans effet sur la pression (62).

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

L'ECA élimine les deux résidus en position C-terminale du décapeptide Ang I afin de le convertir en l'octapeptide Ang II. Elle agit donc comme une dipeptidyl carboxypeptidase. D'un poids moléculaire de 140 000 daltons, cette enzyme contient 1306 acides aminés dont un présegment de 29 acides aminés et deux régions homologues contenant chacune un site actif (51,63). La forme somatique de l'enzyme est présente dans tous les tissus à l'exception du testicule où une forme tronquée de l'enzyme est exprimée. Cette forme résulte de la présence d'un promoteur spécifique au testicule qui est localisé dans le douzième intron de la forme somatique (64). La forme somatique est transcrite de l'exon 1 à 26, excluant l'exon 13, alors que la forme testiculaire est transcrite de l'exon 13 à 26. La forme testiculaire de l'enzyme a une longueur qui correspond environ à la moitié de celle de la forme somatique, un poids moléculaire de 90 000 daltons, et elle ne contient que l'extrémité C-terminale de même qu'un seul site actif (63). Bien que la forme somatique de l'enzyme possède deux sites actifs, des études de mutagenèse dirigée ont démontré que le site en position C-terminale est majoritairement responsable de la conversion de l'Ang I en

Ang II (65). En outre, l'activité de l'ECA nécessite toujours la présence de zinc (63). La présence de l'ECA à la surface des cellules endothéliales permet la production de l'Ang II à l'intérieur de l'espace vasculaire. Son expression, ubiquitaire dans le système vasculaire, est particulièrement élevée dans le réseau sanguin du poumon, de l'oeil et du cerveau (66). Un seul passage du sang à travers les poumons suffit pour convertir la majorité du contenu d'Ang I plasmatique en Ang II (67). La forme prédominante de l'ECA est ancrée à la membrane plasmique des cellules endothéliales et de plusieurs cellules épithéliales et neuronales via un segment hydrophobe de 17 acides aminés localisé dans la région C-terminale de la protéine. Etonnamment, ce fragment est sujet au clivage, ce qui génère une forme soluble de l'enzyme retrouvée dans le plasma et les fluides de l'organisme (66).

L'ECA clive des dipeptides ou des tripeptides en position C-terminale de ses substrats et sa seule exigence est l'absence d'un résidu proline en position P1' du site de clivage (51). Cette enzyme hydrolyse donc plusieurs substrats *in vitro*. La présence d'ions, particulièrement le chlorure, influence grandement la nature du substrat et la vitesse de la conversion. *In vivo*, l'ECA démontre une affinité pour l'Ang I et la bradykinine (63). L'activité enzymatique de l'ECA agit ainsi à deux niveaux qui contribuent tous les deux à l'augmentation de la pression sanguine. Elle active l'Ang I en Ang II, un puissant vasoconstricteur, et inactive la bradykinine, un vasodilatateur.

### *1.3.4 Les angiotensines*

Les angiotensines sont les produits finaux du SRA. Elles sont produites par les clivages successifs de l'angiotensinogène par la rénine (décapeptide Ang I), l'ECA (octapeptide Ang II), et les aminopeptidases (heptapeptide Ang III et hexapeptide Ang IV). L'Ang II est considérée comme l'effecteur principal du SRA puisque l'effet vasoconstricteur des autres angiotensines est beaucoup moindre. Cependant, les angiotensines pourraient avoir d'autres fonctions hormonales qui font actuellement l'objet d'études.

### *1.3.5 Les récepteurs de l'angiotensine*

Trois sous-types de récepteurs de l'angiotensine, désignés AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, et AT<sub>4</sub> ont été décrits jusqu'à présent. Les gènes codant pour les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ont été clonés (28-30), alors que la présence du récepteur AT<sub>4</sub> est postulée (68). L'Ang II exerce ses nombreux effets cardio-vasculaires via le récepteur AT<sub>1</sub>, un récepteur à sept domaines trans-membranaires liant les protéines G. La structure tertiaire du récepteur et les mécanismes de signalisation impliqués, activation de la phospholipase C, inhibition de l'adénylate cyclase, et activation de tyrosine kinases, sont assez bien caractérisés. Les réponses résultant de la liaison du récepteur AT<sub>2</sub> et les mécanismes de transduction cellulaire induits ne sont pas encore bien définis. L'Ang II et l'Ang III lient les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, le récepteur AT<sub>1</sub> étant plus réceptif à l'Ang II, alors que les deux angiotensines démontrent une affinité similaire

pour le récepteur  $AT_2$  (51). L'Ang III et l'Ang IV ont une affinité élevée pour le site de liaison  $AT_4$  (68).

#### **1.4 Fonctions du système rénine-angiotensine circulant**

Le SRA contrôle et maintient la pression sanguine des mammifères en réponse à des variations de pression, de sodium et d'eau dans l'organisme. Les déficiences du SRA ont aussi été impliqués dans l'étiologie de plusieurs maladies de type cardiovasculaire, telles que l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque et vasculaire, l'infarctus du myocarde, de même que les rétinopathies et les néphropathies. D'autres effets physiologiques plus difficilement attribuables au maintien de la pression sanguine sont aussi associés au SRA.

##### ***1.4.1 Effets physiologiques régulant la pression sanguine***

Les effets physiologiques du SRA sont multiples et ont pour but de protéger l'organisme d'une perte excessive de sodium et d'eau. L'équilibre osmotique de part et d'autre de la membrane plasmique des cellules est essentiel au maintien de la vie. Le sodium est l'ion extracellulaire majeur alors que le potassium est l'ion majoritaire dans la partie intracellulaire. Une variation dans la distribution de ces ions affecte non seulement le volume intra- et extracellulaire, mais aussi le volume sanguin et la pression artérielle. Le SRA, via l'Ang II, répond rapidement aux variations du milieu

sanguin et exerce un contrôle sur la résistance (vasoconstriction) et le volume (rétention de sodium et de liquide) sanguins par les effets suivants:

1. Un puissant effet vasoconstricteur sur les cellules du muscle lisse, affectant particulièrement celles localisées au niveau de la paroi vasculaire, et réduisant la capacité du système vasculaire. Cet effet est immédiat. Lorsqu'il est continu, il entraîne une hypertrophie des cellules vasculaires. La sécrétion, par les cellules endothéliales du système vasculaire, d'une deuxième molécule à effet vasoconstricteur, l'endothéline, est aussi induite.
2. Une stimulation au niveau de la partie proximale du tubule rénal afin d'augmenter la réabsorption du sodium. Cet effet est aussi immédiat. L'augmentation de la concentration du sodium entraîne une chute de l'osmolarité qui sera corrigée par une rétention accrue d'eau, ayant comme conséquence une augmentation de la volémie et de la pression sanguine.
3. Une induction de la sécrétion d'aldostérone par la glande surrénale. L'aldostérone est une hormone de type minéralocorticoïde produite dans la zone glomérulée du cortex surrénalien. Cette hormone agit plus lentement sur le rein, au niveau de la partie distale du tubule, menant à la réabsorption du sodium en échange de l'excrétion du potassium. Cet effet entraîne aussi une rétention de liquide. La sécrétion de catécholamine par la médullosurrénale et de cortisol par la zone fasciculée est aussi induite. Les catécholamines (épinéphrine et norépinéphrine)

exercent un effet inotropique (augmentent la force de contraction) et chronotropique (augmentent la fréquence des contractions) sur le coeur, un effet vasoconstricteur sur les vaisseaux sanguins, et facilitent la réabsorption rénale du sodium. Le cortisol facilite la réabsorption du sodium au niveau de la partie proximale du tubule rénal.

4. Une stimulation de la soif et de la synthèse de l'hormone antidiurétique (aussi appelée vasopressine; elle rend les tubules rénaux perméables à l'eau) par le cerveau afin de conserver l'eau. La sécrétion de l'hormone antidiurétique par l'hypophyse postérieure est aussi stimulée.
5. Un effet inotropique et chronotropique sur le coeur afin de maintenir le rendement cardiaque. Une hypertrophie cardiaque peut aussi être induite suite à une stimulation continue.
6. Une stimulation de l'activité du système nerveux sympathique, ce qui amplifie, via la sécrétion d'épinéphrine et de norépinéphrine, l'effet vasoconstricteur, inotropique et chronotropique de l'Ang II.
7. Une stimulation via les catécholamines de l'aggrégation des plaquettes sanguines en réponse à une hémorragie, ce qui minimise la perte de liquide.

8. Une stimulation de la réabsorption d'eau et de sel au niveau de l'intestin afin de réduire la perte de liquide.
9. L'Ang II affecte aussi l'expression des composants du SRA via une boucle rétroactive exerçant un puissant effet d'inhibition sur la sécrétion de la rénine par les cellules juxtaglomérulaires du rein et sur l'expression de son ARN messenger (69), alors qu'elle stabilise l'ARN messenger de l'angiotensinogène dans le foie (51) et diminue l'ARN messenger de l'ECA dans les poumons (70).

Le rein est au centre du contrôle homéostasique exercé par le SRA. Il contient à la fois des barorécepteurs sensibles à la pression sanguine sur les artérioles afférentes et des récepteurs sensibles au contenu sanguin en sodium et potassium sur la macula densa. Le rein est aussi affecté par le système endocrinien et enfin, par le système nerveux sympathique via les nerfs rénaux. Les cellules juxtaglomérulaires sécrètent la rénine en réponse à l'intégration de ces informations.

#### ***1.4.2 Autres effets physiologiques***

D'autres effets de l'Ang II, plus difficiles à intégrer dans le contexte de la régulation du sodium et de l'eau, sont aussi observés:

1. Une stimulation de la glycogénolyse par le foie.



2. Une stimulation de la sécrétion de prostaglandines et d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales du système vasculaire, de même qu'une stimulation de la sécrétion de prostaglandines par le cerveau. Ces molécules ont un effet vasodilatateur qui antagonise l'action de l'Ang II et sont probablement stimulées par l'Ang II afin de protéger l'organisme d'une réponse excessive.
  
3. Une stimulation du comportement exploratoire et une amélioration des processus reliés à l'apprentissage et à la mémoire.

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

Les multiples composants du SRA circulant se rencontrent dans le plasma afin de produire de l'Ang II qui atteint ensuite différents organes-cibles par voie sanguine. Cependant, l'Ang II pourrait aussi être produite localement par un tissu, ainsi que le suggère la présence des ARN messagers et protéines des différents composants du SRA co-localisés dans de nombreux tissus tels que le cerveau, l'hypophyse, la surrénale, le rein, le système reproducteur et vasculaire, le coeur et l'oeil. La présence de SRA tissulaires suppose que l'Ang II produite par un tissu exerce un effet de façon locale, à proximité de son site de formation. Ces systèmes contribueraient de concert et parfois de façon indépendante aux effets physiologiques et pathophysiologiques associés au SRA circulant. Alors que les évidences quant à la présence de tels systèmes sont bien documentées et que les données concernant leur localisation

s'accumulent, la preuve de leur caractère fonctionnel est toujours à démontrer formellement.

La présence et le caractère fonctionnel des SRA tissulaires sont mis en évidence par les approches expérimentales suivantes:

1. Tous les composants du SRA ont été clonés et des anticorps et inhibiteurs reconnaissant ces protéines ont été produits. Ainsi la présence des ARN messagers, protéines ou sites de liaison des différents composants du SRA (prorénine, angiotensinogène, ECA, Ang I, Ang II, et récepteurs de l'Ang II) a été confirmée par de nombreuses études de nature moléculaire, biochimique, immunohistochimique et pharmacologique. Toutefois, il est maintenant reconnu que les SRA vasculaire (71) et cardiaque (72), dont les niveaux de rénine sont inférieurs à ceux du plasma, n'expriment pas le gène de la rénine. Ces systèmes seraient plutôt dépendants de la synthèse de rénine rénale captée via la circulation afin de convertir l'angiotensinogène tissulaire et produire de l'Ang II localement. La très faible quantité de rénine et de son ARN messenger détectée dans ces tissus est maintenant considérée comme résultant d'artéfacts ou de contamination (73). D'autre part, la présence d'angiotensinogène dans certains tissus est parfois attribuée à la détection de l'ARN messenger plutôt qu'à celle de la protéine puisque cette dernière est sécrétée de façon constitutive et non emmagasinée dans des granules de sécrétion. Il n'y a donc pas d'accumulation de la protéine aux sites de synthèse, ce qui rend sa détection difficile. De plus, l'angiotensinogène a une

durée de vie transitoire puisqu'il est converti en Ang I, qui est ensuite convertie en Ang II.

2. a) La quantité d'Ang II détectée dans les tissus et fluides de l'organisme est souvent supérieure à celle détectée dans le plasma, suggérant une production tissulaire plutôt qu'une captation de l'Ang II circulante, présumément attribuée à un phénomène de diffusion. A titre d'exemples, chez le rat, la quantité d'Ang II mesurée dans la surrénale est 100 fois supérieure à la valeur systémique (74), 300 fois supérieure dans l'hypophyse (75), alors que dans les fluides rénaux elle est 1000 fois supérieure (76). Dans les interstices du coeur de chien elle est 100 fois supérieure (77), et chez l'humain elle atteint une concentration 40 fois plus élevée dans le fluide folliculaire ovarien (78).

b) Des régions du cerveau, du testicule et de l'oeil sont protégées des protéines du sang par une barrière sang-tissu qui empêche leur accès au tissu. Des peptides circulants de la taille de l'Ang II ne peuvent traverser cette barrière et diffuser dans le tissu. Ainsi la présence d'Ang II et des autres composants du SRA dans ces régions résulte d'une production locale, indépendante des protéines du SRA circulant.

c) La formation tissulaire d'Ang II est aussi démontrée par le fait que des tissus isolés et perfusés sécrètent de l'Ang II. Ces études ont été réalisées sur des reins,

vaisseaux sanguins et artères (79). L'Ang II est aussi détectable dans des explants d'hypophyse et de surrénale maintenus en culture (75,80).

d) Chez les patients ayant subi l'ablation des deux reins, les concentrations d'Ang I et d'Ang II plasmatiques sont très faibles mais toujours détectables (81). De plus, chez le rat, l'Ang I et l'Ang II demeurent détectables dans les tissus suite à une néphrectomie alors que la rénine ne l'est plus dans la circulation (82). Ces deux études suggèrent une production locale d'Ang II par les tissus et ce via d'autres alternatives que celle impliquant la rénine sécrétée par le rein dans le plasma.

3. L'effet hypotensif des inhibiteurs de l'ECA, d'abord associé à l'inhibition de la formation d'Ang II dans le plasma, semble plutôt être le résultat d'une action sur les SRA tissulaires chez l'animal et l'humain. L'inhibition de la formation d'Ang II circulante est en effet associée à une administration de courte durée des inhibiteurs de l'ECA. Cependant, un traitement de longue durée exerce toujours un effet hypotenseur alors que les concentrations plasmatiques d'Ang II et l'activité de l'ECA dans le plasma sont revenues à la normale, ce qui suggère plutôt une inhibition de la formation d'Ang II tissulaire (83-85). Une diminution de la concentration d'Ang II dans la surrénale a d'ailleurs été démontrée chez le rat suite à un traitement de longue durée (83). Les inhibiteurs de l'ECA causent aussi une régression de l'hypertrophie cardiaque à des doses n'affectant pas la pression sanguine, ce qui invoque une contribution de l'activité du SRA cardiaque (86).

Le fait que l'ECA démontre une affinité pour d'autres substrats que l'Ang I doit aussi être pris en considération lors de l'interprétation de l'effet protecteur des inhibiteurs de l'ECA. Cependant, des résultats comparables sont obtenus suite à l'étude de la dynamique pharmacologique après inhibition de la rénine. Lorsqu'un inhibiteur de la rénine est donné à un patient, l'effet vasodilatateur mesuré au niveau du rein se poursuit alors que le médicament est éliminé de la circulation et que les concentrations d'Ang II plasmatiques sont revenues à la normale (87). La durée de l'effet n'est donc pas corrélée avec l'action de l'inhibiteur sur le SRA circulant, et suggère plutôt une influence sur les SRA tissulaires, présumément au niveau du rein.

4. Un système exerçant une fonction biologique devrait répondre à des stimuli physiologiques. Or, des variations dans l'expression des différents composants des SRA tissulaires sont induites par une variété de facteurs. De plus, la régulation physiologique de certains SRA tissulaires est indépendante de celle observée pour le SRA circulant pour un même stimulus. Ainsi, à la différence de la rénine rénale, cardiaque et surrénalienne, l'expression de la rénine dans certains tissus (glande sous-maxillaire, testicule) n'est pas affectée par une diète élevée ou faible en sodium, alors qu'elle est influencée par les hormones androgènes (51). Toujours en contraste avec l'enzyme rénale, l'adrénocorticotropine stimule la rénine surrénalienne (88). La quantité de prorénine sécrétée par l'ovaire lors du cycle menstruel et de la grossesse est dynamique, en parallèle avec les variations de l'hormone lutéinisante et de l'hormone chorio-gonadotrophine, et ces variations

sont indépendantes de la concentration de la rénine circulante (89). L'expression de l'angiotensinogène est aussi différemment influencée d'un tissu à l'autre, répondant différemment aux traitements hormonaux, au sodium, suite à une néphrectomie bilatérale, et lors de situations telles que l'hypertension et l'inflammation (51). Le contrôle de l'expression de l'ECA est peu connu *in vivo*, à l'exception de celui de la forme testiculaire de l'enzyme par les hormones stéroïdes (90), alors que l'expression de la forme somatique sur les cellules endothéliales est contrôlée par les glucocorticoïdes (91). La présence de mécanismes locaux de contrôle des différents SRA tissulaires suggère que ces systèmes exercent une activité indépendante du système circulant.

5. L'ECA est largement distribuée dans l'organisme. Elle est présente dans les interstices tissulaires, sous forme soluble dans la circulation et autres fluides, et au niveau intracellulaire. Cependant, l'enzyme est principalement ancrée à la membrane de toutes les cellules endothéliales et de plusieurs cellules épithéliales et neuronales. Sa distribution sur la surface luminale de toutes les parois du système vasculaire assure son accessibilité dans tous les tissus et permettrait à la fois la formation d'Ang II circulante et interstitielle. Par recombinaison homologue chez la souris, la partie C-terminale de l'enzyme assurant l'ancrage à la membrane cellulaire a été éliminée, engendrant ainsi une forme active mais sécrétée de l'enzyme (92). Le site actif localisé en position C-terminale est aussi éliminé par cette mutation, alors que le site actif localisé en position N-terminale demeure intact. Ainsi, l'enzyme est présente dans la circulation et disponible pour

le SRA circulant, mais elle n'est plus associée aux tissus et ne peut contribuer à l'activité des SRA tissulaires. La mutation affecte aussi le promoteur spécifique de la forme testiculaire de l'ECA. Le phénotype associé à cette mutation est un abaissement de la pression sanguine, une pathologie rénale, un défaut de la concentration d'urine et une diminution de la fertilité des mâles. La forme tissulaire de l'ECA contribuerait ainsi au maintien de la pression sanguine, au développement et à la fonction du rein, de même qu'à la fertilité. Il est par contre possible que cette conclusion soit hâtive. Le phénotype décrit pourrait aussi être interprété différemment et attribué à la mutation du site actif localisé en position C-terminale. Il est reconnu que les deux sites actifs de l'enzyme ont une affinité similaire pour l'Ang I, mais la vitesse de conversion du site en position C-terminale est supérieure (65). Malgré le fait que le plasma des souris mutées de type homozygote génère de l'Ang II *in vitro*, le phénotype observé pourrait être attribué à une perte d'activité de l'enzyme soluble *in vivo*.

6. Le ratio des concentrations d'angiotensines et de rénine dans la circulation est trop élevé pour être attribuable uniquement à une production plasmatique d'Ang I, et implique une contribution tissulaire. Chez l'humain, tout comme chez l'animal, la vitesse à laquelle l'Ang I est produite par la réaction de la rénine circulante sur son substrat n'est pas suffisamment grande pour expliquer les valeurs élevées d'angiotensines mesurées dans le plasma compte tenu du métabolisme rapide de l'Ang I et de l'Ang II circulantes (93).

## **1.6 Localisation et fonctions potentielles des systèmes rénine-angiotensine tissulaires**

Les effets physiologiques attribuables au SRA circulant sont difficiles à discriminer de ceux des SRA tissulaires. Il est probable que l'Ang II circulante ne soit pas l'unique source contribuant aux effets physiologiques attribués au SRA, mais que des concentrations plus élevées d'Ang II produites localement à proximité des récepteurs localisés sur les cellules-cibles y participent aussi substantiellement. L'Ang II circule d'ailleurs dans le plasma à des concentrations de l'ordre du picomolaire, alors que son affinité pour les récepteurs de l'angiotensine est de l'ordre du nanomolaire (60). Il est souvent suggéré dans la littérature qu'en contraste avec le SRA circulant qui assure une réponse immédiate et systémique aux variations de pression sanguine, les SRA tissulaires auraient une action strictement locale et assureraient ainsi une réponse à plus long terme. La formation locale d'Ang II par les tissus-cibles du SRA circulant (système vasculaire, coeur, cerveau, rein, surrénale) pourrait produire les effets systémiques déjà identifiés du système de façon paracrine ou autocrine. Des fonctions non reconnues du SRA circulant sont aussi pressenties pour certains SRA tissulaires. Ainsi la distribution des composants du système dans les tissus reproducteurs laisse présumer des fonctions associées à la fertilité. Quant à la pathophysiologie associée à l'activité du SRA, l'activité des SRA tissulaires a aussi été impliquée dans le développement de maladies cardio-vasculaires, en particulier l'hypertrophie vasculaire et cardiaque.



### *1.6.1 Le cerveau*

Une grande partie du cerveau est protégée des protéines du sang par une barrière sang-tissu (via les jonctions serrées des cellules endothéliales) empêchant l'accès des protéines plasmatiques au tissu. Chez le rat, l'ARN messager de l'angiotensinogène est présent dans les astrocytes (cellules de soutien du système nerveux) (94), alors que la protéine est localisée à la fois dans les astrocytes et dans les neurones (95,96). La présence d'angiotensinogène dans les neurones résulte probablement d'une captation de la protéine suite à sa sécrétion par les astrocytes. L'ARN messager de la rénine, localisé dans les neurones, y est faiblement détecté et la protéine est peu abondante. L'ECA est largement distribuée dans le cerveau et co-localise avec les autres composants du SRA dans les neurones (63). L'Ang II est aussi présente dans les astrocytes et les neurones, particulièrement au niveau des terminaisons neuronales. Les récepteurs de l'Ang II sont localisés sur les astrocytes et les neurones (97).

Deux régions du cerveau, les organes circumventriculaires et l'area postrema, ne sont pas protégées par la barrière sang-cerveau et sont donc atteintes par l'Ang II circulante. Tous les composants du SRA ont été localisés dans le cerveau. La production locale d'Ang II pourrait contribuer aux effets physiologiques déjà identifiés du SRA circulant. Ceci est mis en évidence par le fait que des injections d'Ang II directement dans le cerveau de rat dupliquent les effets connus du SRA

circulant sur ce tissu et ce, à des doses beaucoup moindres que celles nécessaires lors d'une administration systémique d'Ang II (97).

Les SRA tissulaires, ou certains des composants tissulaires du système, sont parfois associés à des fonctions distinctes de celles du SRA circulant suite à leur localisation spécifique au niveau d'un site fonctionnel de l'organe concerné, ou à la démonstration expérimentale d'une activité physiologique. Des expériences d'injection d'Ang II directement dans le cerveau induisent des augmentations plasmatiques de l'hormone lutéinisante et de l'adrénocorticotropine, et une diminution de la prolactine circulante (98). Ces expériences suggèrent une activité de l'Ang II sur le facteur de libération des gonadotropines, ainsi que sur le facteur de libération des corticotropines, et enfin sur la dopamine, qui inhibe la sécrétion de la prolactine. En contraste avec la modulation de la sécrétion hormonale induite par l'injection d'Ang II directement dans le cerveau, l'administration systémique d'Ang II est sans effet sur la sécrétion de l'hormone lutéinisante alors qu'elle augmente la sécrétion de prolactine. L'oxytocine et la vasopressine sont aussi stimulées par des injections d'Ang II dans le cerveau (99,100). Une fonction distincte de l'Ang II en tant que neurotransmetteur est aussi postulée dans le cerveau. De même, il est possible que l'activité de l'ECA dans certaines régions du cerveau où les autres composants du SRA ne sont pas exprimés concerne plutôt la dégradation de neuropeptides.

### *1.6.2 L'hypophyse*

Chez le rat, la prorénine (101), l'angiotensinogène (104), l'ECA (102) et l'Ang II (75) sont tous co-localisés dans les cellules gonadotropes (type cellulaire produisant l'hormone lutéinisante) de l'hypophyse antérieure, et l'angiotensinogène est aussi présent dans un type cellulaire non identifié de la même région (ne co-localise avec aucune hormone hypophysaire) (103,104). L'ARN messenger de la rénine est détecté dans le lobe antérieur et intermédiaire de la glande (105), alors que l'ARN messenger de l'angiotensinogène est révélé dans le lobe antérieur seulement (106). Toutes les protéines du système, à l'exception de la rénine, ont aussi été détectées dans le lobe intermédiaire (107). L'ECA (108) et l'Ang II (109) sont aussi présentes dans la neurohypophyse, site de synthèse de l'oxytocine et de la vasopressine. Les récepteurs de l'angiotensine sont répartis sur les cellules lactotropes et corticotropes (cellules produisant respectivement la prolactine et l'adrénocorticotropine), et à un niveau moindre, sur les cellules thyrotropes (cellules produisant la thyrotropine) (110,111). Ainsi, tous les composants du SRA sont exprimés dans l'hypophyse de rat et, à l'exception des récepteurs, co-localisés dans les cellules gonadotropes. Le type cellulaire diffère chez l'humain, la prorénine, l'angiotensinogène et l'ECA étant co-exprimés dans les cellules lactotropes (112).

La fonction de l'Ang II hypophysaire n'est pas encore élucidée. Une activité sur la sécrétion hormonale hypophysaire semble vraisemblable. L'addition d'Ang II à des cellules hypophysaires en culture stimule la sécrétion de prolactine et

d'adrénocorticotropine (97), ce qui est corrélé avec la localisation des récepteurs de l'Ang II sur les cellules lactotropes et corticotropes.

### ***1.6.3 La surrénale***

Chez le rat, la rénine et son ARN messenger (105), l'ARN messenger de l'angiotensinogène (113), l'ECA (114), l'Ang II (74) et ses récepteurs (115) sont tous localisés dans la zone glomérulée, la couche cellulaire externe du cortex surrénalien. Cette région est le site de synthèse des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes et des hormones androgènes. Les composants du SRA sont aussi présents dans d'autres régions de la glande. Ainsi l'Ang II et ses récepteurs sont détectés dans la zone fasciculée du cortex surrénalien (couche sous-jacente de la zone glomérulée) et dans la médullosurrénale (couche la plus interne de la glande sécrétant l'épinéphrine et la norépinéphrine) (74,115), alors que la rénine est présente dans la zone réticulée (troisième et dernière couche du cortex surrénalien) (116), et que l'ECA se retrouve dans la médullosurrénale (114). Chez l'humain, l'Ang II et les ARN messagers et protéines de la rénine, de l'angiotensinogène et de l'ECA ont aussi été co-localisés dans la surrénale (117).

Puisque les composants du système SRA sont tous localisés dans la zone glomérulée de la surrénale, site de production de l'aldostérone, il est proposé que l'Ang II produite localement par la surrénale influence la sécrétion d'aldostérone, et subséquemment la rétention du sodium. Les quelques évidences physiologiques

supportant cette proposition se retrouvent dans le fait que les variations dans l'absorption de sodium et de potassium, un traitement à l'adrénocorticotropine, de même qu'une néphrectomie influencent dans la même direction les niveaux de rénine et d'aldostérone surrénaliens (118). Il est d'ailleurs notable qu'une absorption élevée de potassium augmente la production de rénine par la surrénale, alors qu'elle supprime celle de la rénine circulante (119). De plus, lorsqu'un explant de surrénale est maintenu en culture, la production à la fois d'Ang II et d'aldostérone de la glande est réduite en présence d'un inhibiteur de l'ECA (80).

#### ***1.6.4 Le rein***

La rénine et son ARN messenger sont localisés dans les cellules juxtaglomerulaires chez le rat (105). Les cellules juxtaglomérulaires sont des cellules modifiées du muscle lisse qui sont logées sur la paroi de l'artériole afférente à proximité immédiate avec la macula densa du glomérule. La rénine active et la prorénine sont sécrétées par ces cellules dans l'espace interstitiel (120). L'Ang II est co-localisée avec la rénine dans les cellules juxtaglomérulaires (121), alors que l'ARN messenger de l'angiotensinogène n'y est pas détecté. La protéine est cependant détectable (122) et est probablement captée par les cellules juxtaglomérulaires puis convertie en angiotensine (123).

L'angiotensinogène et son ARN messenger sont présents dans les cellules épithéliales de la partie proximale du tubule rénal du rat. Ces cellules contiennent aussi de la

rénine, qui est probablement captée de l'espace interstitiel. L'ECA, abondamment ancrée aux membrane, est aussi co-localisée dans ces cellules avec de fortes concentrations d'Ang II. Les récepteurs de l'angiotensine sont largement dispersés dans le rein, et en autres, sur les cellules épithéliales du tubule proximal (53,124). Chez le rat, le filtrat glomérulaire et le fluide des tubules proximaux contiennent des niveaux d'Ang II 1000 fois supérieurs aux valeurs systémiques (76). Cette concentration résulte probablement de la sécrétion du peptide par les cellules juxtaglomérulaires et par les cellules épithéliales du tubule proximal, ou encore de sa production dans l'interstice cellulaire rénal. Les haut niveaux d'Ang II (6 à 8 nM) mesurés dans le fluide du tubule proximal et du filtrat glomérulaire agissent probablement sur les récepteurs avoisinants. Les récepteurs de l'angiotensine sur les cellules du tubule proximal ont une affinité de 2 à 10 nM pour l'Ang II et il est donc prévisible que la production locale d'Ang II influence la fonction du tubule rénal, de même que la fonction glomérulaire (76). Le SRA du tubule proximal serait ainsi impliqué dans la régulation à long terme de la résistance rénale vasculaire et de la pression sanguine via la régulation de la réabsorption du sodium.

Le différents composants du SRA sont largement exprimés dans le rein au cours de l'embryogénèse chez plusieurs espèces et leur localisation varie pendant le développement pour finalement être restreinte à certains types cellulaires (53), impliquant une régulation des composants et possiblement une fonction du SRA rénal lors du développement du rein. D'ailleurs, chez le rat, le traitement de nouveaux-nés avec des inhibiteurs du SRA (ECA et récepteurs) affecte la croissance, la

morphologie et la fonction rénales (125-127). Chez l'humain, la prise d'inhibiteurs de l'ECA a provoqué des rejets d'embryons présentant des défauts rénaux (128).

### ***1.6.5 Le système reproducteur***

#### *1.6.5.1 Le testicule*

L'existence d'une forme tronquée et fonctionnelle de l'ECA est unique à ce tissu et abondamment exprimée à la puberté. Chez le rat, elle se retrouve dans les cellules de Leydig (cellules interstitielles du testicule sécrétant les hormones mâles) et dans les spermatozoïdes. La forme somatique de l'enzyme est exprimée dans la lumière des tubules séminifères du testicule et dans la lumière et à la surface des cellules épithéliales de l'épididyme (en aval du testicule) (63,129). La rénine et son ARN messager sont détectés dans les cellules de Leydig (105) et son expression serait modulée par l'hormone lutéinisante et l'hormone chorio-gonadotrophine (130,131). L'ARN messager de l'angiotensinogène est détectable dans le testicule de la souris mais non chez le rat (113). L'Ang II est présente dans les cellules de Leydig (131) et les récepteurs de l'Ang II sont distribués sur les cellules de Leydig (132,133), les cellules de Sertoli (cellules nutritives du testicule) (134), les cellules épithéliales de l'épididyme (133), le canal déférent (conduit en aval de l'épididyme) (135) et enfin, sur les spermatozoïdes (133).

Chez l'humain, la prorénine est aussi exprimée au niveau des cellules de Leydig (116) et la concentration de prorénine détectée dans le sang veineux au niveau du testicule est 4 fois plus élevée que la concentration systémique (136). La même constatation s'applique au niveau du sperme, la concentration de prorénine y étant supérieure par un facteur de 2 à 6 fois relativement à la concentration systémique (137). La présence de la forme testiculaire de l'ECA et des récepteurs de l'Ang II ont aussi été démontrée dans le sperme et sur les spermatozoïdes humains (97).

La forme testiculaire de l'ECA associée aux spermatozoïdes implique possiblement un rôle lors du développement, de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes. Il est d'ailleurs démontré que l'activité de l'enzyme augmente lors de l'initiation de la spermatogénèse, et que le gradient croissant de la concentration de l'enzyme le long de l'épididyme est corrélé avec l'augmentation de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes (138). Une diminution de la fertilité chez les mâles est parmi les phénotypes observés lors de la recombinaison homologue du gène de l'ECA chez la souris si la recombinaison cible un exon localisé dans la région codant pour la forme testiculaire (35,36,92). Ce phénotype n'est pas observé lorsque la recombinaison homologue de l'ECA cible la forme somatique tout en préservant la région codante de la forme testiculaire (37), ou lors de la recombinaison homologue du gène de l'angiotensinogène (32-34). Ceci suggère que seule la forme testiculaire de l'ECA affecte la fertilité des mâles et que sa contribution à la fonction reproductrice agit via une activité sur un substrat non identifié et non pas dans le cadre du SRA. Les



inhibiteurs de l'ECA sont sans effet sur la fonction testiculaire, possiblement parce que ce tissu est en partie protégé par une barrière sang-tissu (97).

La fonction de l'Ang II testiculaire n'est pas déterminée. Des effets sur la sécrétion de la testostérone par les cellules de Leydig, la contraction de l'épididyme, et la transmission noradrénergique au niveau du canal déférent, sites d'expression des récepteurs de l'angiotensine, ont été proposés (97).

#### *1.6.5.2 L'ovaire*

Chez le rat, la rénine et son ARN messenger sont présents dans le corps jaune (vestige du follicule après libération de l'ovule). L'ARN messenger de l'angiotensinogène est aussi détecté dans l'ovaire, et la protéine se retrouve dans le corps jaune et les cellules granulosas (couche de cellules entourant l'ovaire dans le follicule), tout comme l'ECA. L'Ang II est présente dans le corps jaune et les cellules thécales (couche de cellules externes aux cellules granulosas dans le follicule) et ses récepteurs sont localisés sur les cellules granulosas et thécales.

Dans l'ovaire humain, la prorénine et l'Ang II sont co-localisées dans les mêmes types cellulaires (97,129). L'ovaire humain est d'ailleurs particulier pour la quantité exceptionnellement élevée de prorénine qu'il sécrète. La sécrétion de prorénine par l'ovaire est cyclique. Elle double dans le plasma lors du pic de sécrétion de l'hormone lutéinisante pendant trois jours lors de l'ovulation (139,140). Cette augmentation est

aussi observée chez les femmes dont l'ovulation est provoquée par l'administration de l'hormone chorio-gonadotrophine (141). Les composants du SRA (prorénine, angiotensinogène, Ang I et Ang II) sont présents dans les fluides folliculaires ovariens humains (78). Ces fluides contiennent une concentration de prorénine 10 fois plus élevée que la valeur plasmatique au moment de l'ovulation. A cette même période, la concentration d'Ang II dans ces fluides est alors 40 fois plus élevée que dans la circulation.

La possible contribution de l'angiotensine lors du processus d'ovulation a été étudiée *in vitro*. Lorsque des ovaires de rat ou de lapin sont perfusés, l'Ang II facilite l'ovulation et stimule la sécrétion d'oestrogène. Cependant des résultats contradictoires ont été produits quant au blocage de ces deux phénomènes chez le rat par les inhibiteurs du SRA (récepteurs et ECA). L'administration de différents inhibiteurs du SRA est souvent sans effet sur l'ovulation et la sécrétion hormonale. Le blocage de l'ovulation via l'administration d'un inhibiteur des récepteurs de l'Ang II chez des rats immatures dont l'ovulation est stimulée par un traitement hormonal a cependant été démontré. Une autre fonction postulée de l'Ang II ovarienne concerne l'atrésie folliculaire via l'implication potentielle du récepteur de type AT<sub>2</sub> dans l'apoptose (97,129).

### *1.6.5.3 L'unité utérus-placenta-embryon*

Chez l'humain, lors de la grossesse, la concentration plasmatique de prorénine augmente par un facteur de 10 pendant les trois premières semaines suivant la conception (en provenance de l'ovaire), et demeure élevée par un facteur de 3 jusqu'à la fin de la grossesse (en provenance de l'unité utérus-placenta-foetus) (142). Ces augmentations sont parallèles à celle de l'hormone chorio-gonadotrophine dans le plasma qui est sécrétée par les villosités placentaires (142). La provenance de la prorénine utérine est principalement l'endomètre (muqueuse utérine), et plus faiblement le myomètre (muscle utérin qui est recouvert par l'endomètre). Cependant, l'ARN messager de la rénine est détecté seulement dans l'endomètre. La présence d'angiotensinogène n'a pas été démontrée dans ce tissu. L'ECA est localisée dans l'endomètre et son expression est particulièrement intense à la fin du cycle menstruel (143). L'Ang II et les récepteurs de l'angiotensine sont aussi présents dans l'utérus (144).

Lors de la grossesse, l'endomètre utérin est converti en caduque (partie maternelle du placenta) et la quantité de prorénine produite augmente. Lors des huit premières semaines de grossesse, l'embryon humain baigne dans la cavité chorionique qui est graduellement remplacée par la cavité amniotique. Des niveaux de prorénine extraordinairement élevés sont alors détectés dans la cavité chorionique. La concentration de prorénine dans ces fluides est 1000 fois supérieure à celle du plasma normal et 100 fois supérieure à celle du plasma en cours de grossesse (145). La

concentration diminue par la suite et atteint 16 fois la valeur du plasma (en cours de grossesse) lors des deux derniers trimestres de la grossesse (146), alors que les fluides sont devenus de nature amniotique. Des variations parallèles de l'hormone chorio-gonadotrophine sont aussi observées dans ces fluides (145). La prorénine est détectée dans le chorion (membrane extérieure enveloppant l'embryon et en contact avec la caduque; partie embryonnaire du placenta) (147,148) et l'amnion (membrane intérieure enveloppant l'embryon) (149), mais seulement le chorion exprime l'ARN messager de la rénine (150). Il est cependant possible que l'ARN messager détecté dans le chorion provienne d'une contamination de la caduque qui lui est associée (150). La source de prorénine des fluides chorionique et amniotique serait donc la caduque et/ou le chorion. Toutefois, le rein foetal, le sac vitellin (réserve nutritive) et le trophoblaste (cellules nourricières du placenta) sont aussi proposés comme origine, puisque la concentration de prorénine entourant l'embryon lors d'une grossesse ectopique est aussi fortement élevée (145).

L'implication physiologique de la forte concentration de prorénine dans les fluides entourant le fœtus lors de la grossesse est énigmatique. Il est certainement attrayant de concevoir un rôle via la production d'Ang II dans la modulation de l'angiogenèse, du flot sanguin, de la sécrétion hormonale, de la croissance embryonnaire et foetale (145), et finalement, comme inducteur des contractions utérines (129), puisque l'Ang II peut induire ces effets sur d'autres tissus.

### ***1.6.6 Le système vasculaire***

Le système vasculaire, tout comme le coeur, a longtemps été à la source de résultats conflictuels quant à la production locale de rénine. Il est maintenant bien accepté que la faible quantité de rénine détectée dans ces tissus est le produit d'artéfacts méthodologiques ou de contamination du sang (73). La démonstration d'une captation de la rénine de la circulation par le système vasculaire est particulièrement mise en évidence par le fait que des pattes arrières de rat isolées et perfusées produisent de l'Ang II et que cette production est abolie si une néphrectomie bilatérale précède l'isolement et la perfusion (71). Les vaisseaux sont composés de différentes couches cellulaires de la lumière vers l'extérieur: une première couche de cellules endothéliales (intima), puis plusieurs couches de cellules du muscle lisse (media), et enfin le tissu conjonctif (adventice). L'ARN messager de l'angiotensinogène est localisé dans les cellules du muscle lisse, dans l'adventice, et de façon étonnante, dans le gras périvasculaire (151,152). L'ECA, en plus d'être présente sur les cellules endothéliales, est fortement exprimée sur l'adventice (153). L'Ang II est mesurable dans les artères et dans le gras périvasculaire (154) et ses récepteurs sont distribués sur les cellules endothéliales et du muscle lisse (155).

L'Ang II produite localement pourrait contribuer de façon paracrine et autocrine aux effets physiologiques du SRA circulant sur le système vasculaire, soit la vasoconstriction des cellules du muscle lisse (et l'hypertrophie lors d'états pathophysiologiques), la régulation de la sécrétion des cellules endothéliales, et la

modulation de l'activité sympathique vasculaire. La source majeure d'angiotensinogène du SRA vasculaire étant localisée dans les tissus adipeux entourant les vaisseaux sanguins, il est aussi proposé qu'un SRA adipeux, synthétisant *in situ* l'angiotensinogène, puis l'Ang II, participe à la thermogénèse de l'organisme en induisant la sécrétion de norépinéphrine des fibres nerveuses du tissu adipeux (154). L'association hypertension et obésité pourrait aussi impliquer un SRA adipeux. Chez un individu obèse les tissus adipeux hautement vascularisés contribueraient localement à la production d'Ang II. Le peptide agirait ensuite à proximité sur les cellules du muscle lisse du système vasculaire qui se contractent en réponse à l'Ang II (154).

#### **1.6.7 Le coeur**

Chez le rat, les ARN messagers et protéines de l'angiotensinogène et de l'ECA, ainsi que la molécule d'Ang II, sont plus abondamment détectés dans l'oreillette que dans le ventricule (72,154). La localisation de ces composants au niveau cellulaire n'est pas encore précisée. Les récepteurs de l'Ang II sont largement distribués dans le tissu (156). La quantité de rénine et de son ARN messager est tellement faible lorsque détectée qu'il semble que la protéine soit captée de la circulation (73). La capacité du coeur à capter la rénine a d'ailleurs été démontrée par la présence de radioactivité dans le coeur et les vaisseaux sanguins suite à l'injection de rénine radioactive chez le lapin et le singe (157,158).

Dans le coeur, il est postulé que la formation d'Ang II locale contribue aux effets inotropique, chronotropique et sympathique associés au SRA circulant, et de façon plus précise à l'effet hypertrophique du système. La stimulation de la croissance exercée par l'Ang II est bien documentée *in vitro*. Les cellules vasculaires du muscle lisse et les myocytes maintenus en culture ont une réponse hypertrophique (augmentation de la synthèse d'ARN messagers et de protéines) en présence d'Ang II exogène. L'Ang II endogène est aussi sécrétée par ces deux types cellulaires lorsque leur croissance est stimulée par l'étirement des surfaces auxquelles elles adhèrent en culture (79). Si ces propriétés hypertrophiques existent *in vivo*, il est possible qu'elles soient d'origine locale et résultent de l'activité des SRA vasculaire et cardiaque. Un nombre limité d'évidences laisse présumer d'une telle fonction des SRA tissulaires *in vivo*. Une augmentation du contenu d'ARN messenger de l'angiotensinogène et de la rénine dans le coeur est associée au développement de l'hypertrophie cardiaque chez le rat spontanément hypertendu (hypertension d'origine génétique) (159). Une augmentation du contenu protéique de l'ECA et des ARN messagers à la fois de l'ECA et de l'angiotensinogène dans le coeur est aussi observée lorsque l'hypertrophie cardiaque est induite par chirurgie (86,160). De surcroît, l'administration d'inhibiteurs de l'ECA à des doses n'abaissant pas la pression artérielle systémique prévient et permet la régression de cette hypertrophie (161), étayant par le fait même l'hypothèse d'une contribution du SRA cardiaque.

La même observation s'applique au niveau vasculaire. L'introduction chirurgicale d'un ballon dans le vaisseau brise les cellules endothéliales, ce qui permet aux

cellules du muscle lisse sous-jacentes de migrer jusqu'à la lumière du vaisseau et de proliférer. Il y a alors induction de l'ECA et, si de l'Ang II est infusée, la prolifération des cellules du muscle lisse est amplifiée. Cet effet est aussi aboli par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'ECA, et à un degré moindre par les récepteurs de l'Ang II (162).

### ***1.6.8 L'oeil***

Les ARN messagers de la rénine, de l'angiotensinogène et de l'ECA sont détectés dans l'oeil humain et co-localisent au niveau des cellules épithéliales de la rétine, une région de l'oeil protégée du sang par une barrière sang-tissu (163). La prorénine, l'angiotensinogène, l'ECA et l'Ang II sont aussi présents dans les fluides oculaires (164,165). Les récepteurs de l'Ang II étant présents sur les vaisseaux rétiniens, il est possible que la production locale d'Ang II soit impliquée dans la régulation de la pression de l'oeil. Il a été démontré que l'implantation d'Ang II sur la cornée de lapin induisait une néovascularisation (166). Le phénomène de néovascularisation est un marqueur de rétinopathie et il est notable que des hauts niveaux de prorénine, à la fois dans le plasma et dans les fluides vitreux, soient corrélés avec la rétinopathie diabétique (164).



## **1.7 Problématique concernant la fonction des systèmes rénine-angiotensine tissulaires**

La distribution des composants du SRA dans de nombreux tissus de l'organisme a provoqué l'assertion que ces systèmes exercent une fonction physiologique. Cependant, la principale objection concernant le caractère fonctionnel des SRA tissulaires a trait à l'activation de la prorénine. La prorénine est un précurseur à caractère unique qui est produit par plusieurs tissus et se retrouve dans les fluides et dans la circulation à des concentrations plusieurs fois supérieures à celle de la rénine. La détection de la rénine et de son ARN messager dans un tissu est une évidence uniquement de la synthèse de prorénine par ce tissu. Pour être fonctionnel, un tissu devrait non seulement exprimer le gène de la rénine mais activer la prorénine résultante. Il s'avère cependant que le rein est l'unique organe sécrétant de la rénine, puisqu'une néphrectomie bilatérale chez l'humain résulte en la disparition de niveaux détectables de rénine dans la circulation deux jours suivant la chirurgie. Ceux-ci demeurent non détectable aussi longtemps que les reins ne sont pas remplacés. Toutefois, les niveaux de prorénine plasmatique demeurent détectables et varient selon les études de 35 à 75% lorsque comparés aux niveaux de sujets normaux (55,81,167,168). Les tissus extra-rénaux sécrètent donc la prorénine dans le plasma et cette prorénine n'est pas convertie en rénine.

Comment concilier la présence de SRA tissulaires et les différentes évidences de leur caractère fonctionnel avec le fait que ces tissus sécrètent uniquement de la prorénine,

qui est considérée inactive? La captation par les tissus de la rénine circulante dérivée du rein est une alternative probablement utilisée par le système vasculaire et le coeur afin de produire localement de l'Ang II. Cependant, à la différence des autres SRA tissulaires, le coeur et le système vasculaire n'expriment pas le gène de la rénine et s'accommodent ainsi peut-être de cette alternative malgré le fait qu'elle n'offre pas au tissu l'avantage d'une régulation et d'une activité indépendante de la rénine circulante. Une autre alternative pour un SRA tissulaire serait l'intervention d'enzymes autres que la rénine capables de convertir l'angiotensinogène en Ang I, ou directement en Ang II. Quelques études font état d'enzymes démontrant une activité enzymatique sur l'angiotensinogène *in vitro*. Cependant de telles activités enzymatiques n'ont jamais été démontrées *in vivo* et plusieurs raisons (localisation dans les lysosomes, pH optimal, etc.) suggèrent que ces enzymes ne pourraient cliver l'angiotensinogène dans un tissu. Une troisième alternative, explorée au chapitre 3, est la possibilité que la prorénine exerce une activité enzymatique au sein d'un tissu sans clivage de son prosegment et contribue ainsi à la fonction des SRA tissulaires. La présence de prorénine, parfois en très grande quantité, dans de multiples tissus co-exprimant les autres composants du SRA, indique que ces systèmes pourraient être actifs via la prorénine en tant que système prorénine active-angiotensine.

Un deuxième problème ayant trait à la fonction des SRA tissulaires concerne la définition des effets attribuables aux SRA tissulaires. Bien que plusieurs évidences étayent l'hypothèse d'une fonction physiologique des SRA tissulaires, il est difficile

de déterminer les contributions relatives de l'Ang II circulante et de celle produite localement, les deux systèmes agissant vraisemblablement de concert.

### 1.8 Objet de l'étude

L'intérêt premier de cette thèse concerne le caractère fonctionnel des SRA tissulaires et sera abordé dans des modèles *in vivo*. Le chapitre 2, sous forme d'article, décrit l'utilisation d'un outil de travail, la co-injection du minigène de la tyrosinase avec différents transgènes d'intérêt dans des embryons de souris dérivés d'une souche de type albino. Les souris de type albino sont déficientes pour le gène de la tyrosinase, une enzyme nécessaire à la production de mélanine. La pigmentation résultant de l'expression de la tyrosinase a été caractérisée comme marqueur de la présence et du niveau d'expression du transgène d'intérêt, de même que pour l'identification de souris homozygotes et double-transgéniques, suite à la co-intégration et à la co-ségrégation du minigène de la tyrosinase et du transgène d'intérêt. Cet outil s'est avéré fort utile pour l'étude des nombreuses lignées de souris transgéniques produites pour l'étude de l'activation tissulaire de la prorénine. Des résultats additionnels ont été recueillis après la parution de cet article et sont présentés au chapitre 5.

Le chapitre 3, sous forme d'article, aborde la problématique de l'activation tissulaire de la prorénine. Une étude enzymatique *in vivo* a été conçue afin de déterminer si la prorénine peut être activée dans un tissu sans clivage du prosegment. Des souris double-transgéniques exprimant l'angiotensinogène humain (substrat) et la prorénine

humaine ou différents mutants du site de clivage du prosegment ont été produites. Ces transgènes ont été ciblés dans l'hypophyse et la production d'Ang I (le produit de la réaction enzymatique) dans ce tissu a été utilisée comme marqueur de l'activité enzymatique.

Le chapitre 4, sous forme d'article, traite de la fonction de l'Ang II tissulaire et décrit la mise au point et la caractérisation d'une protéine de fusion permettant le ciblage de l'Ang II directement dans un tissu, évitant ainsi la tâche laborieuse de cibler tous les composants du SRA dans un même tissu afin de produire la molécule effectrice du système. Le potentiel d'une telle approche est d'arriver à discriminer entre les effets locaux d'une synthèse d'Ang II et les effets systémiques de la molécule. Des résultats additionnels ont été recueillis après la parution de cet article et sont aussi présentés au chapitre 5.

## **CHAPITRE 2**

### **EVALUATION OF TYROSINASE MINIGENE CO-INJECTION AS A MARKER FOR GENETIC MANIPULATIONS IN TRANSGENIC MICE**

**Danielle Méthot, Timothy L. Reudelhuber and David W. Silversides**

**Nucleic Acids Research 1995, 23:4551-4556**

## ABSTRACT

The utility of tyrosinase minigene co-injection was evaluated as a visual marker for the generation and breeding of transgenic mice. In an evaluation of 39 transgenic founder animals and 44 transgenic lines, five phenotypic patterns of pigmentation were consistently observed, including albino, dark, light, mottled, and himalayan. In these studies, co-injection of the tyrosinase minigene along with a transgene of interest (TOI) resulted in genomic integration of the two transgenes in 95% of the  $F_0$  generation. Co-segregation of transgenes occurred in 94% of doubly transgenic mice in the  $F_1$  generation without dissociation in subsequent generations. All pigmented phenotypes proved useful for distinguishing homozygous from heterozygous  $F_2$  animals via backcross trials, while light, mottled and himalayan phenotypes proved useful in visually discriminating between homozygous and heterozygous  $F_2$  animals. In addition, light, mottled and himalayan phenotypes proved useful in determining segregation patterns of transgenes in the progeny of crosses between separate transgenic lines. Moreover there appears to be a correlation between intensity of pigmentation and degree of expression of the co-injected TOI. These studies confirm that tyrosinase co-injection is a useful adjunct in transgenic mouse studies and can serve to reduce routine genetic validation of transgenic lines.

## INTRODUCTION

Pigmentation systems in the mouse are well described and characterized by classical genetic techniques (1). In recent years this characterization has been extended to a molecular level with the cloning of the gene for tyrosinase, the key enzyme in the production of melanin pigment (2,3,4). Genetic defects in the tyrosinase gene, located at the C locus in the mouse, result in albinism (5). Cloned mouse tyrosinase gene sequences have proved useful for gene replacement therapy in that they could restore pigmentation in transgenic mice derived from an albino genetic background (6,7,8). Mouse tyrosinase gene sequences have also been evaluated for their utility in the visual identification of transgenic mice in co-injection strategies (9,10), in order to circumvent the routine analysis of DNA required for the generation and maintenance of transgenic lines. We extend these studies by describing the utility of a tyrosinase minigene sequence co-injection for the visual identification of heterozygote and homozygote  $F_2$  generation animals and for distinguishing the segregation patterns of transgenes in the progeny of crosses between transgenic lines. By means of co-injection strategy, we also address the question of predictability of the expression levels of a transgene using the intensity of pigmentation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Generation of transgenic founder mice and transgenic lines**

Transgenic mice were generated by microinjection of single cell embryos using standard techniques (11). The FVB/N albino mouse line (12) was used as a source of embryos for the manipulations and for subsequent breeding trials. Manipulated embryos were reimplanted into the oviducts of pseudo-pregnant ICR females anesthetized with tribromoethanol (0.015 ml of 2.5% solution per gram body weight) given by intraperitoneal injection (13). The tyrosinase minigene used was previously described (6), and was microinjected at a concentration of 1  $\mu\text{g/ml}$ , in co-solution with one of six different transgenes (hereafter referred to as the transgene of interest or TOI), also at a concentration of 1  $\mu\text{g/ml}$ . Potential founder animals were weaned at 3 weeks of age and samples of tail tissue were taken for DNA analysis using standard protocols (11). All animal manipulations were carried out in accordance to institutional guidelines and were approved by a local ethics committee.

### **Establishing double genomic integration in the $F_0$ generation**

Mice in the  $F_0$  population were scored for tyrosinase minigene genomic integration by pigmentation or, in the case of non-pigmented mice, by PCR analysis for the tyrosinase minigene using a forward primer within exon 1 (5'-



CTTTTCTTACCTCACTTTAGC-3') and a reverse primer within exon 2 (5'-CGTAATAGTGGTCCCTCAGG-3')(3). TOI integration was determined in all F<sub>0</sub> mice by PCR analysis of the appropriate recombinant transgene using oligonucleotide primers to be described elsewhere (Methot et al., in preparation). Genomic amplification was performed in 50 µl total volume consisting of 1 µl genomic DNA (500 ng/µl), 5 µl Taq buffer 10X concentration (BIO/CAN Scientific), 4 µl dNTP (2.5 mM each), 1 µl of forward and reverse oligo primers (100 ng/µl), and 2.5 units of Taq polymerase (BIO/CAN Scientific). Cycling was performed in an Ericomp thermal cycler (San Diego, CA) and included a denaturation step for 3 min at 94°C followed by 30 cycles of annealing for 2 min at 57°C, elongation for 2 min at 72°C, and denaturation for 1 min at 94°C, after which there was a final elongation step for 10 min at 72°C. An aliquot of 20 µl per reaction was size fractionated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel, and visualized by ethidium bromide staining. DNA from non-transgenic animals was amplified as a reaction control. DNA samples were considered positive for a particular transgene if a band of the predicted size in the test sample was present, with no amplification occurring in the control sample. For the tyrosinase transgene, the amplified DNA fragment migrated at 495 bp. Endogenous genomic tyrosinase sequences do not amplify under the PCR conditions chosen.

### Levels of co-expression

Ten transgenic lines were studied to determine if a correlation exists between the level of expression of tyrosinase minigene and TOI. Expression of the tyrosinase minigene was determined by visually classifying the different pigmentation phenotypes. Expression of two different TOIs, human prorenin (hProren or TOI A) and human angiotensinogen (hAogen or TOI B) targeted in the mouse pituitary, were evaluated by RNase protection assay using mouse proopiomelanocortin (mPOMC) as an internal control. The RNA was isolated from single pituitaries by the acid-guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform method (14). To prepare labeled RNA probes, hProren from nucleotides 401 to 650 of the cDNA, hAogen from nucleotides 178 to 377 of the cDNA, and mPOMC from nucleotides 578 to 680 of exon 3, were subcloned in the Bluescript II KS+ plasmid (Stratagene, San Diego, CA). RNase protection assays were carried out with the Promega Riboprobe<sup>®</sup> Gemini System (Promega Corp., Madison, WI) according to the manufacturer's protocol. Unquantitated total RNA from each single pituitary was hybridized with  $5 \times 10^3$  CPM of <sup>32</sup>P-labeled RNA probes of either hProren or hAogen with  $5 \times 10^3$  CPM of <sup>32</sup>P-labeled RNA probes of mPOMC overnight at 45°C in hybridization buffer containing 80% formamide. Yeast RNA (5 µg) and RNA from non-transgenic mouse pituitaries (unquantitated) were hybridized in the same conditions as negative controls and RNA products from *in vitro* transcription of hProren and hAogen were also hybridized in the same conditions as positive controls. Protected fragments after RNase digestion

were separated on a 6% polyacrylamide-7 M urea denaturing gel by electrophoresis and then were exposed to photographic films (Reflection™, DuPont) for 5 days at -80°C using intensifying screens.

## RESULTS

### Pigmentation phenotypes

In the 39 transgenic founder animals and 44 transgenic lines analyzed, five discernible pigmentation phenotypes were observed in the F<sub>0</sub> and subsequent generations. These could be reproducibly classified as albino, dark, light, mottled and himalayan (Fig. 1). Dark pigmentation proved to be the most frequent phenotype observed, accounting for 32% of tyrosinase transgenic mice, while mottled was the least frequent phenotype observed, accounting for 9% of tyrosinase transgenic mice (Table 1A). An expressing (i.e. pigmented) phenotype was observed in 82% of tyrosinase transgenic lines, while a non-expressing (i.e. albino) phenotype was observed in 18% of lines.

The pigmented phenotypes can be classed as differing both quantitatively and qualitatively. Quantitatively, a range of pigmentation was seen which varied in intensity from albino (transgenic for tyrosinase but no detectable expression), to light (light brown evenly distributed pigmentation, the dorsal aspect usually being slightly



**albino**

**dark**

**light**

**mottled**

**himalayan**

**Figure 1.** Pigmentation phenotypes observed in F<sub>2</sub> transgenic mice. All mice displayed are positive for the injected tyrosinase minigene as determined by PCR analysis.

**Table 1A.** Occurrence of pigmented phenotypes in transgenic mice using tyrosinase minigene co-injection

Tyrosinase transgenic phenotypes	No. of lines with a given phenotype or genotype/total no. of lines analyzed
Albino	8/44 (18%)
Dark	14/44 (32%)
Light	12/44 (27%)
Himalayan	6/44 (14%)
Mottled	4/44 (9%)

In total, 39 founder animals and 44 lines are considered.

Numbers in brackets represent percentage of tyrosinase positive lines showing a given phenotype or genotype.

darker than the ventral aspect of the body), to dark (dark gray evenly distributed pigmentation). Qualitatively, pigmentation patterns included even distribution, showing dark gray to light brown coloration, as mentioned; mottled distribution, showing patchy or variegated distribution of pigmentation similar to the chinchilla (*c<sup>ch</sup>*) phenotype (11) and as described previously in transgenic studies (7,9,15); and himalayan distribution, showing darkly pigmented ears and tail with lightly pigmented body. The mottled class could further be subdivided into true mottled and double integration phenotypes (6), depending on the phenotype of the  $F_1$  progeny. Mottled and himalayan phenotypes also displayed differences in pigmentation intensities when comparisons between lines were made; however, within a given line and for a single integration site, the pigmentation pattern remained constant from one generation to the next. Also, although the intensity of pigmentation within a mottled line was constant, the exact pattern of the mottled phenotype was not the same from one animal to another within a line. It is noteworthy that after analysis of 44 separate transgenic lines, no pigmentation patterns in addition to the five described here were observed

### **Establishing co-integration, co-segregation patterns and $F_2$ generation mice**

At six to eight weeks of age, founder mice which were shown to be transgenic for the TOI by DNA analysis or for the tyrosinase minigene by pigmentation were mated with non-transgenic FVB/N animals to generate  $F_1$  mice and transgenic lines. Integration of both the tyrosinase and TOI transgenes in  $F_0$  mice was most commonly

seen, with single integration of tyrosinase occurring only 5% of the time (see Table 1B). Double sites of integration (as evidence by segregation of different pigmentation patterns in the  $F_1$  generation) were seen but were not common, accounting for 13% of founder animals; when this happened, each pattern of pigmentation was subsequently considered to represent a separate transgenic line.

To establish the co-integration of the two microinjected transgenes, their segregation patterns in the  $F_1$  generation were studied. Pigmented  $F_1$  animals from each transgenic line as well as albino littermates were analyzed via PCR for the presence (or absence) of the TOI. Co-integration at a single site was assumed to have occurred if the pigmented animals tested positive for the TOI, and the albino animals tested negative for the TOI. Of a total of 33 lines analyzed, 31 (i.e. 94%) showed co-segregation of pigmentation and TOI in the  $F_1$  generation. In all crosses subsequent to the  $F_1$  generation (>100) where co-segregation was established, we have seen no dissociation of the pigmentation and the TOI.

$F_1$  male and female pigmented, TOI positive transgenic mice were mated to produce  $F_2$  generation mice. To determine whether mice of the  $F_2$  generation were heterozygous or homozygous for the tyrosinase minigene, these mice were scored visually for degree of pigmentation, and tested genetically by performing a backcross breeding to non-transgenic albino FVB/N mice. As can be seen in Figure 2A-C, those mice with the heaviest pigmentation in the  $F_2$  generation from crosses within either the light, himalayan or mottled phenotypes are homozygous for the

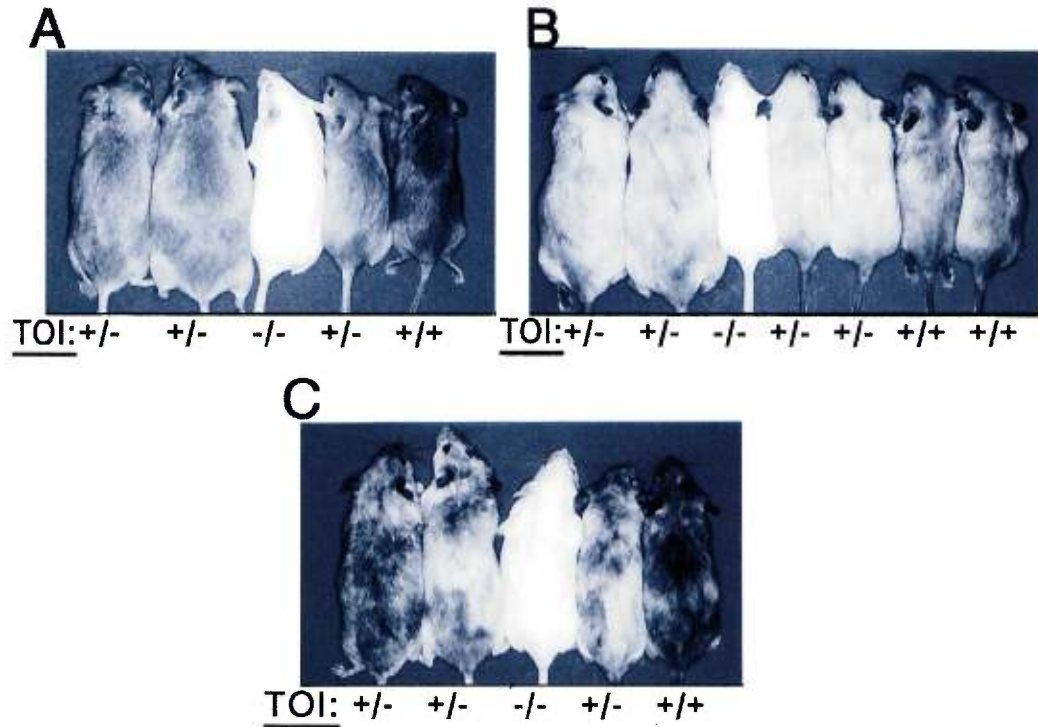
**Table 1B.** Integration patterns observed in transgenic mouse lines generated by co-injection of tyrosinase and a transgene of interest (TOI)

Integration patterns of transgenes	No. of lines with a given phenotype or genotype/total no. of lines analyzed
Double co-integration	5/39 (13%)
Single integration tyrosinase	2/44 (5%)
Co-segregation tyrosinase and TOI transgenes in F <sub>1</sub>	31/33 (94%)

Double co-integration refers to multiple chromosomal loci for both the tyrosinase and TOI transgenes.

Numbers in brackets represent percentage of tyrosinase positive lines showing a given phenotype or genotype.



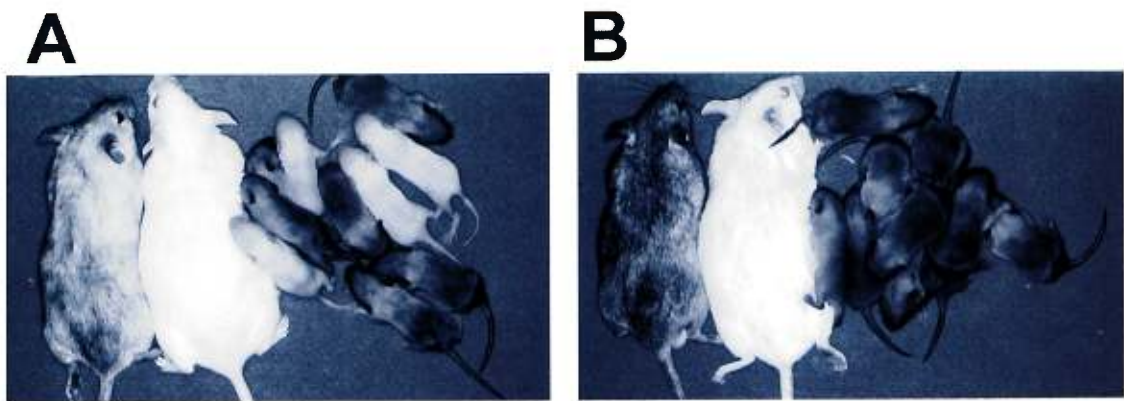


**Figure 2.** Using pigmentation as a marker of TOI homozygosity. Mice co-injected with the tyrosinase minigene and a transgene of interest (TOI) were inbred to the F<sub>2</sub> generation and scored for being negative (-/-), heterozygous (+/-) or homozygous (+/+) for the TOI using DNA dot blots of tail DNA. Results demonstrate a good correlation between pigmentation intensity and TOI content with inbreeding of light (A), himalayan (B) and light mottled (C) phenotypes. The breeding pair is at the left of the panel, with the male at the extreme left.

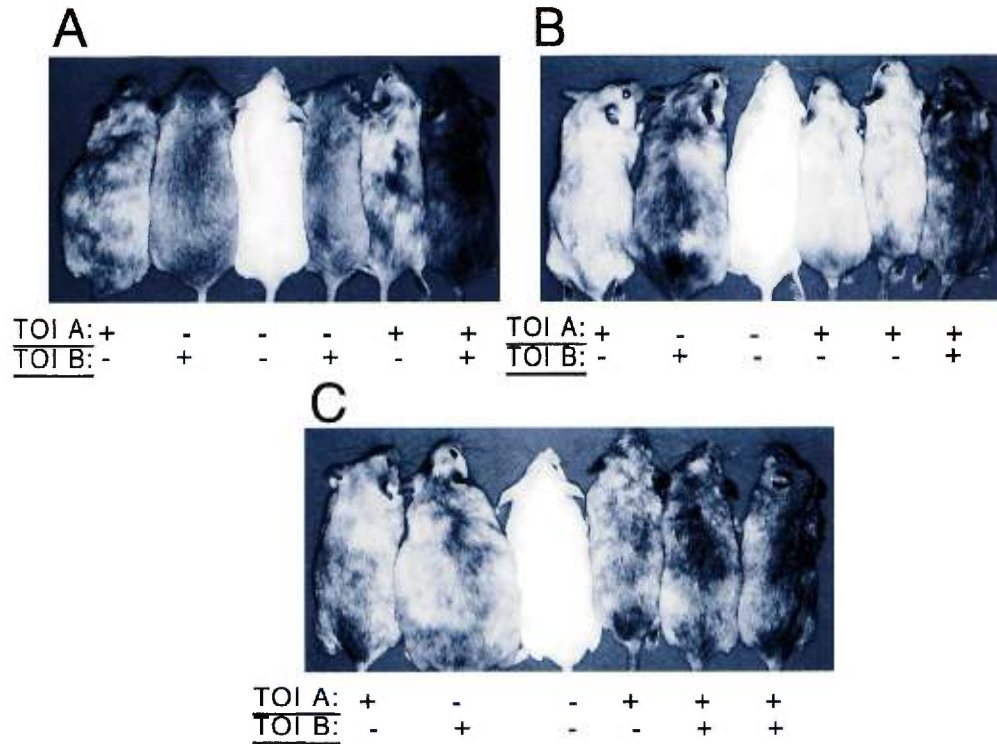
tyrosinase minigene. Analysis of 23 F<sub>2</sub> mice for TOI gene copy number by dot blot analysis confirmed that the most heavily pigmented mice in these crosses were also homozygous for the TOI (data not shown). Intensity of pigmentation was not a reliable indicator of homozygosity, however, in lines displaying the dark pigmentation phenotype (data not shown). Nevertheless, backcross of all of the expressing pigmentation patterns can be used as a reliable visual indicator of homozygosity (Fig. 3A and B).

### **Crosses between transgenic lines**

Crosses between transgenic lines were performed to evaluate the utility of tyrosinase as a visual marker for double TOI transgenics. Animals in the F<sub>1</sub> generation which had been demonstrated to be transgenic for both the tyrosinase and one of the TOI transgenes were crossed and the resulting progeny were scored for pigmentation intensity and presence of the differing TOIs. Figure 4 shows the pigmentation patterns of the parents as well as offspring of crosses between light by mottled pigmented lines (Fig. 4A), himalayan by mottled pigmented lines (Fig. 4B) and mottled (light) by mottled (light) pigmented lines (Fig. 4C). Results demonstrate that the segregation of the various TOIs correlates directly with the type and intensity of pigmentation seen in the offspring: i.e., pigmentation resembling either of the parents contained the appropriate parental TOI, dark mice contained both TOIs, and albino mice contained neither TOI. As with the prediction of homozygosity, in crosses involving either two lines with dark pigmentation patterns or one dark and one light



**Figure 3.** Using pigmentation as a marker for homozygosity in backcrosses.  $F_2$  mice were crossed with non-transgenic FVB/N and offspring were scored for pigmentation. Heterozygosity (**A**) and homozygosity (**B**) were easily distinguished in tyrosinase-expressing phenotypes regardless of the intensity of pigmentation of the  $F_2$  animal.



**Figure 4.** Pigmentation as a marker for double TOI integration. F<sub>1</sub> mice, transgenic for the tyrosinase minigene and a given TOI, were crossed and the offspring were scored for absence (-) or presence (+) of the respective parental TOIs by PCR analysis. There was good correlation between pigmentation and TOI content when crossing lightly pigmented phenotypes such as mottled with light (A), himalayan with mottled (B) and light mottled with light mottled (C). The breeding pair is at the left of the panel, with the male at the extreme left.

pigmentation pattern, it was not possible to predict double TOI transgenic mice.

### **Levels of co-expression**

Correlation between the level of expression of the tyrosinase minigene and the TOI was studied in 10 transgenic lines. Table 2 shows the relative pigmentation intensity compared to the relative level of expression of two different TOIs as determined by RNase protection assay. Overall, there was a qualitative correlation between the appearance of pigmentation and TOI expression: three tyrosinase minigene non-expressing (i.e. albino) lines did not express the TOI, while 7 tyrosinase minigene expressing (i.e. dark, light, mottled, and himalayan) lines expressed the co-injected TOI at variable levels. Furthermore, for TOI A, there appeared to be a quantitative correlation between the degree of pigmentation, as determined arbitrarily by comparison between lines, and the level of expression of TOI A, as determined by RNase protection assays (see Table 2A). However, this correlation did not hold for TOI B, where TOI B expression was highest for the lesser pigmented of the two mouse lines tested (Table 2B). In total, for 9 of 10 transgenic lines tested, there appeared to be a general correlation between intensity of pigmentation and TOI expression.

**Table 2.** Relative expression of the tyrosinase minigene and two different (TOI)s

Pigmentation phenotype	Relative intensity of pigmentation	Relative level of TOI A expression
<b>A. Comparison of pigmentation and TOI A expression.</b>		
Dark	+++	++++
Himalayan	++	+++
Mottled	++	++
Himalayan	+	+
Light	+	+/-
Albino	-	-
Albino	-	-
<b>B. Comparison of pigmentation and TOI B expression.</b>		
Mottled	++	+++
Dark	+++	+
Albino	-	-

Expression of the tyrosinase minigene is divided in two categories; qualitative including the pigmentation phenotype (i.e. albino, dark, light, mottled, and himalayan) and quantitative (as displayed by + and - signs) to define the relative pigmentation intensity of the different lines. Level of expression of the TOIs, quantitated by RNase protection assay, is displayed in the right-hand column.

## DISCUSSION

The use of tyrosinase genes in an albino genetic background in transgenic mice has been proposed as a useful technique for screening for transgene integration and segregation (9,10). We have now extended these studies to document the utility of the tyrosinase marker gene in screening for homozygous mice in an F<sub>2</sub> generation and in screening for doubly transgenic animals in crosses made between independent transgenic lines. We have also tested whether the intensity of pigmentation in transgenic animals could serve as an indication of the level of expression of the co-injected TOI.

Several patterns of phenotypic expression using tyrosinase minigenes in transgenic mice have been previously described (6,9,15,16). In general these observations were made on small numbers of transgenic lines, and it was not clear as to the reproducibility or frequency of these phenotypes. In analyzing 39 founder animals and the resulting 44 transgenic lines using a tyrosinase transgene we have observed 5 discernible and repeating pigmentation phenotypes: albino, dark, light, mottled and himalayan. An important conclusion to be derived from this work is that only a limited repertoire of pigmented phenotypes is generated by tyrosinase gene expression in these animals and that these arise with a fairly predictable frequency.

One critical question in these studies is whether the tyrosinase minigene can serve as a reliable marker for the integration and segregation of the TOI in transgenic mice.

Consistent with previous reports (9,10), we have found high levels of co-integration of the tyrosinase and TOI transgenes, although in 5% of founder animals only one transgene was present and in 13% of the founder animals there were multiple integration sites for either or both of the transgenes. Our analysis of co-segregation suggests that in the  $F_1$  generation, the co-segregation of the tyrosinase and TOI transgenes is highly favored but not absolute. For these reasons it remains important to verify segregation of the TOI with pigmentation in the  $F_1$  generation.

We compared direct visual identification of heterozygous versus homozygous animals via pigmentation markers with genetic backcross analysis and dot blot DNA hybridization methods. Visual identification of the heterozygote or homozygote condition for transgenes proved generally useful for light, himalayan and mottled phenotypes, which showed a quantitatively darker phenotype for the homozygous animals when compared to the heterozygous animals. This was only evident after appearance of hair and generally required heterozygous littermates for comparison. Direct visual identification of heterozygosity versus homozygosity was not useful for dark or albino phenotypes. In comparison, the utility of pigmentation was demonstrated for all expressing pigmented phenotypes for the identification of homozygous versus heterozygous  $F_2$  transgenic animals via backcross analysis. Thus, tyrosinase pigmentation is both reliable and generally useful as an alternative to DNA analysis in scoring homozygosity in transgenic mice.



The use of pigmentation as a marker proved particularly useful in identifying transgenic segregation patterns resulting from crosses between two independent transgenic lines. In crosses between lines with light, himalayan or mottled phenotypes, the transgenic genotype of the resulting offspring, including double integration transgenic animals, could be predicted by the pigmentation phenotype, where the double integration site transgenic animals were more darkly pigmented than either the parental lines or their single integration site siblings. In crosses between a dark line and a more lightly pigmented line, segregation of the light pigmentation conferring transgene was possible, but integration sites producing a dark phenotype could not be distinguished visually from double integration sites.

One rather surprising finding of the current study was that the intensity of pigmentation served as a fairly reliable indicator of the level of expression of the co-injected TOI. As the TOIs used in this study were under the control of a pituitary-specific promoter (growth hormone, data not shown) and expression of the tyrosinase minigene is in melanocytes, the simplest explanation for this finding is that the transgenes have inserted in chromatin domains that are either constitutively "open" (in the case of pigmented, TOI-expressing animals) or permanently "closed" (in the case of albino, TOI-non-expressing animals) in both of the appropriate cells types. These results suggest that albino mice can be routinely excluded from further analysis in transgenic colonies derived by this method, whether from lack of transgene integration or expression. The additional limited correlation between the intensity of pigmentation and the degree of TOI expression seen in most of the pigmented animals

suggests that pigmentation might be used as a preliminary screen for mice with high expression levels, particularly when large numbers of animals are developed and used in the F<sub>0</sub> generation for studies. We do not presently know whether the same finding would apply to all TOIs although Overbeek et al. (9) have reported the absence of expression of a TOI engineered for kidney expression in an albino mouse positive for tyrosinase minigene integration. In conclusion, while co-injection with visible marker genes such as tyrosinase in transgenic mouse studies will not eliminate the need for DNA analysis to establish the presence of the TOI, under the proper conditions it can significantly reduce the need for routine DNA analysis in established transgenic lines and may be useful for estimating relative levels of transgene expression.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank Diana L. Raiwet for technical assistance. This work was supported by grants from NSERC Canada (DWS) and MRC Canada (TLR). DM is the recipient of a MRC Canada fellowship and TLR is the recipient of the Merck-Frosst Chair in clinical and molecular pharmacology.

**REFERENCES**

1. Silver, W.K. (1979) *The Coat Colors of Mice. A Model for Mammalian Gene Action and Interaction.* Springer Verlag, New York.
2. Yamamoto, H., Takeuchi, S., Kudo, T., Makino, K., Nakata, A., Shinoda, T. and Takeuchi, T. (1987) *Jpn. J. Genet.*, **62**, 271-274.
3. Kwon, B.S., Wakeuchi, S., Kudo, T., Makino, K., Nakata, A., Shinoda, T. and Takeuchi, T. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **153**, 1301-1309.
4. Müller, G., Ruppert, S., Schmid, E. and Schütz, G. (1988) *EMBO J.*, **7**, 2723-2730.
5. Kwan, B.S., Haq, A.K., Pomerantz, S.H. and Halaban, R. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7473-7477.
6. Yokoyama, T., Silversides, D.W., Waymire, K.G., Kwon, B.S., Takeuchi, T. and Overbeek, P.A. (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7293-8.
7. Beermann, F., Ruppert, S., Hummler, E., Bosch, F.X., Müller, G., Rüther, U. and Schütz, G. (1990) *EMBO J.*, **9**, 2819-26.

8. Tanaka, S., Yamamoto, H., Takeuchi, S. and Takeuchi, T. (1990) *Development*, **108**, 223-7.
9. Overbeek, P.A., Aguilar-Cordova, E., Hanten, G., Schaffner, D.L., Patel, P., Lebovitz, R.M. and Lieberman, MW (1991) *Transgenic Res.*, **1**, 31-37.
10. Beermann, F., Ruppert, S., Hummler, E. and, Schütz, G. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 958.
11. Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E. (1986) *Manipulating the mouse embryo*. New York, USA; Cold Spring Harbor Laboratory.
12. Taketo, M., Schroeder, A.C., Bobraaten, L.E., Gunning, K.B., Hanten, G., Fox, R.R., Roderick, T.H., Stewart, C.L., Lilly, F., Hansen, C.T. and Overbeek, P.A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2065-8.
13. Papaioannou, V.E. and Fox, J.G. (1993) *Lab. Anim. Sci.*, **43(2)**, 189-192.
14. Chomeczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
15. Mintz, B. and Bradl, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **88**, 9643-9647.

16. Tanaka, S. and Takeuchi, T. (1992) *Pig. Cell Res.* 5, 300-303.

**CHAPITRE 3**

**HUMAN PRORENIN EXHIBITS ENZYMATIC ACTIVITY IN TISSUES OF  
TRANSGENIC MICE**

**Danielle Méthot, David W. Silversides and Timothy L. Reudelhuber**

**Soumis**

**ABSTRACT**

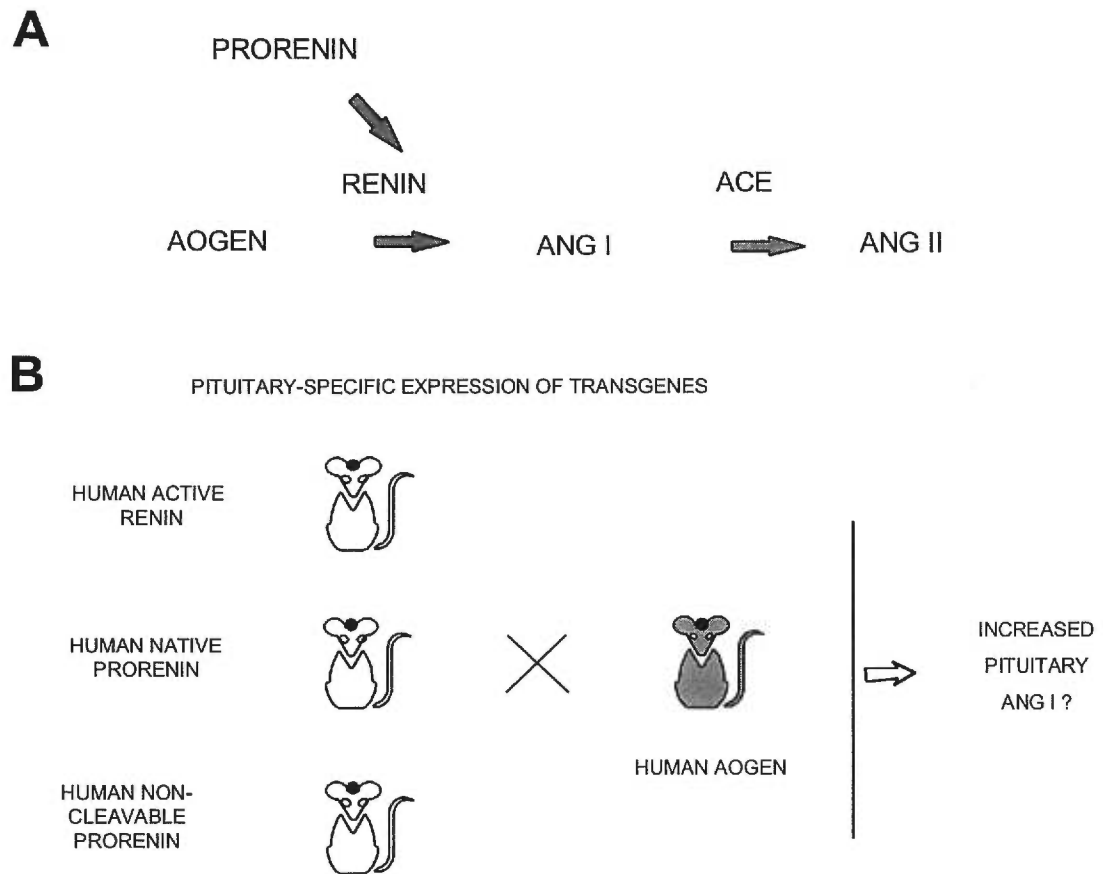
Angiotensin II, the product of the renin-angiotensin system, is a vasoactive peptide involved in blood pressure regulation and fluid balance as well as numerous cardiovascular pathologies. In the circulation, proteolytically activated renin secreted by the kidney catalyzes the rate limiting step in the production of angiotensin peptides. The finding that certain non-renal tissues also express the components of the renin-angiotensin system has led to the suggestion that they might produce angiotensin peptides locally which could impact on local physiological or pathophysiological processes. However, the activity of these so-called tissue renin-angiotensin systems has remained a matter of debate, largely because tissues other than the kidney only secrete the precursor of renin, prorenin, which is considered to be enzymatically inactive. In the present study, we show that mice expressing both human angiotensinogen (the renin substrate) and human prorenin in the pituitary gland are capable of generating angiotensin I (the product of the enzymatic reaction) within the tissue, in the absence of cleavage of the prorenin prosegment. This finding constitutes the first demonstration that human prorenin can be activated within tissues by non-proteolytic means, where it could contribute to the activity of a localized renin-angiotensin system.

## INTRODUCTION

Many proteases are first synthesized as precursors containing a prosegment that serves not only as a folding catalyst or scaffold for the nascent protein, but also as an endogenous inhibitor to restrain the proteolytic activity of the protein until it has reached its target destination (1). The aspartyl protease renin is synthesized as a proenzyme precursor (prorenin), and the renin present in the circulation is derived by the proteolytic removal of a 43 amino acid N-terminal prosegment exclusively in the kidney. Renin plays a key role in the regulation of blood pressure and in numerous cardiovascular pathologies, such as hypertension, cardiac hypertrophy as well as renal defects (2,3), through the cleavage of angiotensinogen into angiotensin I (Ang I), the rate-limiting step in the renin-angiotensin system (RAS; Fig. 1A).

Prorenin is also present in the circulation of mammals at levels that often largely exceed the concentration of renin (4,5). This prorenin is secreted not only from the kidney, but from numerous other tissues including adrenal and pituitary glands, brain, eyes, ovaries, testes, uterus and placenta. Moreover these tissues express the other components of the RAS (6-10) raising the possibility that local RAS may exist that display activity only within tissues. However, these non-renal tissues do not secrete active renin since removal of the kidneys causes active renin to disappear from the circulation while prorenin remains detectable even years later (11). It is unlikely that activation of prorenin occurs once it is secreted into the circulation since injection of monkeys with large amounts of recombinant human prorenin does not lead to any



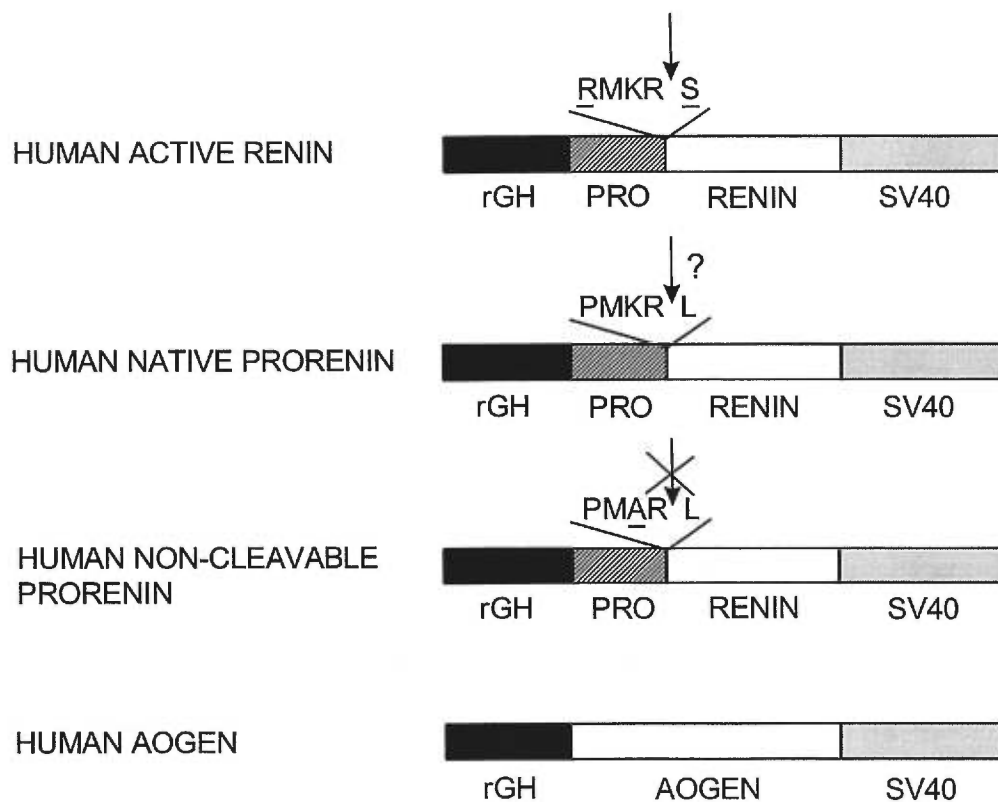


**Figure 1. (A)** Schematic representation of the renin-angiotensin system. AOPEN, angiotensinogen; ANG I, angiotensin I; ACE, angiotensin-converting enzyme; ANG II, angiotensin II. **(B)** Schematic representation of the approach used to test for enzymatic activity of prorenin *in vivo*. Double transgenic mice expressing human angiotensinogen (AOPEN, the renin substrate) and either human active renin, human native prorenin, or human non-cleavable prorenin in the pituitary were generated and the mice were assayed for increased pituitary content of angiotensin I (ANG I).

significant increase in circulating renin activity, blood pressure or plasma angiotensin II (Ang II) (12). In contrast, transgenic rats engineered to secrete prorenin from the liver show tissue pathologies (renal and cardiac) in the absence of increases in circulating active renin (13). Taken together, these results raise the possibility that prorenin could be activated locally within tissues, where conditions may be different than in the circulation, and contribute to tissue RAS activity and cardiovascular pathologies. To investigate this possibility we generated double transgenic mice expressing human angiotensinogen (the renin substrate) and either human active renin, human native prorenin, or human non-cleavable prorenin exclusively in the pituitary gland and measured pituitary Ang I content as an indicator of renin enzymatic activity (Fig. 1B).

## **MATERIALS AND METHODS**

**Plasmid Constructions and Generation of Transgenic Mice.** The human prorenin (14) and angiotensinogen (15) cDNAs are expressed under the transcriptional control of a 320 bp fragment of rat growth hormone promoter (16). An intron and polyadenylation signal for the transcribed RNA are provided by a portion of the SV40 Large T antigen gene (Fig. 2). Engineering of human active renin was achieved by modifying the native prorenin cleavage site (PMKRL) to RMKRS, so that it is cut by furin, a ubiquitous Golgi-anchored convertase, resulting in the constitutive secretion of active renin from the cell (17). In the human non-cleavable prorenin the lysine in position 42 of the prosegment (PMKRL) is mutated to alanine



**Figure 2.** Diagram of the transgenes used in this study. Mutations relative to the native prorenin cleavage site are underlined. rGH, rat growth hormone promoter; PRO, human prorenin prosegment; AOPEN, angiotensinogen; SV40, simian virus 40 T antigen splice and polyadenylation signal. Arrow indicates expected and putative cleavage sites for the various prorenins. Drawings not to scale. See text for details.

which prevents cleavage by known proteases (14). The four transgenes were independently co-injected with the tyrosinase minigene into the pronuclei of single cell embryos from FVB/N albino mouse line as previously described (18). Double transgenic mice were generated by mating single transgenic mice expressing one of the human prorenins (either active renin, native prorenin, or non-cleavable prorenin) with single transgenic mice expressing human angiotensinogen. All animal manipulations were carried out in accordance with institutional guidelines and were approved by a local ethics committee.

**Expression of Transgenes.** RNA was isolated from the pituitaries of two male double-transgenic mice by the acid/guanidium/thiocyanate/phenol/chloroform method (19). To prepare labeled RNA probes human prorenin from nucleotides 401 to 650 of the cDNA and human angiotensinogen from nucleotides 178 to 377 of the cDNA were subcloned in the Bluescript II KS+ plasmid (Stratagene, San Diego, CA). RNase protection assays were carried out with the Promega Riboprobe® Gemini System (Promega Corp., Madison, WI) with T3 polymerase according to the manufacturer's protocol. Unquantitated pooled total RNA from two pituitaries was hybridized with  $5 \times 10^3$  c.p.m.  $^{32}\text{P}$ -labeled RNA probes of human prorenin and with  $5 \times 10^3$  c.p.m.  $^{32}\text{P}$ -labeled RNA probes of human angiotensinogen overnight at 45°C in hybridization buffer containing 80% formamide. Yeast RNA (5 µg) and RNA from nontransgenic mouse pituitaries were hybridized under the same conditions as negative controls and RNA products from *in vitro* transcription of human prorenin

and human angiotensinogen were also hybridized under the same conditions as positive controls. Protected fragments after RNase A/T1 digestion were fractionated on a 6% polyacrylamide-7M urea denaturing gel and were then exposed to X-ray film for 5 days at -80°C using intensifying screens. The protected sequences of prorenin and angiotensinogen were 250 and 200 nucleotides respectively.

**Determination of Pituitary Content of Ang I.** Pituitaries surgically excised from 5 male mice were pooled and immediately sonicated in cold 1% TFA solution (pH 1.5), cleared by centrifugation and their peptide content separated by HPLC. The HPLC separation was performed on a C<sub>18</sub> column (Waters Corporation, Milford, MA). Solvent A was 0.1% TFA in water and solvent B was 0.1% TFA in acetonitrile; flow rate was 1 ml/min and 40 fractions were collected using a gradient of 20-40% solvent B over 40 min. Pituitary Ang I content of the eluted fractions was measured by an Ang I radioimmunoassay (DuPont NEN®, Boston, MA) and was detected in the identical fraction as a commercial Ang I standard. The acid extraction used was designed to avoid *in vitro* activation of prorenin, activity of released proteases and degradation of Ang peptides. Ang I recovery using this method was determined to be approximately 70%. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Dunnett post-test.

**Determination of the Form of Human Prorenin.** Pituitaries from 2 male mice were surgically excised, lysed in 450 µl of a buffer containing 10 mM Tris (pH 8.0), 150

mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.1% SDS. The lysates were passed repeatedly through a 25 gauge needle and were immunoprecipitated with a rabbit polyclonal antibody to prorenin and renin. Immunoprecipitated proteins were fractionated by SDS-PAGE 10% polyacrylamide gel electrophoresis and human prorenin/renin were detected by Western blot with a mouse monoclonal antibody specific for human prorenin and renin (a gift from D. Lamarre, Bio-Mega, Quebec, Canada) using a SuperSignal™ Substrate Western Blotting kit (Pierce, Rockford, Illinois).

## RESULTS

We have developed a double transgenic mouse approach to test for the enzymatic activity of human prorenin. In this system, the renin substrate (human angiotensinogen) and its potential protease (either human active renin, human native prorenin, or human non-cleavable prorenin) are expressed in a specific cell type (pituitary somatotrophs) of individual lines of mice. Selected single-transgenic mice were mated and pituitaries were excised from double-transgenic offspring expressing both human angiotensinogen and one of the human prorenins. Tissue content of Ang I (the product of the reaction) was determined by an HPLC-coupled radioimmunoassay (Fig. 1B). Targeting of the transgenes specifically to the somatotrophs of the pituitary gland was achieved by putting them under the transcriptional control of the rat growth hormone promoter (16). Because of the species specific reactivity between renin and angiotensinogen (20), it is possible to

express the two human proteins in the mouse without producing compounding effects from the endogenous mouse RAS components. Measurement of pituitary Ang I in this system is a direct indicator of renin activity within the same tissue since Ang I released into the circulation would be rapidly diluted and converted to Ang II by the ACE present in vascular endothelium (Fig. 1A).

We have studied eight independent lines of animals expressing the three different types of human prorenin transgenes. The level of transgene expression in each line was assessed by determining the abundance of the mRNA transcript in the pituitary by RNase protection assay (Fig. 3). Since all of these lines were crossed with the same human angiotensinogen expressing line, the angiotensinogen mRNA signal was used as an internal reference to compare the level of prorenin mRNA expression in the various lines. Human prorenin and human angiotensinogen mRNA were detectable only within the pituitary (data not shown).

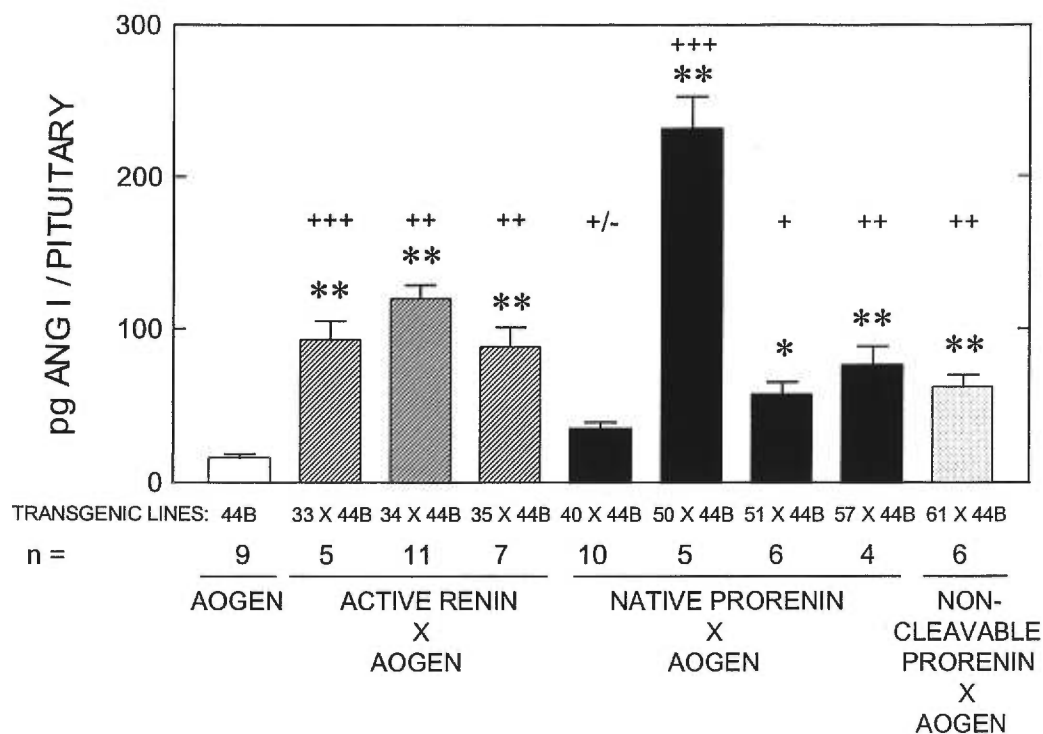
In order to test for the Ang I-generating activity of human active renin in this system, we have engineered a mutation in human prorenin (Fig. 2) which renders the prosegment sensitive to removal by a ubiquitous protease (furin) present in the secretory pathway (21-23). The advantage of this approach for generating active renin is the conservation of the prosegment during the early stages of protein biosynthesis when it is required for efficient protein folding (14) while allowing the removal of the prosegment before secretion in a broad variety of cell types (17, and unpublished results). Mice expressing both human active renin and human





angiotensinogen have marked increases in pituitary Ang I content (Fig. 4, hatched bars) as compared to single transgenic mice expressing only human angiotensinogen (Fig. 4, open bar). Pituitary Ang I was not detectable in any of the transgenic mice expressing only the various human prorenins (not crossed with angiotensinogen expressing mice) or in non-transgenic controls. Repeated assays within the same transgenic lines yielded highly reproducible results and demonstrate that transgenic mice can be used as a sensitive measure for tissue-specific activity of human renin.

We then tested whether prorenin itself could generate Ang I under these conditions by crossing the same line of angiotensinogen-expressing mice with lines of mice expressing human native prorenin. Interestingly, these double transgenic mice also have clearly elevated pituitary Ang I content (Fig. 4, solid bars), suggesting that human prorenin is enzymatically active against its substrate within the mouse pituitary. The relative amounts of Ang I generated in the pituitaries of the various crosses correlated well with the levels of expression of prorenin mRNA in those lines (as represented by +/- signs above the bars in Fig. 4). To test whether prorenin had been rendered active in the pituitary by the proteolytic removal of its prosegment, mice expressing human angiotensinogen were crossed with a line expressing human prorenin in which the native prosegment cleavage site (Lys<sup>42</sup>, Arg<sup>43</sup>) was mutated (Ala<sup>42</sup>, Arg<sup>43</sup>) so as to be non-cleavable (Fig. 2). The finding that Ang I content is also elevated in the pituitary of these mice suggests that prorenin exhibits enzymatic activity with the prosegment still in place (Fig. 4, stippled bar).

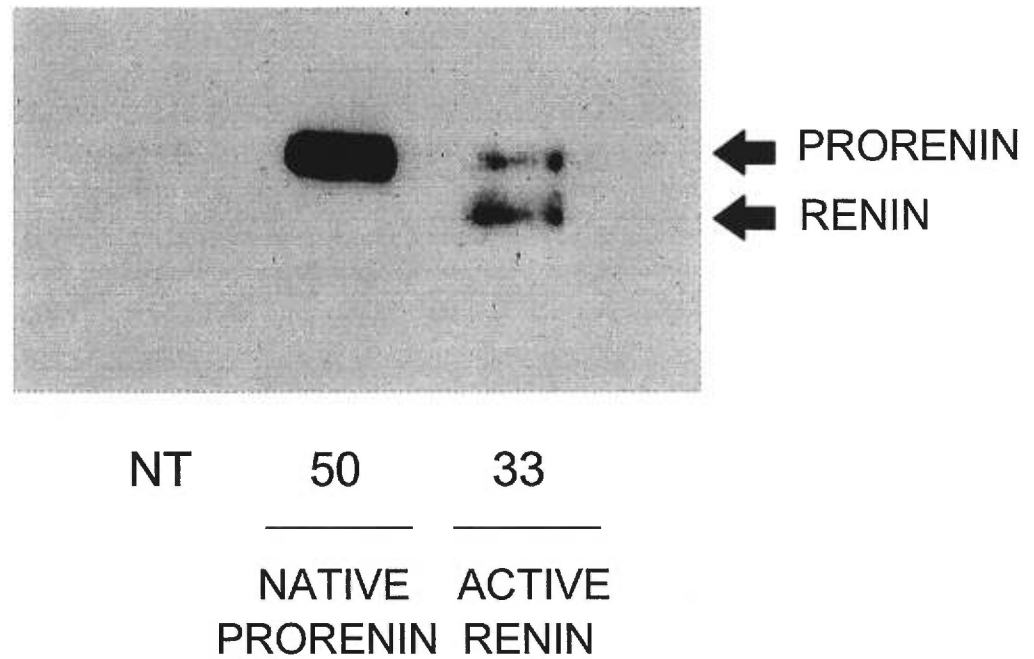


**Figure 4.** Comparison of the pituitary Ang I content of transgenic mice expressing either human angiotensinogen alone (open bar) or in combination with either human active renin (hatched), human native prorenin (solid) or human non-cleavable prorenin (stippled). Ang I content was not detectable from either nontransgenic mice or individual single transgenic mice expressing only the various prorenins. Relative level of prorenin transgene expression in the various lines (derived from Fig. 3) are indicated by +/- signs shown above the bars. Each data point is derived from a pool of 5 pituitaries and results are expressed as the quantity in pg of Ang I/pituitary. Data are means  $\pm$  S.E. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  versus mice expressing only human angiotensinogen by one-way ANOVA with Dunnett post-test. AOPEN, angiotensinogen; ANG I, angiotensin I.

Since Ang I-generating activity is observed with both native prorenin and non-cleavable prorenin, we further investigated the form of the prorenin present in these pituitaries by Western blot analysis of pituitary homogenates (Fig. 5). Analysis of human active renin line (line 33) leads to the detection of two bands corresponding in size to prorenin and proteolytically activated renin. Analysis of pituitaries from mice expressing human native prorenin (line 50) leads to the detection of a single band which migrates with the expected size of full-length prorenin. No band corresponding to proteolytically activated renin could be detected in the pituitaries of native prorenin-expressing mice even at much longer exposures. Thus, the catalytic activity seen with human native prorenin is not due to proteolytic cleavage of the prosegment within the pituitary.

## **DISCUSSION**

The present results demonstrate that human prorenin does not need to be proteolytically cleaved to display enzymatic activity within the pituitary. This finding strongly suggests that prorenin can be activated within tissues by means other than proteolytic cleavage. While the actual mechanism whereby prorenin is activated within mammalian tissues remains to be elucidated, it is highly likely that the prosegment, which is predicted to fold over the substrate-binding cleft of the enzyme (24), is able to unfold in tissues and to transiently expose the active site of the enzyme. The conditions favoring this activation must be particular to tissues since renin-like catalytic activity is not observed in the circulation following infusion of



**Figure 5.** Western blot analysis for pituitary prorenin and renin of nontransgenic control (NT), single transgenic line 50 expressing human native prorenin, and single transgenic line 33 expressing human active renin. The arrows denote the predicted size of prorenin (upper band) and renin (lower band) based on co-electrophoresis of molecular weight markers.

large amounts of prorenin (12). *In vitro*, purified prorenin can be induced to exhibit reversible enzymatic activity by prolonged exposure to acid pH or cold storage (25,26). Thus, one possible explanation for the prorenin activity seen in tissues could be the more acidic pH found in tissue interstitial spaces as compared to the circulation (27). In contrast to the results seen *in vivo*, co-expression of human angiotensinogen and human prorenin in cultured GH<sub>4</sub>C1 (rat somatotroph) cells does not lead to either intracellular or extracellular accumulation of Ang I (data not shown). These results suggest that Ang I is not generated within the cell and support the notion that specific conditions exist within tissue interstitial spaces that permit prorenin to be enzymatically active.

In certain body fluids, such as ovarian follicular fluid and amniotic fluid, prorenin concentrations can reach 100 times the levels found in plasma (28,29). Angiotensin II, the final product of the RAS, is also found in higher concentrations in tissues than in the circulation (30,31), and the current study suggests that it may be produced locally by tissue prorenin. A transient unfolding of the prosegment of prorenin to exhibit enzymatic activity within tissues might also allow modulation by local physiological and pathophysiological conditions. This activation could occur independently from the circulatory RAS and supports the possibility that tissue RAS might function in a locally restricted manner.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Daneau, D. Raiwet, and C. Mercure for expert technical assistance, Drs. P. Corvol and D. Lamarre for reagents and Drs. C.F. Deschepper, G. Thibault and M. Bouvier for helpful comments. This research was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada to TLR. D.M. is the recipient of a Heart and Stroke Foundation of Canada scholarship.

**REFERENCES**

1. Baker, D., A. K. Shiau, and D. A. Agard. 1993. The role of pro regions in protein folding. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:966-970.
2. Griendling, K. K., T. J. Murphy, and R. W. Alexander. 1993. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 87:1816-1828.
3. Ingelfinger, J. R. and V. J. Dzau. 1991. Molecular biology of renal injury: emphasis on the role of the renin-angiotensin system. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2:S9-20.
4. Derkx, F. H. and M. A. Schalekamp. 1988. Human prorenin: pathophysiology and clinical implications. *Clin. Exper. Hypertens. Theory & Practice* 10:1213-1225.
5. Kim, S., M. Hosoi, K. Nakajima, and K. Yamamoto. 1991. Immunological evidence that kidney is primary source of circulating inactive prorenin in rats. *Am. J. Physiol.* 260:E526-E536.
6. Paul, M., J. Wagner, and V. J. Dzau. 1993. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest.* 91:2058-64.

7. Mulrow, P. J. 1989. Adrenal renin: A possible local regulator of aldosterone production. *Yale J. Biol. Med.* 62:503-510.
8. Ganong, W. F., C. F. Deschepper, M. K. Steele, and A. Intebi. 1989. Renin-angiotensin system in the anterior pituitary of the rat. *Am. J. Hypertens.* 2:320-322.
9. Ganong, W. F. 1989. Angiotensin II in the brain and pituitary: contrasting roles in the regulation of adenohipophyseal secretion. *Horm. Res.* 31:24-31.
10. Wagner, J., A. H. Jan Danser, F. H. Derkx, T. V. de Jong, M. Paul, J. J. Mullins, M. A. Schalekamp, and D. Ganten. 1996. Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br. J. Ophthalmol.* 80:159-163.
11. Sealey, J. E. and S. Rubattu. 1989. Prorenin and renin as separate mediators of tissue and circulating systems. *Am. J. Hypertens.* 2:358-366.
12. Lenz, T., J. E. Sealey, T. Maack, G. D. James, R. L. Heinrikson, D. Marion, and J. H. Laragh. 1991. Half-life, hemodynamic, renal, and hormonal effects of prorenin in cynomolgus monkeys. *Am. J. Physiol.* 260:R804-R810.



13. Véniant, M., J. Ménard, P. Bruneval, S. Morley, M. Gonzales, and J. Mullins. 1997. Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *J. Clin. Invest.* 98:1966-1970.
14. Mercure, C., G. Thibault, S. Lussier-Cacan, J. Davignon, E. L. Schiffrin, and T. L. Reudelhuber. 1995. Molecular analysis of human prorenin prosegment variants in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270:16355-16359.
15. Gaillard, I., E. Clauser, and P. Corvol. 1989. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA* 8:87-99.
16. Lira, S. A., E. B. Crenshaw, 3d, C. K. Glass, L. W. Swanson, and M. G. Rosenfeld. 1988. Identification of rat growth hormone genomic sequences targeting pituitary expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4755-4759.
17. Brechler, V., W. N. Chu, J. D. Baxter, G. Thibault, and T. L. Reudelhuber. 1996. A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 271:20636-20640.
18. Methot, D., T. L. Reudelhuber, and D. W. Silversides. 1995. Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 23:4551-4556.

19. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
20. Hatae, T., E. Takimoto, K. Murakami, and A. Fukamizu. 1994. Comparative studies on species-specific reactivity between renin and angiotensinogen. *Mol. Cell. Biochem.* 131:43-47.
21. Schalken, J. A., A. J. Roebroek, P. P. Oomen, S. S. Wagenaar, F. M. Debruyne, H. P. Bloemers, and W. J. Van de Ven. 1987. fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J. Clin. Invest.* 80:1545-1549.
22. Bresnahan, P. A., R. Leduc, L. Thomas, J. Thorner, H. L. Gibson, A. J. Brake, P. J. Barr, and G. Thomas. 1990. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J. Cell Biol.* 111:2851-2859.
23. Hatsuzawa, K., M. Hosaka, T. Nakagawa, M. Nagase, A. Shoda, K. Murakami, and K. Nakayama. 1990. Structure and expression of mouse furin, a yeast Kex2-related protease. Lack of processing of coexpressed prorenin in GH4C1 cells. *J. Biol. Chem.* 265:22075-22078.

24. Hsueh, W. A. and J. D. Baxter. 1991. Human prorenin. *Hypertension* 17:469-479.
25. Derkx, F. H., M. P. Schalekamp, and M. A. Schalekamp. 1987. Two-step prorenin-renin conversion. Isolation of an intermediary form of activated prorenin. *J. Biol. Chem.* 262:2472-2477.
26. Pitarresi, T. M., S. Rubattu, R. Heinrikson, and J. E. Sealey. 1992. Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. *J. Biol. Chem.* 267:11753-11759.
27. Martin, G. R. and R. K. Jain. 1994. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Res.* 54:5670-5674.
28. Do, Y. S., A. Sherrod, R. A. Lobo, R. J. Paulson, T. Shinagawa, S. W. Chen, S. Kjos, and W. A. Hsueh. 1988. Human ovarian theca cells are a source of renin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1957-1961.
29. Itskovitz, J., S. Rubattu, J. Levron, and J. E. Sealey. 1992. Highest concentrations of prorenin and human chorionic gonadotropin in gestational sacs during early human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75:906-910.

30. Deschepper, C. F., D. A. Crumrine, and W. F. Ganong. 1986. Evidence that the gonadotrophs are the likely site of production of angiotensin II in the anterior pituitary of the rat. *Endocrinology* 119:36-43.
  
31. Seikaly, M. G., B. S. Arant, Jr., and F. D. Seney, Jr. 1990. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J. Clin. Invest.* 86:1352-1357.

## **CHAPITRE 4**

### **TISSUE TARGETING OF ANGIOTENSIN PEPTIDES**

**Danielle Méthot, Margot C. LaPointe, Rhian M. Touyz, Xiao-Ping Yang, Oscar  
A. Carretero, Christian F. Deschepper, Ernesto L. Schiffrin, Gaétan Thibault,  
and Timothy L. Reudelhuber**

**The Journal of Biological Chemistry 1997, 272:12994-12999**

**ABSTRACT**

Angiotensin II (Ang II) is an octapeptide generated by the sequential proteolytic action of renin and angiotensin converting enzyme on the glycoprotein angiotensinogen. While numerous mammalian tissues have been shown to express some or all of the components of the renin-angiotensin system (RAS), the function of most of these tissue RAS remains a matter of conjecture. To test for tissue-specific functions of Ang II and as an alternative to co-expressing all the components of RAS, we have engineered a fusion protein that leads to direct Ang II release within specific tissues. The angiotensin peptide is cleaved from the fusion protein within the secretory pathway by the ubiquitous endoprotease furin and is released from the cell by constitutive secretion. Direct injection of an expression vector encoding such a fusion protein into rat cardiac ventricles results in a highly localized expression of atrial natriuretic peptide mRNA (an angiotensin responsive marker of cardiac hypertrophy), demonstrating the utility of this approach for local targeting of mature peptides to tissues in animal models.

## INTRODUCTION

Angiotensin II (Ang II) is the peptide product of the renin-angiotensin system (RAS) and is generated via two sequential proteolytic steps: First, renin, a circulating aspartyl protease, cleaves the decapeptide angiotensin I (Ang I) from the amino terminus of the hepatic glycoprotein angiotensinogen. Angiotensin-converting enzyme (ACE) then removes two amino acids from the carboxy terminus of Ang I to release the vasoactive peptide Ang II. This enzymatic cascade which occurs in the circulation has also been suggested to take place within certain tissues. Brain, kidney, adrenal and pituitary glands, heart, vasculature and reproductive tissues have been shown to express protein and/or mRNA for many of the components of the RAS including angiotensin receptors (1-6). Activity of local or tissue RAS has been implicated in a variety of physiologic pathways and pathophysiologic conditions including sympathetic nerve transmission, pituitary hormone secretion, migration of eggs in the oviduct, renal development, hypertension, end-stage renal disease, cardiac hypertrophy and restenosis following vascular injury (reviewed in Refs. 7-10). However, two findings make it difficult to differentiate between the possibilities that the Ang II mediating these activities is either generated and acts locally, comes from the circulation, or is synthesized locally and acts elsewhere to generate the observed effects: First, in tissues, components of the RAS are often expressed in different cell types or are present in only extremely low levels, making it difficult to be certain that all of the necessary components would encounter each other in biologically relevant concentrations. Second, renin is synthesized as a zymogen which is activated before

secretion from the juxtaglomerular cells of the kidney. Removal of the kidneys results in virtual disappearance of renin from the circulation while its precursor, prorenin, remains (11-14). This finding has raised the question about whether non-renal tissues have the capacity to activate prorenin and thereby carry out the first reaction in the RAS. For these reasons and in spite of much circumstantial evidence, the functions of tissue RAS remain a matter of conjecture.

By using transgenic animals, it is possible to test for the biological effect of tissue expression of the RAS by inducing either loss of function or gain of function mutations. Mice lacking all RAS activity have been generated via homologous recombination by insertional mutagenesis of the angiotensinogen gene (the only known substrate for generation of the angiotensin peptides) (15,16). These mice are hypotensive and exhibit some defects in the development of the kidney, but these experiments shed little light on the normal physiologic functions of tissue RAS. On the other hand, generalized over-expression of components of the RAS in transgenic mice and rats is clearly linked to an increase in blood pressure (17-20). To discriminate between circulatory and local effects of transgene expression it is necessary to target expression of the RAS transgenes to specific tissues. However, this approach is complicated by the fact that all of the RAS components (i.e., angiotensinogen, prorenin, ACE, Ang II receptors, and a prorenin convertase) need to be expressed in the target tissue. In addition, the Ang II generated can elicit biological responses at other sites.



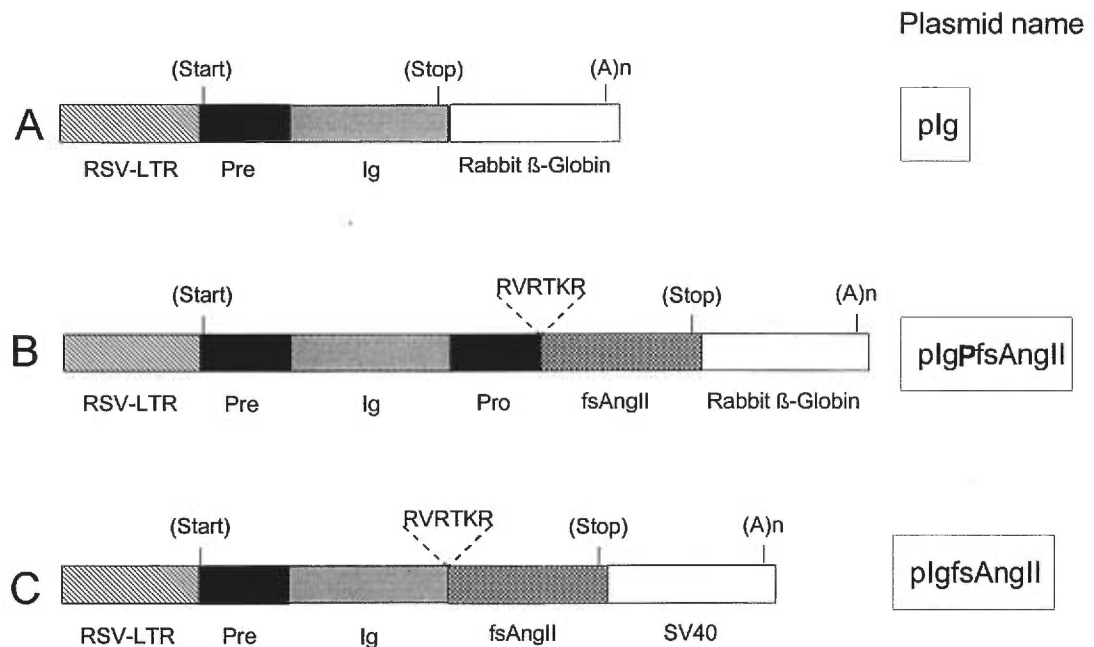
As an alternative to co-expressing RAS components, we have engineered a fusion protein that leads to the direct release of an Ang II peptide within specific tissues. This peptide is a natural variant of Ang II found in the skin of the Australian frog *Crinia georgiana* (fsAngII; (21)) which has been reported to have pressor activity similar to that of mammalian Ang II (22). Its N-terminal alanine residue presents a favorable P1' cleavage site for proteolytic release of fsAngII from the fusion protein by the ubiquitous protease furin (23). In this study, the receptor binding and biological activity of the fsAngII peptide were characterized and experiments were performed to test for the effect of local over-expression of fsAngII *in vivo*. Direct injection of the expression vector into the apex of rat hearts leads to local expression of fsAngII and induction of atrial natriuretic peptide (ANP) expression, a biochemical molecular marker of cardiac hypertrophy in adult cardiac ventricles (24,25). These results demonstrate for the first time the feasibility of using an engineered fusion protein to deliver a peptide with local biological activity in whole animals.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Construction of an expression vector for direct release of Ang II.** Expression vector pIg contains the signal peptide of human prorenin followed by a fragment of the heavy chain constant region of mouse IgG2b. The Ig fragment encodes 221 amino acids from the CH2 and CH3 domains and lacks the BIP binding, hinge and intermolecular disulfide bridge regions (26) while maintaining the protein A binding

site. Construction of this plasmid is described elsewhere (27). This construct is used as a negative control (Fig. 1A).

The expression vector pIgPfsAngII (Fig. 1B) contains the human prorenin signal peptide and Ig fragment from pIg linked to a portion of the human prorenin prosegment followed by a furin consensus cleavage site and the coding sequence of the fsAngII peptide. pIgPfsAngII was constructed as follows: A cDNA fragment encoding the signal peptide of human prorenin followed the Ig fragment was amplified from pIg by polymerase chain reaction (PCR). The sequences of the forward and reverse primers were: 5' CGCCATTTGACCATTAC-3' and 5'-AAGGCCTACCCGGAGACC-3'. A *Stu*I restriction site in the reverse primer is underlined. A portion of the human prorenin cDNA encoding the first 35 amino acids of the prosegment was generated by PCR from the expression vector pRhR1100 (28) using the following primers: Forward, 5'-AAGGCCTCTCCCGACAGAC-3'. Reverse, 5'-GAAGATCTGGGACCAAGCCTG-3'. (*Stu*I and *Bgl*III restriction sites in the amplifying oligonucleotides are underlined). The *Stu*I-*Bgl*III restriction fragment containing the human prorenin prosegment was ligated to oligonucleotides containing a 5' *Bgl*III site, a sequence encoding the furin consensus cleavage site (RVRTKR; (29,30)), the coding sequence for fsAngII (APGDRIYVHPF), a stop codon, and a 3' *Eco*RI site and inserted at the 3' end of the Ig coding sequence. The forward oligonucleotide sequence was: 5'-GAAGATCTCGCGTACGCACTAAACGCGCCCCCGGGGACCGCATCTACGTA



**Figure 1.** Diagram of the expression vectors pIg (A), pIgPfsAngII (B), and pIgfsAngII (C). Start, translational start codon (ATG); Stop, translational stop codon (TGA); (A)<sub>n</sub>, location of polyadenylation signals. RVRTKR is a furin recognition cleavage site; RSV-LTR, Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter/enhancer; Pre, signal peptide of human prorenin; Ig, mouse immunoglobulin heavy chain fragment; Pro, portion of human prorenin prosegment; fsAngII, frog skin angiotensin II; SV40, simian virus 40 T antigen splice and polyadenylation signal.

CACCCCTTTTGAGAATTCC-3'. The entire coding sequence was placed in the expression vector RSV-globin where it is under the transcriptional control of the Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter/enhancer (RSV-LTR). Transcribed RNA is provided with an intron and polyadenylation signal from a portion of the rabbit  $\beta$ -globin gene placed 3' of the fusion protein coding sequence (28).

The expression vector pIgfsAngII (Fig. 1C) is constructed as pIgPfsAngII except that the portion of the human prorenin cDNA encoding the first 35 amino acids of the prosegment is missing and the 3' splice and polyadenylation signal comes from the simian virus 40 T-antigen. All recombinant plasmid construction were verified by DNA sequencing.

**Binding of fsAngII to the Ang II AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors:** To test for binding to the Ang II AT<sub>1</sub> receptor, COS-1 cells were transfected with an expression vector for rat AT<sub>1b</sub>. COS-1 cells were plated in 150 mm petri dishes and grown to confluence in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% (vol/vol.) fetal calf serum and gentamicin at 10  $\mu$ g/ml (GIBCO) in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) at 37°C. The cells were transfected by the DEAE-Dextran method (31) using a rat AT<sub>1b</sub> cDNA ((32); a gift from Dr. Tadashi Inagami) inserted into the mammalian expression vector pCMV5 (a gift from Dr. David Garbers). Cells were collected 48 h after transfection and the membrane fraction was prepared for AT<sub>1</sub> receptor binding assays.

To test for fsAngII binding to the AT<sub>2</sub> receptor, PC12W cells, which naturally express only the AT<sub>2</sub> receptor, were plated in 150 mm petri dishes and grown to confluence in a mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% (vol/vol.) fetal calf serum, 10% heat inactivated horse serum and gentamicin at 10 µg/ml (GIBCO) in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) at 37°C.

Membranes were prepared from transfected COS-1 cells or from confluent cultures of PC12W cells by homogenization and centrifugation (33). Radioligand binding assays to Ang II type 1 (AT<sub>1</sub>; from transfected COS cells) or type 2 (AT<sub>2</sub>; from PC12W cells) receptors were carried out as previously described using <sup>125</sup>I (Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>) Ang II as a ligand (34).

**Biological activity of fsAngII.** For intracellular free calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) measurements, COS-1 cells transfected with the rat AT<sub>1b</sub> receptor were re-plated 24 h after transfection onto laminin coated round glass coverslips (25 mm diameter) in multi-well dishes. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> measurements were performed 24 h after re-plating using the ratiometric fluorescent dye fura-2AM according to previously described methods (35,36). Briefly, cells were washed three times with 2 ml modified Hanks buffered saline solution containing (mmol/l) 137 NaCl, 4.2 NaHCO<sub>3</sub>, 3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.4 KCL, 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.8 MgSO<sub>4</sub>, 10 glucose, 5 Hepes (pH 7.4). The washed cells were loaded with fura-2AM (4 µmol/l) (dissolved in dimethyl

sulphoxide with 0.02% pluronic F-127) and incubated for 25 min at 37°C. The loaded cells were washed three times with the Hanks buffer and allowed to equilibrate at room temperature for 15 min.  $[Ca^{2+}]_i$  was measured by fluorescent digital imaging using the Axiovert 135 inverted microscope and Attofluor Digital fluorescence System (Zeiss, Germany) using double excitatory wavelengths of 343 nm and 380 nm. Video images of fluorescence at 520-nm emission were obtained using an intensified CCD camera system (Zeiss, Germany) with the output digitized to a resolution of 512 x 480 pixels. Fluorescence ratios were obtained by dividing, pixel by pixel, the 343 nm image after background subtraction of the 380 nm image. Both *in vitro* and *in situ* calibrations were performed according to our previously described methods (36,37). Effects of varying concentrations of Ang II and fsAngII ( $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  mol/l) were determined in multiple cells. Cells were exposed to one concentration only and repetitive determinations were not made. The maximum peak ratio recorded was considered as the maximal response of the agonist.

**Cleavage and secretion of the fusion protein in transfected rat pituitary GH<sub>4</sub>C1 cells.** Rat pituitary GH<sub>4</sub>C1 cells were grown in a mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% (vol/vol.) fetal calf serum, 0.1% serXtend (Irvine Scientific, CA), and gentamicin at 10 µg/ml (GIBCO) in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) at 37°C. GH<sub>4</sub>C1 cells, plated at  $8 \times 10^5$  cells per 35-mm dish, were transfected 20 h after plating with lipofectin (GIBCO) in serum-free medium using 20 µg of plasmid DNA per dish. The cells were transfected

with an expression vector for fsAngII (pIgPfsAngII) or its control counterpart pIg (Fig. 1). After 48 h, cells were transferred to 12-well plates at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/well. Twenty four hours later parallel wells of transfected cells were depleted of methionine for 1 h in methionine-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% dialysed fetal calf serum. The cells were then labeled for 30 min with 300  $\mu$ Ci of [ $^{35}$ S]methionine/well, washed with complete medium, and incubated for 2.5 h. Culture supernatants were immunoprecipitated with protein G-agarose (Life Technologies, Inc.). Immunoprecipitated proteins were fractionated by SDS-PAGE and gels were subjected to fluorography.

**Expression of fsAngII in transfected myocytes.** Ventricular myocyte cultures from 4-day-old Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) were prepared as described elsewhere for atrial myocyte cultures (33). Twenty hours before transfection, cardiac myocytes cells were plated at  $1.5 \times 10^6$  per 35-mm Primaria coated dish (Falcon). The cells were grown in complete serum-free medium (CSFM-1, GIBCO) supplemented with 10% (vol/vol.) fetal calf serum and ampicillin-streptomycin-fungizone (GIBCO) at 10  $\mu$ g/ml in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) at 37°C. The cells were transfected with pIgPfsAngII or pIg as a control. For transfection, a DNA-calcium phosphate precipitate (250  $\mu$ l) formed with 10  $\mu$ g of plasmid DNA was added and the cells were incubated at 37°C. After 24 h the medium was changed and the cells incubated an additional 48 h. Supernatants were collected and cells were rinsed twice with PBS and sonicated in 2 ml of ice cold extraction medium (5% formic acid, 15% trifluoroacetic acid, 10% hydrochloric acid,

1% sodium chloride). Lysates were cleared by centrifugation and pellets were retained for protein quantitation by the method of Bradford (38). Ang II content of cell lysates and supernatants from transfected cardiac myocytes was extracted on disposable octadecyl cartridges (Fisher Scientific, PA) and measured by RIA as described elsewhere (39). An antiserum against Ang II (designated CD4) was used. This antiserum displayed 50-60% cross-reactivity to fsAngII (Ala-Pro-Gly-[Ile<sup>3</sup>,Val<sup>5</sup>]-Ang II) purchased from Bachem California and less than 1% cross-reactivity to Ang I (data not shown).

***In vivo* injection of DNA into rat hearts.** This protocol was approved by the Care of Experimental Animals Committee of Henry Ford Hospital and is in accordance with federal guidelines. 250-300 g rats (Sprague-Dawley, Charles River, Kalamazoo, Mich) were anesthetized, intubated and ventilated. Following thoracotomy, the heart was injected with 95 µg of DNA in 100 µl of phosphate-buffered saline as described previously (40). Rats were randomly divided into two groups, one group receiving injection of pIgPfsAngII and the other receiving pIg as a control. These animals were used to generate data on plasma Ang II levels, heart weight to body weight ratios, and blood pressure. The two DNA constructions were also injected into a separate group of rats for Northern blot analysis of injected hearts. Systolic blood pressure of conscious rats was measured by the tail-cuff method. Four to seven determinations were made for each rat. Measurements were made twice prior to DNA injection and



on day 6 post-injection. All other parameters were determined at the time of sacrifice (7 days post-injection).

**Northern blot analysis.** Total RNA was extracted by homogenization of hearts in RNA STAT-60 (Tel-Test, Friendswood, TX). Northern blot analysis for atrial natriuretic peptide (ANP) and GAPDH has been described previously (41). ANP mRNA was quantitated using scanning densitometry of autoradiograms.

## RESULTS

**Receptor binding of fsAngII.** Binding of frog skin Ang II (fsAngII) to the AT<sub>1</sub> Ang II receptor was tested using membrane preparations from transfected COS-1 cells. As shown in Figure 2A, binding of <sup>125</sup>I labeled [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] Ang II was completely displaced with cold Ang II with an apparent K<sub>d</sub> of 0.66 ± 0.25 nM. fsAngII also completely displaced the radiolabel, but the apparent affinity was approximately 43-fold lower than that of Ang II. Losartan, an AT<sub>1</sub>-specific antagonist, completely displaced binding, confirming that all of the receptors in this membrane preparation are of the AT<sub>1</sub> subtype. Using membranes prepared from PC12W cells, we have determined that the fsAngII peptide also bound the AT<sub>2</sub> receptor with an affinity only slightly lower than that of native Ang II (apparent K<sub>d</sub> of fsAngII = 6.18 ± 1.01 nM; apparent K<sub>d</sub> of Ang II = 1.94 ± 0.30 nM) (Fig. 2B). PD123319, an AT<sub>2</sub>-specific

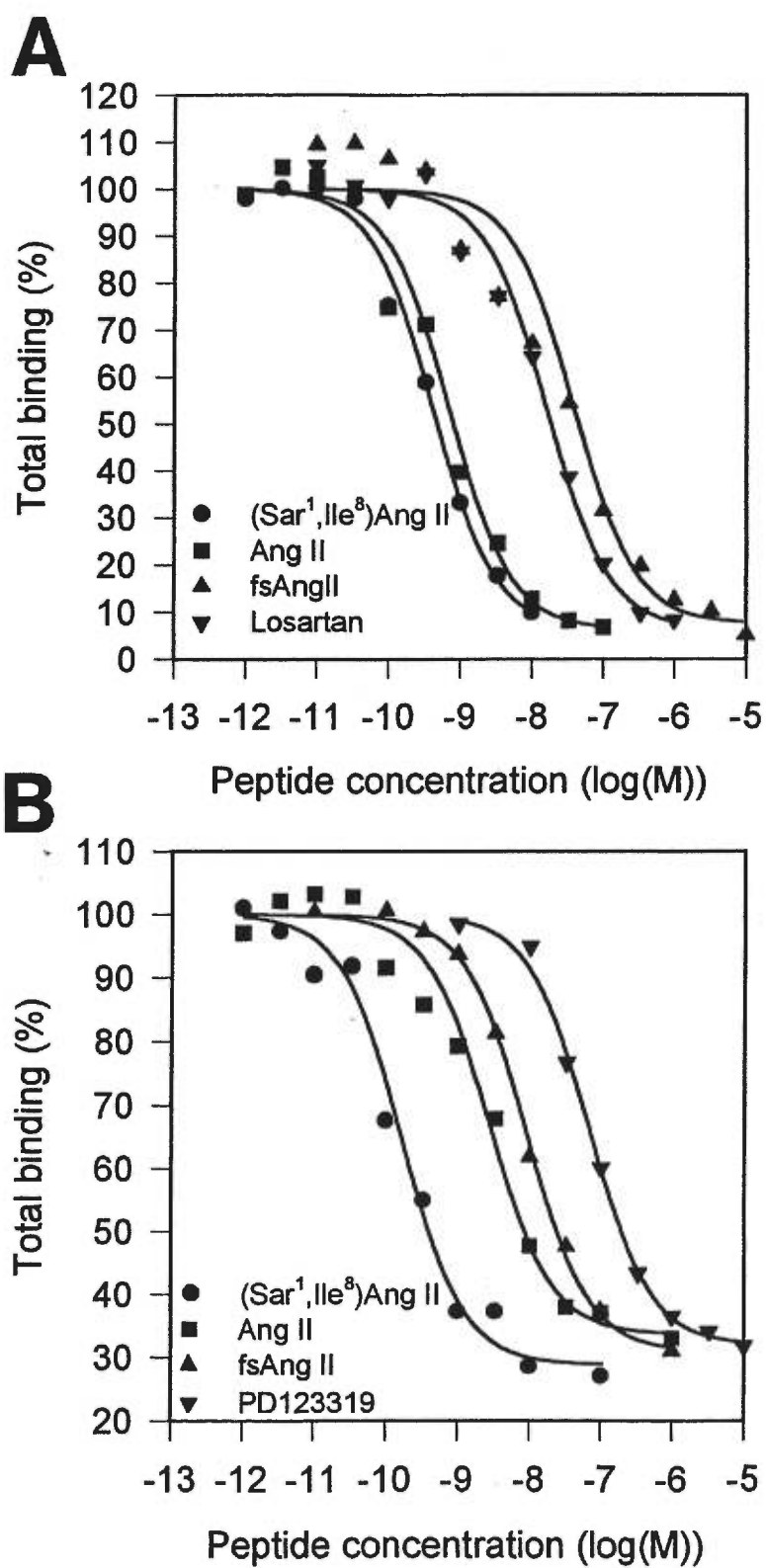


FIGURE 2

**Figure 2. (A)** Binding of fsAngII to membrane preparations of AT<sub>1</sub> receptor-transfected COS-1 cells. Values are the results of 3 independent experiments. Calculated K<sub>d</sub> values are: (Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>) Ang II, 0.33 ± 0.19 nM; Ang II, 0.66 ± 0.25 nM; fsAngII, 28.3 ± 11.0 nM; Losartan, 12.1 ± 8.3 nM. **(B)** Binding of fsAngII to AT<sub>2</sub> receptor in PC12W cell membrane preparations. Values are the results of 3 independent experiments. Calculated K<sub>d</sub> values are: (Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>) Ang II, 0.59 ± 0.40 nM; Ang II, 1.94 ± 0.30 nM; fsAngII, 6.18 ± 1.01 nM; PD123319, 61.5 ± 9.3 nM.

antagonist, completely displaced binding in PC12W membranes, confirming that all of the receptors in this membrane preparation are of the AT<sub>2</sub> subtype. Thus fsAngII binds to both the AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> Ang II receptor subtypes; however, binding to the AT<sub>1</sub> receptor occurs with roughly 40-fold less affinity than native Ang II.

**Biological activity of fsAngII.** Intracellular free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) measurements were conducted to determine the AT<sub>1</sub> receptor-mediated biological response of cells to fsAngII (Fig. 3). Basal  $[Ca^{2+}]_i$  in AT<sub>1</sub>-transfected COS-1 cells was  $76.5 \pm 2$  nmol/l ( $n = 36$  experiments comprising 180 cells). Ang II and fsAngII induced a rapid and acute  $[Ca^{2+}]_i$  response which reached peak levels within 20 s after addition of the agonist. Both peptides increased  $[Ca^{2+}]_i$  in a dose-dependent manner, with  $[Ca^{2+}]_i$  sensitivity to Ang II and fsAngII being similar ( $pD_2$  for Ang II =  $8.7 \pm 0.3$ ;  $pD_2$  for fsAngII =  $8.6 \pm 0.7$ ;  $pD_2 = -\log [EC_{50} (\text{mol/l})]$ ). Ang II at concentrations greater than  $10^{-9}$  mol/l induced significantly larger  $[Ca^{2+}]_i$  responses than corresponding concentrations of fsAngII (Fig. 3A). The time course of  $[Ca^{2+}]_i$  recovery to basal levels following agonist stimulation was significantly prolonged in cells stimulated with fsAngII. Whereas Ang II induced  $[Ca^{2+}]_i$  returned to near basal levels within 300 s after the peak response, fsAngII-induced  $[Ca^{2+}]_i$  levels remained persistently elevated above basal levels 300 s after the peak response (Fig. 3B).

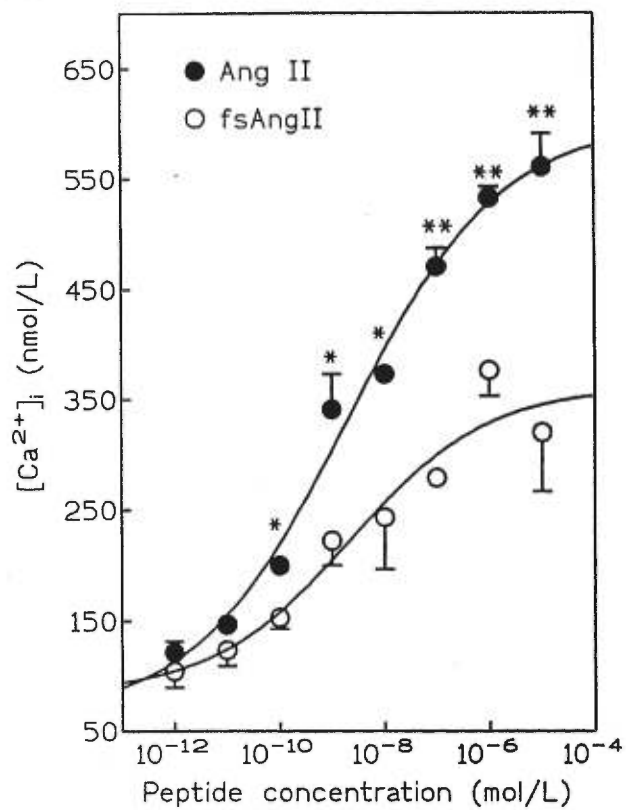
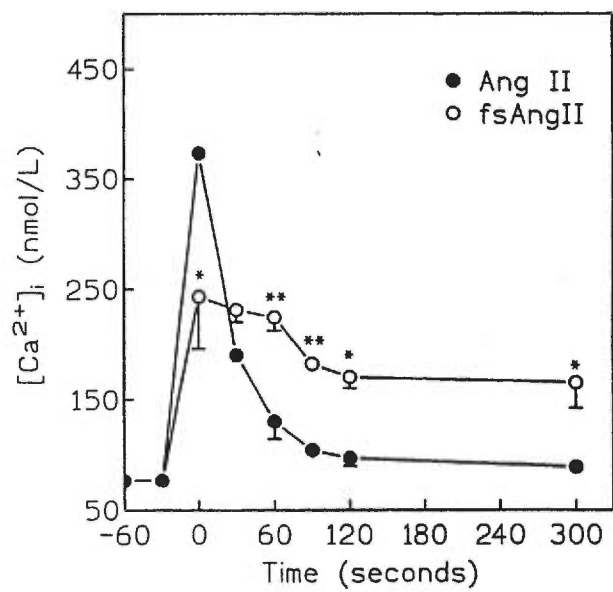
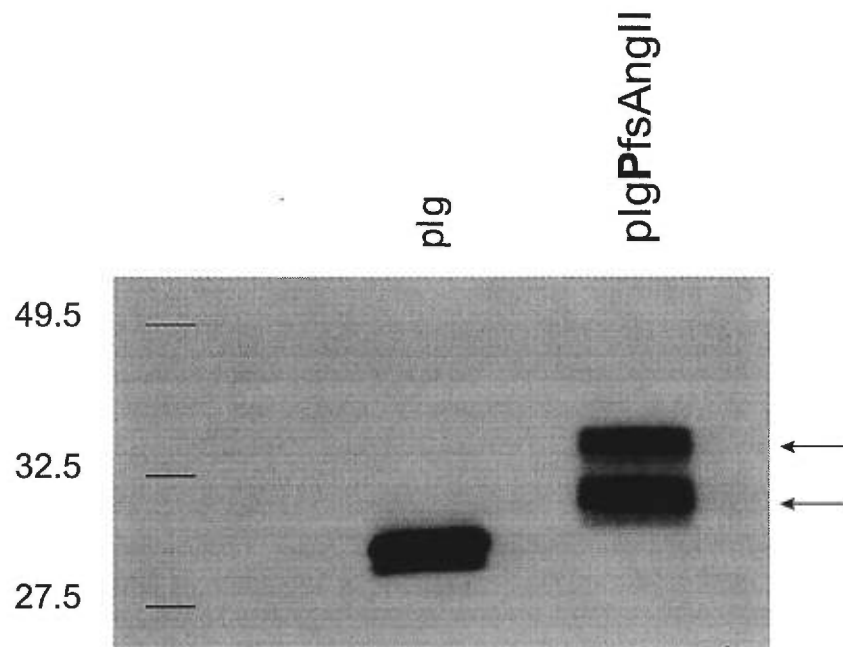
**A****B**

FIGURE 3

**Figure 3.** Biologic activity of fsAngII. Intracellular calcium mobilization in response to Ang II or fsAngII was measured on AT<sub>1</sub> receptor-transfected COS-1 cells. **(A).** Line graphs demonstrate dose-response curves for Ang II and fsAngII. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM of 4-6 experiments with each experimental field comprising 5-10 cells. \*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  versus corresponding fsAngII concentration using Student's t-test. Calculated pD<sub>2</sub> values are: Ang II,  $8.7 \pm 0.3$ ; fsAngII,  $8.6 \pm 0.7$ . **(B).** Line graphs demonstrate the time-course of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> recovery following 10<sup>-8</sup> mol/l agonist-stimulation. The peak response is set at time 0 s and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured at 30 s intervals thereafter. The peptide was added between -20 and -10 s. Values are expressed as means  $\pm$  SEM with each data point being the mean of 3 experiments and each experimental field comprising 5-10 cells. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  versus corresponding fsAngII concentration using Student's t-test.

**Expression of fsAngII in transfected cells.** To achieve direct expression of angiotensin peptides, an fsAngII-encoding peptide was linked to the 3' end of an engineered secretory protein through a consensus cleavage site for furin, an ubiquitous protease (Fig. 1). To test for cell-mediated release and cleavage of the fsAngII fusion protein, GH<sub>4</sub>C1 cells were transfected with pIgfsAngII and its control counterpart, pIg, which lacks the fsAngII coding sequences. Immunoprecipitation of the Ig fragment from cells transfected with either pIg or pIgfsAngII shows that the fusion protein detected in both cases migrated as a single band with pIgfsAngII having a slightly higher molecular weight than the pIg counterpart (data not shown). This result is consistent with a lack of cleavage of the fsAngII peptide from the Ig fragment in this fusion protein. In the pIgfsPAngII construct, the 43 amino acid human prorenin prosegment was inserted between the Ig fragment and the furin cleavage site to act as a molecular "spacer" which would favor accessibility of the furin cleavage site. Immunoprecipitation of the Ig fragment from GH<sub>4</sub>C1 cells transfected with pIgPfsAngII shows two bands of similar intensity (Fig. 4, arrows). Deduced molecular weights suggest that the higher band represents the intact fusion protein and the lower band the Ig fragment linked to the prorenin prosegment following removal of the fsAngII peptide. These results demonstrate that fsAngII can be cleaved from an appropriate fusion protein in GH<sub>4</sub>C1 cells with an efficacy of roughly 50% and be secreted into the extracellular space.



**Figure 4.** Cleavage and secretion of the fusion protein in transfected cells. GH<sub>4</sub>C1 cells were transfected with the expression vectors pIg and pIgPfsAngII. Parallel wells of cells were labeled for 30 min with [<sup>35</sup>S]methionine and chased 2.5 h. Culture supernatants were immunoprecipitated with protein G-agarose and analysed by SDS-PAGE and fluorography. The arrows denote the predicted size of the protein based on coelectrophoresis of size markers (M) containing the fsAngII peptide (upper band) and the protein from which it has been cleaved (lower band).



To test for cardiocyte-mediated release of fsAngII, primary rat ventricular myocytes were transfected with pIgPfsAngII and its control counterpart, pIg. Ang II content from cell lysates and supernatants was measured by RIA (Table 1). Introduction of pIgPfsAngII into neonatal rat primary cardiocytes leads to expression of fsAngII. fsAngII was detected both within the cells and in cell supernatant, demonstrating that fsAngII can be cleaved from an appropriate fusion protein and be secreted into the extracellular space.

**Local expression of fsAngII *in vivo* induces ANP mRNA, a marker of cardiac hypertrophy.** To test for *in vivo* synthesis and biological effects of fsAngII, either pIg or pIgPfsAngII was directly injected into the apex of the rat cardiac ventricle. To test whether expressed fsAngII had local or systemic biological effects *in vivo*, we measured circulating plasma Ang II levels, blood pressure, heart weight and ANP mRNA, a molecular marker of cardiac hypertrophy. Data in Table 2 shows that there were no differences in the heart to body weight ratios and blood pressures of pIgPfsAngII- and pIg (control)-injected rats. The pIgPfsAngII-injected group also had no significant elevation in plasma Ang II levels versus controls (data not shown). To examine the effects of over-expression of fsAngII on ANP mRNA, total RNA was isolated from the lower one-third of injected hearts (injection site and surrounding apex and left ventricular free wall) and from the upper one third of the left ventricle (control tissue, distal to injection area). ANP mRNA was induced 4-fold in the pIgPfsAngII-injected hearts as compared with the pIg-injected hearts (Fig. 5A and B;

**Table 1.** Ang II values from transfected neonatal rat cardiocytes

Transfected plasmid	Supernatant Ang II	Total supernatant Ang II	Cell Ang II	Total cell Ang II
	<i>pg/ml</i>	<i>pg</i>	<i>pg/mg protein</i>	<i>pg</i>
pIg	0.87	20.99	2.70	4.11
pIgPfsAngII	8.13	195.19	31.27	27.22

Cell lysates and supernatants were collected after 48 h of incubation

and Ang II content extracted before radioimmunoassay.

**Table 2.** Summary of physiological changes following expression vector injection in rat hearts

	Rats injected with pIg	Rats injected with pIgPfsAngII
Systolic BP ( <i>mmHg</i> )	125.8 ± 8.0 <sup>n=5</sup>	129.5 ± 7.0 <sup>n=6</sup>
Heart wt\Body wt. ( <i>mg/g</i> )	2.8 ± 0.1 <sup>n=5</sup>	3.0 ± 0.1 <sup>n=6</sup>
Left vent. wt\heart wt. ( <i>g/g</i> )	0.73 ± 0.02 <sup>n=5</sup>	0.70 ± 0.01 <sup>n=4</sup>
Left vent. wt\body wt. ( <i>mg/g</i> )	2.1 ± 0.1 <sup>n=5</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>n=4</sup>

Systolic BP was measured six days post-injection. All other parameters were measured seven days post-injection. BP, blood pressure; wt, weight; vent., ventricle.

Values are means ± SEM.

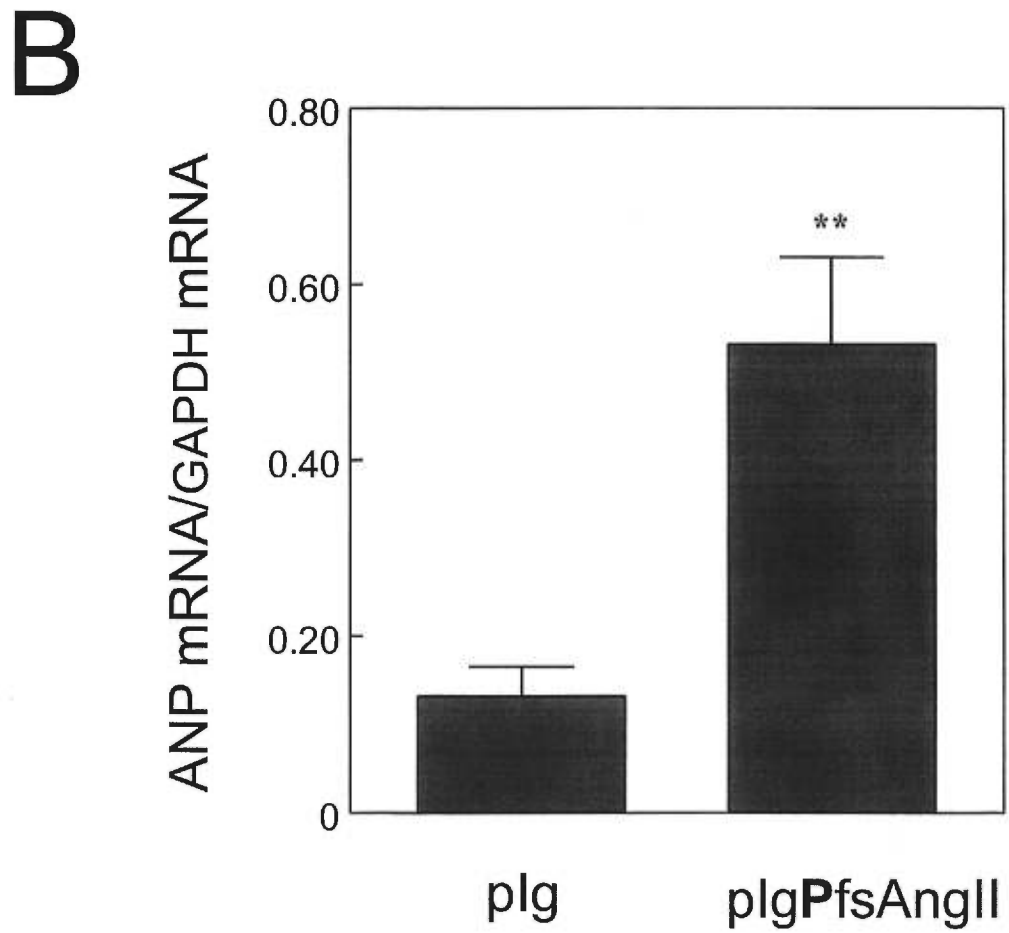
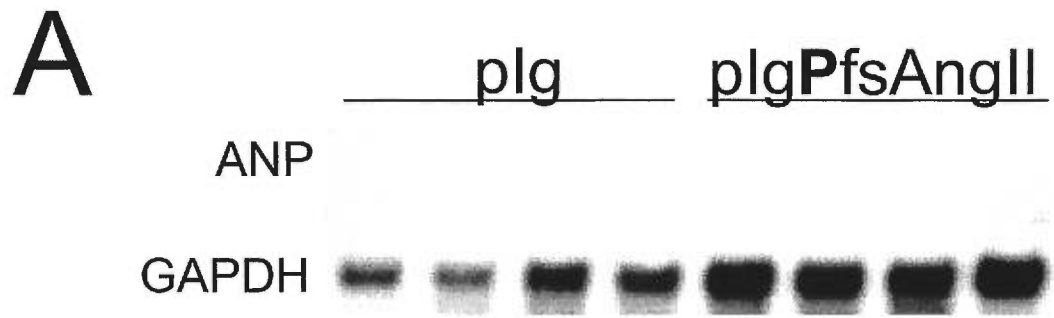


Figure 5

**Figure 5.** Ventricular ANP mRNA expression seven days post-injection of rat hearts with pIg or pIgPfsAngII. **(A)** Representative autoradiograph of ANP mRNA from Northern Blot hybridizations. mRNA was isolated from the apex and the lower 1/3 of the left ventricle free wall (injection area) of different hearts injected with the designated plasmid. **(B)** Densitometry of ANP mRNA. Densitometry was used to quantify the hybridization signals depicted in Fig. 5A. ANP mRNA was corrected for differences in total amount of RNA loaded per lane by comparison with the signal for GAPDH mRNA. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 8 hearts. **\*\*p** < 0.01 (Mann-Whitney non-parametric test) ANP mRNA in pIgPfsAngII-injected group compared to ANP mRNA of pIg (control)-injected group.

$P < 0.01$ ,  $n = 8$ ). Enhanced ANP gene expression was not detected from the upper one third of the left ventricle of pIgPfsAngII- and pIg-injected hearts (data not shown). Thus, our data suggest that local over-expression of fsAngII in cardiac myocytes leads to a highly localized induction of ANP mRNA, a molecular marker of cardiac hypertrophy.

## DISCUSSION

We have engineered a fusion protein that leads to the direct release of an Ang II analog within transfected tissues. The angiotensin peptide used in this study is released by a single cleavage, effected by the processing protease furin, leading to the constitutive secretion of the released peptide. Furin, a mammalian homologue of the yeast precursor-processing Kex2 endoprotease, is a Golgi-anchored convertase expressed in all examined tissues and cell lines (42-44). Sequence requirements for efficient processing of precursors by furin have been extensively studied and the RXXRKR amino acid combination located from position -6 to -1 relative to the cleavage site has been shown to lead to the higher cleavage efficiency in cultured cells (29,30). fsAngII, Ala-Pro-Gly-[Ile<sup>3</sup>,Val<sup>5</sup>]-Ang II, is an undecapeptide isolated from the skin of the Australian frog *Crinia georgiana* (21), which was chosen because its N-terminal alanine residue is a good substrate for efficient processing by furin (23). Our results show that efficient cleavage and secretion of fsAngII from the fusion protein requires the presence of a molecular "spacer" between the Ig fragment

and the angiotensin peptide presumably due to steric constraints near the cleavage site. The choice of the prorenin prosegment as a "spacer" was dictated by our previous success with the engineered furin cleavage in this peptide (27). The presence of the Ig fragment in the fusion protein allows for a rapid assessment of cleavage efficiencies with various peptide-containing fusion proteins in cell cultures (Fig. 4 and data not shown) by the simple use of protein A- or G-coupled matrices. Evidence for the cleavage-mediated release of fsAngII peptide is also provided by the finding that introduction of pIgPfsAngII into primary cultures of rat neonatal ventricular myocytes leads to intracellular accumulation and secretion of immunoreactive fsAngII (Table 1).

Our results demonstrate that fsAngII binds to both the AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> Ang II receptor subtypes. While fsAngII binds the AT<sub>2</sub> receptor with a similar affinity to that of mammalian Ang II (native Ang II), binding to the AT<sub>1</sub> receptor, which is thought to mediate most of the cardiovascular effects of Ang II (34,45), occurs with 40-fold lower affinity than native Ang II (Fig. 2A). However, even though fsAngII binding elicits only approximately 65% of the AT<sub>1</sub> receptor-mediated release of intracellular calcium, its duration of action on target cells is significantly longer than that of native Ang II (Fig. 3). The combination of these properties may explain the apparent similarities in effective biological concentrations of Ang II and fsAngII on transfected cells. Indeed, Khosla and Bumpus have previously reported that the

pressor activity of the synthetic fsAngII in rats was  $90.6 \pm 5.0\%$  of that of human Ang II (22).

Our *in vivo* injection experiments, using pIgPfsAngII-injected rat cardiac ventricles, demonstrate for the first time that an engineered fusion protein precursor (Ig-prosegment-fsAngII) can be processed to a mature peptide (fsAngII) *in vivo* and have local biological effects. We are unsure as to the origin of the cells secreting the fsAngII peptide in injected hearts as immunostaining for either the Ig or angiotensin peptides was inconclusive (perhaps due to a low level of expression and/or the rapid secretion of the fusion protein from the cells). However, as the viral promoter/enhancer used in our expression vector has a broad cell specificity, it could conceivably be expressed in either cardiac myocytes or fibroblasts. Analyses of injected rats revealed no significant differences in blood pressure, total heart weight to body weight ratios (Table 2) or in circulating Ang II levels (data not shown) between the control and pIgPfsAngII-expressing groups. In contrast to the absence of systemic fsAngII effects, fsAngII induced a significant increase in ANP mRNA levels in the injected portion of the heart (Fig. 5). Enhanced ANP gene expression was not detected distal to the injection site. Coupled with the failure to detect an increase in heart to body weight ratios, these data suggest that the expression of fsAngII is highly localized to cells along the injection site. These data support the *in vitro* results of Sadoshima et al. (46) who demonstrated the autocrine effects of Ang II in cardiac myocyte hypertrophy *in vitro* and demonstrate that *in vivo* local over-



expression of fsAngII in the rat heart leads to a highly localized cardiac hypertrophic phenotype.

In conclusion, we have described a novel expression vector which can serve as an alternative to co-expressing all the components of the RAS to generate Ang II. This type of approach could also be extended with the use of tissue-specific genes in transgenic animals to test the importance of other bio-active peptides on organ physiology.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension and from the NIH Heart Lung and Blood Institute (MCL) HL28982, HL03188. DM is the recipient of a NSERC Canada fellowship and TLR is the recipient of the Merck-Frosst Chair in clinical and molecular pharmacology.

**REFERENCES**

1. Ganong, W. F., Deschepper, C. F., Steele, M. K., and Intebi, A. (1989) *Am. J. Hypertens.* **2**, 320-322.
2. Ganong, W. F. (1989) *Horm. Res.* **31**, 24-31.
3. Mulrow, P. J. (1989) *Yale J. Biol. Med.* **62**, 503-510.
4. Paul, M., Wagner, J., and Dzau, V. J. (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 2058-2064.
5. Griendling, K. K., Murphy, T. J., and Alexander, R. W. (1993) *Circulation* **87**, 1816-1828.
6. Gomez, R. A. and Norwood, V. F. (1995) *Am. J. Kidney Dis.* **26**, 409-431.
7. Ganong, W. F. (1993) *Front. in Neuroendocrinol.* **14**, 233-249.
8. Lee, M. A., Bohm, M., Paul, M., and Ganten, D. (1993) *Circulation* **87**, IV7-113.
9. Neuringer, J. R. and Brenner, B. M. (1993) *Am. J. Kidney Dis.* **22**, 98-104.

10. Ganong, W. F. (1995) *Neurosci. Biobehav. Rev.* **19**, 241-250.
11. Sealey, J. E. and Rubattu, S. (1989) *Am. J. Hypertens.* **2**, 358-366.
12. Campbell, D. J., Kladis, A., Skinner, S. L., and Whitworth, J. A. (1991) *J. Hypertens.* **9**, 265-274.
13. Hsueh, W. A. and Baxter, J. D. (1991) *Hypertension* **17**, 469-479.
14. Hosoi, M., Kim, S., Tabata, T., Nishitani, H., Nishizawa, Y., Morii, H., Murakami, K., and Yamamoto, K. (1992) *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* **74**, 680-684.
15. Tanimoto, K., Sugiyama, F., Goto, Y., Ishida, J., Takimoto, E., Yagami, K., Fukamizu, A., and Murakami, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31334-31337.
16. Kim, H. S., Kregge, 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) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2735-2739.
17. Mullins, J. J., Peters, J., and Ganten, D. (1990) *Nature* **344**, 541-544.

18. Ganten, D., Wagner, J., Zeh, K., Bader, M., Michel, J. B., Paul, M., Zimmermann, F., Ruf, P., Hilgenfeldt, U., Ganten, U., and et al (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7806-7810.
19. Keusch, G., Kurtz, A., Fehr, J., Eckardt, K. U., Frei, D., Bauer, C., and Binswanger, U. (1989) *Nephron* **51 Suppl 1**, 29-33.
20. Fukamizu, A., Sugimura, K., Takimoto, E., Sugiyama, F., Seo, M. S., Takahashi, S., Hatae, T., Kajiwara, N., Yagami, K., and Murakami, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 11617-11621.
21. Erspamer, V., Melchiorri, P., Nakajima, T., Yasuhara, T., and Endean, R. (1979) *Experientia* **35**, 1132-1133.
22. Khosla, M. C., Bumpus, F. M., Yasuhara, T., and Nakajima, T. (1981) *J. Med. Chem.* **24**, 885-887.
23. Watanabe, T., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Nagahama, M., Murakami, K., and Nakayama, K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8270-8274.
24. Wei, Y. F., Rodi, C. P., Day, M. L., Wiegand, R. C., Needleman, L. D., Cole, B. R., and Needleman, P. (1987) *J. Clin. Invest.* **79**, 1325-1329.

25. Wu, J. P., Deschepper, C. F., and Gardner, D. G. (1988) *Am. J. Physiol.* **255**, E388-E396.
26. Tucker, P. W., Marcu, K. B., Slightom, J. L., and Blattner, F. R. (1979) *Science* **206**, 1299-1302.
27. Brechler, V., Chu, W. N., Baxter, J. D., Thibault, G., and Reudelhuber, T. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20636-20640.
28. Chu, W. N., Baxter, J. D., and Reudelhuber, T. L. (1990) *Mol. Endocrinol.* **4**, 1905-1913.
29. Watanabe, T., Murakami, K., and Nakayama, K. (1993) *FEBS Lett.* **320**, 215-218
30. Takahashi, S., Hatsuzawa, K., Watanabe, T., Murakami, K., and Nakayama, K. (1994) *J. Biochem.* **116**, 47-52.
31. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
32. Iwai, N. and Inagami, T. (1992) *FEBS Lett.* **298**, 257-260.

33. Thibault, G., Doubell, A. F., Garcia, R., Lariviere, R., and Schiffrin, E. L. (1994) *Circ. Res.* **74**, 460-470.
34. Touyz, R. M., Sventek, P., Lariviere, R., Thibault, G., Fareh, J., Reudelhuber, T., and Schiffrin, E. L. (1996) *Hypertension* **27**, 1090-1096.
35. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol Chem.* **260**, 3440-3450.
36. Touyz, R. M., Lariviere, R., and Schiffrin, E. L. (1995) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**, 1262-1273.
37. Touyz, R. M., Fareh, J., Thibault, G., Tolloczko, B., Lariviere, R., and Schiffrin, E. L. (1996) *Am. J. Physiol.* **270**, H857-H868.
38. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
39. Deschepper, C. F., Crumrine, D. A., and Ganong, W. F. (1986) *Endocrinology* **119**, 36-43.
40. LaPointe, M. C., Wu, G., Garami, M., Yang, X. P., and Gardner, D. G. (1996) *Hypertension* **27**, 715-722.

41. LaPointe, M. C. and Sitkins, J. R. (1993) *Mol. Endocrinol.* **7**, 1284-1296.
42. Schalken, J. A., Roebroek, A. J., Oomen, P. P., Wagenaar, S. S., Debruyne, F. M., Bloemers, H. P., and Van de Ven, W. J. (1987) *J. Clin. Invest.* **80**, 1545-1549.
43. Bresnahan, P. A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H. L., Brake, A. J., Barr, P. J., and Thomas, G. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 2851-2859.
44. Hatsuzawa, K., Hosaka, M., Nakagawa, T., Nagase, M., Shoda, A., Murakami, K., and Nakayama, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 22075-22078.
45. Ito, M., Oliverio, M. I., Mannon, P. J., Best, C. F., Maeda, N., Smithies, O., and Coffman, T. M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3521-3525.
46. Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H. S., and Izumo, S. (1993) *Cell* **75**, 977-984.

## **CHAPITRE 5**

### **RESULTATS ADDITIONNELES ET DISCUSSION**



## RESULTATS ADDITIONNELS ET DISCUSSION

### 5.1 Evaluation du minigène de la tyrosinase comme marqueur visuel pour l'analyse de souris transgéniques

Le chapitre 2 décrit la caractérisation du minigène de la tyrosinase comme marqueur de la présence et de l'intensité d'expression d'un transgène d'intérêt co-injecté, de même que pour l'identification de souris homozygotes et double-transgéniques. Cet outil s'est avéré d'une grande utilité pour alléger la tâche d'analyse des souris double-transgéniques faisant l'objet de l'étude décrite au chapitre 3. Ainsi l'analyse d'ADN de queues de souris par PCR a été effectuée seulement à partir de souris prétendues positives d'après leur pigmentation, éliminant la nécessité d'analyser un bon nombre de souris prétendues négatives d'après leur pigmentation. De nouvelles lignées de souris transgéniques ont été produites suite à la publication de l'article concernant l'utilisation du minigène de la tyrosinase et ont permis de poursuivre sa caractérisation quant à son utilité comme indicateur du niveau d'expression du transgène d'intérêt. Un tableau mettant en parallèle l'intensité de pigmentation de chacune des lignées étudiées et le niveau d'expression du transgène d'intérêt déterminé par RNase protection est présenté (Tableau 5.1).

Une bonne corrélation est généralement observée entre les niveaux d'expression des deux transgènes, celle-ci étant particulièrement évidente lorsqu'il y a absence d'expression. Les deux transgènes co-injectés sont exprimés dans des types cellulaires

**Table 5.1** Relative expression of the tyrosinase minigene and different transgenes of interest (TOI)

Line	Pigmentation phenotype	Relative intensity of pigmentation	Relative level of TOI expression
33	Dark	+++	+++
50	Dark	+++	+++
53	Dark	+++	-
34	Mottled	++	++
35	Himalayan	++	++
52	Himalayan	+	+
40	Himalayan	+	+/-
51	Light	+	+
37	Light	+	-
45	Albino	-	+/-
49	Albino	-	+/-
38	Albino	-	-
39	Albino	-	-

Expression of the tyrosinase minigene is divided in two categories; qualitative including the pigmentation phenotype (i.e. albino, dark, light, mottled, and himalayan) and quantitative (as displayed by + and - signs) to define the relative pigmentation intensity of the different lines. Level of expression of the TOI, quantitated by RNase protection assay, is displayed in the right-hand column.

différents, soit les somatotropes pour les différents transgènes d'intérêt et les mélanocytes pour le minigène de la tyrosinase. Il est vraisemblable que les transgènes co-injectés soient intégrés à un site unique dans la chromatine et que la corrélation entre les niveaux d'expression des deux transgènes indiquent que le site d'intégration se comporte de façon similaire quant à son accessibilité aux facteurs de transcription dans les deux types cellulaires. Il est possible que l'utilisation du minigène de la tyrosinase avec des gènes d'intérêt ciblés dans d'autres types cellulaires ne se traduisent pas par des niveaux d'expression comparables. Cependant, le haut degré de corrélation observé dans cette étude lorsqu'il y a absence d'expression suggère que la chromatine, lorsque inaccessible, le demeure probablement dans tous les types cellulaires.

## **5.2 Activité tissulaire de la prorénine humaine dans un modèle de souris transgéniques**

Le chapitre 3, concernant l'activité de la prorénine humaine dans un tissu, constitue la majeure partie de cette thèse et est discuté plus longuement dans cette section.

### **5.2.1 *Dosage des angiotensines***

Des souris transgéniques exprimant l'angiotensinogène humain ont été croisées avec différentes lignées de souris transgéniques exprimant soit la prorénine humaine ou des mutants du site de clivage du prosegment de la prorénine afin de produire de la

rénine active ou de la prorénine non clivable. L'expression des différents transgènes est ciblée dans l'hypophyse antérieure et l'évaluation du contenu hypophysaire en Ang I (produit de la réaction de la rénine sur son substrat, l'angiotensinogène) des souris double-transgéniques révèle l'activité enzymatique des différentes prorénines.

L'Ang I est détectable dans les hypophyses de la lignée simple-transgénique d'angiotensinogène, alors qu'elle est non détectable dans les hypophyses de toutes les lignées exprimant uniquement une des trois constructions de prorénine, de même que dans les hypophyses provenant de souris non transgéniques. Ce résultat est inattendu. En effet, étant donné la spécificité d'espèce de la rénine, il semblait peu probable *a priori* que la rénine endogène présente dans l'hypophyse de souris, convertisse l'angiotensinogène humain, qui possède un site de clivage différent du substrat endogène (leucine<sup>10</sup>-valine<sup>11</sup> vs leucine<sup>10</sup>-leucine<sup>11</sup>). Différents groupes ont utilisé une approche de double-transgéniques afin de générer un SRA humain circulant chez le rat ou la souris (39-41). Aucune de ces études ne donne lieu à un phénotype hypertendu ou à la production d'Ang I et d'Ang II plasmatiques chez les simple-transgéniques vraisemblablement à cause de la spécificité d'espèce de la réaction rénine-angiotensinogène déjà établie *in vitro* (169). Cependant, étant donné que la spécificité vient d'une différence d'affinité et de la vitesse de catalyse de la réaction enzymatique, il n'est pas exclu que l'enzyme de souris convertisse le substrat humain dans le contexte de l'hypophyse. Il est aussi possible qu'une autre enzyme que la rénine présente dans l'hypophyse de souris effectue la conversion de l'angiotensinogène humain. A cet effet, les études de recombinaison homologue du

gène de la rénine chez la souris seront informatives quant à la possibilité d'une activité enzymatique indépendante de la rénine sur l'angiotensinogène endogène. Certaines souches de souris possèdent deux gènes codant pour la rénine, *Ren-1d* et *Ren-2*, et les résultats de recombinaison homologue publiés à ce jour concernent la mutation des deux gènes individuellement (31,170). La détection d'Ang I dans le plasma ou dans les tissus des double-mutants démontrerait l'activité d'une enzyme autre que la rénine utilisant l'angiotensinogène endogène comme substrat. Ce résultat ne pourrait cependant être extrapolé relativement au substrat humain mais justifierait certainement une étude plus approfondie.

Alors que le dosage de l'Ang I dans les hypophyses de souris transgéniques donne des résultats reproductibles et significativement plus élevés que le contrôle, le dosage de l'Ang II hypophysaire n'a pu être utilisé pour cette étude. Un même échantillon d'hypophyses analysé par chromatographie liquide à haute performance, dont les fractions d'élution contenant l'Ang I et l'Ang II sont ensuite dosées par radioimmunoessai, donne des valeurs élevées d'Ang I, alors que les valeurs d'Ang II sont à la limite du seuil de détection. L'Ang I humain et de souris ont la même séquence d'acides aminés et devraient donc être également converties en Ang II par l'ECA endogène. Il est possible que l'ECA soit limitante dans l'hypophyse de souris et/ou que l'Ang II produite ne soit pas détectable à cause d'une demi-vie trop courte ou encore parce qu'elle est immédiatement diluée et entraînée dans la circulation.

Il n'y a pas d'augmentation de la concentration d'Ang I dans le plasma des souris transgéniques et la prorénine et la rénine humaines n'y sont pas détectables (résultats non présentés). Le choix de l'hypophyse comme tissu exprimant les transgènes a été dicté par le fait qu'un promoteur spécifique à ce tissu, le promoteur de l'hormone de croissance de rat, permet une expression uniquement dans les cellules de l'hypophyse antérieure, évitant ainsi une expression multi-tissulaire des transgènes (171). Une étude d'immunohistochimie sur des coupes sériées d'hypophyse de souris transgéniques a démontré que la rénine est co-localisée dans le même type cellulaire que l'hormone de croissance, alors qu'une étude de l'expression des messagers de la rénine et de l'angiotensinogène humains par RNase protection a démontré que les transgènes ne sont pas exprimés de façon ectopique dans le cerveau, le foie, le rein et le coeur (résultats non présentés).

### ***5.2.2 Mécanisme d'activation de la prorénine tissulaire***

Les souris exprimant à la fois l'angiotensinogène humain et la prorénine humaine dans l'hypophyse produisent de l'Ang I dans ce tissu, sans qu'il y ait clivage du prosegment de la prorénine. La structure tridimensionnelle de la prorénine n'est pas encore connue, mais par déduction à partir de la structure connue de la rénine humaine et par analogie avec la structure d'une aspartyl protéase telle que le pepsinogène humain, il est prédit que le prosegment de 43 acides aminés recouvre le site actif de l'enzyme et le maintient dans un état inactif en empêchant l'accès du substrat (172). Cette prédiction est étayée par le fait que la présence d'une grande

quantité de fragments peptidiques du prosegment inhibe *in vitro* la conversion de l'angiotensinogène en Ang I par la rénine (173). *In vitro*, l'activation de la prorénine est obtenue selon trois approches différentes: i) l'enlèvement protéolytique du prosegment par une convertase de type sérine protéase génère de la rénine active; ce type d'activation est produit dans le rein, source de rénine active dans la circulation (51); ii) l'acidification de la prorénine (pH 3,3) produit une activation réversible et à un niveau comparable à celle produite par protéolyse (174,175); iii) le froid (0°C) produit aussi une activation réversible de la prorénine, mais à un niveau de 15 à 25% relativement à l'activation produite par protéolyse (89,176).

Il est prédit qu'une activation de type non protéolytique ne se produit pas une fois la prorénine sécrétée dans la circulation. Chez les individus ayant subi une néphrectomie bilatérale, la sécrétion de rénine active est abolie et la prorénine toujours détectable dans le plasma de ces patients ne possède aucune activité (55,81,167,168). Cette observation concorde avec les résultats d'études démontrant que des injections de prorénine humaine recombinante dans la circulation de singes ne produisent pas d'effets résultant d'une activation de la prorénine injectée. Ainsi, une injection d'une quantité modérée de prorénine humaine pendant 40 minutes (177), ou une injection rapide d'une grande quantité de prorénine humaine (178), provoquant des augmentations du contenu en prorénine circulante de quatre et cent fois respectivement, ne produisent aucune augmentation significative de l'activité rénine plasmatique, du contenu plasmatique d'Ang II, de la pression sanguine, des

battements cardiaques, du taux de filtration glomérulaire, du débit du plasma rénal ou de la quantité de sodium et de potassium urinaire.

A la différences des conditions physiologiques retrouvées dans la circulation, les conditions physiologiques tissulaires pourraient être favorables à une activation de nature non protéolytique de la prorénine. Nous avons proposé l'hypothèse d'une activation de la prorénine tissulaire induite par un pH tissulaire relativement plus acide que celui du plasma. Des alternatives différentes ont aussi été proposées par d'autres chercheurs. Sealey et ses collaborateurs ont suggéré la présence d'un récepteur spécifique à la surface des cellules liant la prorénine et exposant le site actif de l'enzyme de façon réversible (89,179). Heinrikson et ses collaborateurs ont démontré qu'après le passage d'une préparation de prorénine sur une colonne d'affinité retenant la rénine active, la préparation de prorénine purifiée (non liée à la colonne et totalement inactive) retrouvait après plusieurs heures un faible pourcentage d'activité (5 à 10%) à pH 6,5 et 37°C (175). Ils ont aussi décrit la capacité d'un inhibiteur du site actif de la rénine à lier en 24 heures de la prorénine purifiée *in vitro*. Ils ont émis l'hypothèse qu'une certaine flexibilité du prosegment de la prorénine existerait *in vivo* donnant lieu à un équilibre entre une forme majoritaire inactive qualifiée de fermée, et une forme minoritaire active qualifiée d'ouverte. Dans la forme fermée, le prosegment serait lié au site actif de l'enzyme, alors que dans la forme ouverte le prosegment serait mobile, se détachant constamment du corps de l'enzyme. A l'image de l'inhibiteur utilisé *in vitro*, le substrat naturel de l'enzyme compétitionnerait avec le prosegment pour l'accès au site actif de la prorénine.



L'équilibre entre la forme fermée et ouverte serait dépendant de la température et du pH, le froid et l'acidité favorisant la forme ouverte. Derkx et ses collaborateurs ont aussi énoncé l'hypothèse d'une forme ouverte de la prorénine favorisée par un pH acide en utilisant un essai direct de reconnaissance de la rénine (180). Ils ont démontré qu'un anticorps monoclonal reconnaissant la rénine plasmatique, mais non la prorénine inactive, liait la prorénine à 94% si le plasma était acidifié, mais seulement à 8% à pH 7,4 et 37°C, et à des degrés variables (40 à 90%) lorsque la prorénine interagit avec différents inhibiteurs de la rénine, confirmant les études précédentes sur l'activation de la prorénine mesurée par essai indirect (activité enzymatique).

Cette capacité de la prorénine à adopter une forme ouverte active n'est pas inattendue lorsque placée dans le contexte de l'activation des proenzymes de type aspartyl protéase, auquel appartient la prorénine. Certaines de ces proenzymes, telles le pepsinogène et la progastricsine, ont la propriété de s'autoactiver et de cliver leur prosegment respectif de 44 et 43 acides aminés localisé en position N-terminale. Cette activité implique une transition vers un état intermédiaire dans lequel les proenzymes exercent une activité enzymatique sur elles-mêmes. Le mécanisme initiant le changement conformationnel de ces proenzymes est le contact avec le milieu acide de l'estomac (181). La prorénine n'exerce pas d'autocatalyse sur son prosegment, mais la transition vers un état intermédiaire, potentiellement induite par l'acidité de son environnement, lui permettrait peut-être d'exercer une activité catalytique sur son substrat.

### 5.2.3 *Autres modèles d'expression de la prorénine*

Des modèles d'animaux transgéniques pour lesquels l'expression de la prorénine produit un phénotype pathophysiologique sont aussi indicatifs d'une activation non protéolytique de l'enzyme. Un premier modèle de rats transgéniques, exprimant le gène *Ren-2* de la rénine de souris, implique la contribution des SRA tissulaires dans le développement de l'hypertension (182). Ces rats expriment le gène de la rénine de souris dans de nombreux tissus dont, notamment, la surrenale où les niveaux exprimés sont les plus élevés de tout l'organisme. Alors que les niveaux plasmatiques de rénine active, d'angiotensinogène, d'Ang I et d'Ang II ne sont pas augmentés (ils sont tous abaissés à l'exception de celui de l'angiotensinogène), les rats adultes accusent une sévère hausse de la pression sanguine (182) et développent des complications pathologiques (lésions rénales, hypertrophie cardiaque et vasculaire) (183). La rénine rénale ne peut être mise en cause, son expression étant supprimée. Toutefois, le seul composant du SRA circulant fortement surexprimé par l'introduction du gène *Ren-2* est la prorénine, sa concentration plasmatique étant haussée par un facteur de 40 (184). Ce modèle de rats transgéniques hypertendus implique la contribution d'un SRA tissulaire possiblement par l'intermédiaire de la prorénine. L'expression multi-tissulaire du transgène est un handicap majeur dans ce modèle relativement à l'identification du SRA tissulaire précis contribuant au phénotype produit.

Un second modèle de rats transgéniques exprimant aussi le gène *Ren-2* de la souris mais uniquement dans le foie a par la suite été produit (185). Une hypertrophie cardiaque et des lésions rénales importantes sont associées à la hausse par un facteur de 500 de la concentration plasmatique de la prorénine, sans augmentation concordante de la rénine plasmatique et de la pression sanguine chez les rats transgéniques mâles. De plus, l'activité de la rénine rénale est supprimée. Les rats transgéniques femelles démontrent une hausse de la concentration de prorénine plasmatique par un facteur de trois seulement sans autres phénotypes associés. Dans ce modèle, la surexpression de prorénine à un seuil critique serait donc impliquée dans le développement de pathologies tissulaires indépendamment de l'hypertension. L'Ang I et l'Ang II hépatiques n'ont pas été dosées dans cette étude. Par extrapolation de nos résultats démontrant une activité enzymatique de la prorénine dans l'hypophyse des souris transgéniques, il est vraisemblable que le phénotype décrit lorsque la prorénine est exprimée dans le foie résulte de l'activation locale de la prorénine (sans clivage du prosegment) et subséquent de la conversion de l'angiotensinogène synthétisé en abondance dans ce tissu.

Enfin, chez l'humain, une surexpression de prorénine est aussi associée à des dommages au niveau des organes. Des patients diabétiques développent parfois des maladies vasculaires telles qu'une détérioration de la fonction rénale et une rétinopathie. Ces événements sont associés à des niveaux élevés de prorénine plasmatique (augmentation par un facteur de 5 relativement au plasma normal) et à des niveaux faibles de rénine plasmatique (55,164,186). Des événements

physiologiques normaux sont aussi associés à des augmentations de la concentration de prorénine plasmatique sans augmentation concordante de celle de la rénine plasmatique: elle double au moment de l'ovulation et augmente par un facteur de 10 au premier trimestre de la grossesse. L'implication de cette stimulation demeure énigmatique à ce jour.

Toutes ces observations soutiennent l'hypothèse d'une activation de la prorénine sans clivage du prosegment *in vivo* et de sa participation à des fonctions physiologiques et pathophysiologiques indépendamment de la rénine. Il est intéressant de faire une comparaison entre ces modèles de surexpression de la prorénine et les résultats cités précédemment suite à l'injection d'une quantité considérable de prorénine dans la circulation de singes (177,178). Alors qu'une augmentation de courte durée de la prorénine dans la circulation de singes ne génère pas de phénotype attendu suite à une activité rénine, une surexpression de longue durée dans les tissus d'un animal transgénique entraîne des pathologies tissulaires sans augmentation concordante de la rénine active dans la circulation. Comment expliquer les résultats différents découlant de ces deux approches? Deux possibilités sont à considérer. Tel que mentionné précédemment, les conditions physiologiques tissulaires pourraient, à la différence de celles retrouvées dans la circulation, être favorables à une activation de nature non protéolytique de la prorénine, ou un facteur inhibant son activation pourrait être présent dans le plasma. Les animaux transgéniques exprimant la prorénine dans un tissu arborescent ainsi un phénotype suite à l'activation tissulaire non protéolytique du zymogène, alors que l'injection de prorénine dans la circulation est sans effet. Une

seconde possibilité est la durée de l'expression de la prorénine dans l'organisme. Il est vraisemblable qu'une injection de courte durée de prorénine dans la circulation (bolus) ne génère pas de phénotype observable, alors qu'une expression de longue durée aurait permis d'atteindre un niveau d'activation critique de la prorénine et, par conséquent, produit un phénotype distinct. En contraste avec les effets physiologiques rapides produits par la rénine, la participation de la prorénine serait plutôt significative à long terme. Cependant, une activité rénine n'est toujours pas détectable dans le plasma de patients ayant subi une néphrectomie bilatérale même de nombreuses années après la chirurgie (168). Dans ce modèle la prorénine est exprimée à long terme en absence de rénine, mais à des niveaux tout de même inférieurs à la normale. A la lumière de ces résultats, la première possibilité considérant les différences possibles entre les tissus versus le plasma est favorisée comme mécanisme expliquant l'activation non protéolytique de la prorénine tissulaire.

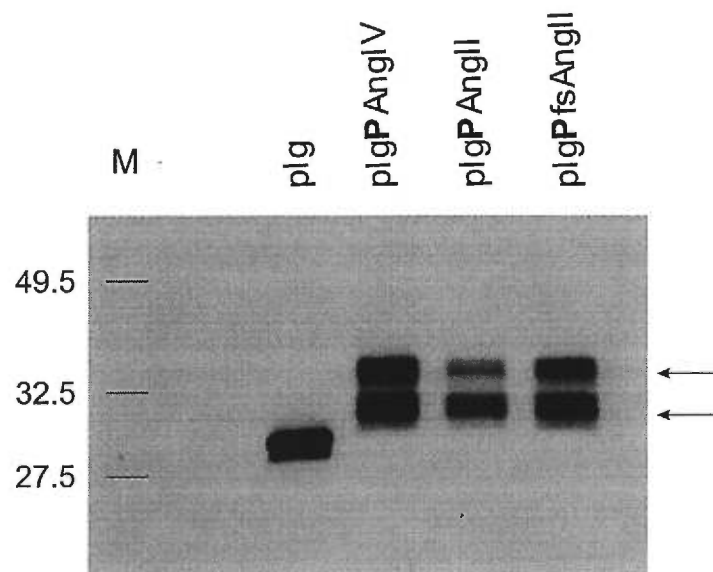
#### **5.2.4 Conclusion**

Les SRA circulant et tissulaires cohabitent dans l'organisme des mammifères et il est vraisemblable qu'ils se partagent des fonctions communes. Alors que les multiples composants du SRA circulant sont sécrétés (angiotensinogène, rénine), convertis (Ang I, Ang II), ou accessible (ECA) dans la circulation, les SRA tissulaires produisent *in situ* la majorité des protéines du système. L'Ang II circulante atteint les nombreux organes-cibles du système par la voie sanguine, alors que l'Ang II tissulaire

exercerait un effet local, à proximité de son site de formation. Bien que le SRA circulant démarre la cascade enzymatique menant à la production d'Ang II via la rénine activée et sécrétée par le rein, les SRA tissulaires ne semblent pas posséder cette capacité protéolytique menant à la conversion de la prorénine en rénine. Plusieurs alternatives ont été invoquées afin d'expliquer la production d'Ang II tissulaire. Nous avons démontré que la prorénine humaine exprimée dans un tissu pouvait être enzymatiquement active sans clivage du prosegment et proposons cette alternative comme prémisse du caractère fonctionnel des SRA tissulaires. Ces systèmes contribueraient aux effets physiologiques et pathophysiologiques déjà associés au SRA circulant. Pourquoi une telle duplication? Alors que le SRA circulant a la faculté de répondre très rapidement aux variations de pression sanguine et d'homéostasie, en particulier via la modulation de la sécrétion de la rénine par le rein, les SRA tissulaires offriraient une réponse tonique. Dans ce contexte, une activation plus lente de la prorénine tissulaire est acceptable. Le fait que cette réponse est prétendue locale justifie la duplication des systèmes. En contraste avec la production d'Ang II circulante qui atteint par la suite tous les organes de l'organisme, l'Ang II produite localement n'influencerait qu'un tissu à la fois, offrant l'avantage d'une modulation fine du tissu concerné, sans effet systémique indésirable sur les autres tissus de l'organisme. De plus, il est postulé que certains SRA tissulaires promouvoient des fonctions indépendantes du SRA circulant, justifiant ainsi leur duplication à un site précis de l'organisme.

### 5.3 Ciblage tissulaire des peptides d'angiotensine

Le chapitre 4 décrit l'utilisation d'une protéine de fusion afin de cibler l'Ang II de peau de crapaud dans un tissu suite à son clivage de la protéine de fusion par la furine. L'efficacité de cette approche a été validée *in vivo* par la démonstration de l'induction d'un marqueur d'hypertrophie cardiaque via l'expression transitoire d'Ang II dans le coeur de rat, en absence d'effets systémiques. La présence d'une alanine en position N-terminale de la séquence d'acides aminés de l'Ang II de peau de crapaud rend ce peptide favorable au clivage de la protéine de fusion par la furine, ce qui justifie son utilisation. Cette approche a aussi été utilisée avec succès par la suite afin de produire les peptides d'Ang II et d'Ang IV humains. Les études de caractérisation du site de clivage reconnu par la furine, qui ont été réalisées sur plusieurs mutants du site, ont identifié les acides aminés alanine et sérine en position P1' du site de clivage comme étant favorables au clivage du substrat par l'enzyme, alors que les acides aminés leucine, isoleucine et valine ont été identifiés comme étant défavorables (187). L'Ang II humain, un octapeptide, contient un acide aspartique en position N-terminale de sa séquence d'acides aminés. La présence d'un acide aspartique en position P1' du site de clivage de la furine n'avait pas été caractérisée lors des études déterminant les acides aminés favorables au clivage par la furine. Une construction identique à celle décrite au chapitre 4 pour l'Ang II de peau de crapaud, mais codant plutôt pour l'Ang II humain (vecteur pIgPAngII), a été transfectée dans des cellules GH<sub>4</sub>C1 et le fragment d'immunoglobuline de la protéine de fusion sécrété dans le surnageant cellulaire a été immunoprécipité (Figure 5.1).



**Figure 5.1** Cleavage and secretion of the fusion proteins in transfected cells. GH<sub>4</sub>C1 cells were transfected with the expression vectors pIg, pIgPAngIV, pIgPAngII or pIgPfsAngII. Parallel wells of cells were labeled for 30 min with [<sup>35</sup>S]methionine and chased 2.5 h. Culture supernatants were immunoprecipitated with protein G-agarose and analysed by SDS-PAGE and fluorography. The arrows denote the predicted size of the protein based on coelectrophoresis of size markers (M) containing the Ang IV, Ang II or fsAngII peptide (upper band) and the protein from which it has been cleaved (lower band).



Pour fin de comparaison, le plasmide-contrôle codant pour le fragment d'immunoglobuline (vecteur pIg) et le plasmide codant pour la protéine de fusion contenant l'Ang II de peau de crapaud (vecteur pIgPfsAngII) ont aussi été transfectés. Dans ce système l'efficacité de clivage de l'Ang II de peau de crapaud est évaluée à environ 50%, la bande inférieure migrant selon le poids moléculaire du fragment d'immunoglobuline lié au prosegment de la prorenine (rôle d'espaceur), alors que la bande supérieure correspond au poids moléculaire de la protéine de fusion intacte contenant le peptide d'Ang II de peau de crapaud. La présence de deux bandes dans le puits correspondant à l'immunoprécipitation des surnageants de cellules ayant été transfectées avec le plasmide codant pour l'Ang II humain démontre que cette protéine de fusion est aussi clivée et sécrétée. L'efficacité de clivage de l'Ang II humain est évaluée à environ 70%. La présence d'un acide aspartique en position P1' du site de reconnaissance de la furine est donc nettement favorable au clivage par la furine dans ce système.

L'Ang IV humain, un hexapeptide, contient une valine en position N-terminale de sa séquence d'acides aminés. Cet acide aminé a été identifié comme étant défavorable au clivage par la furine. Afin de contourner ce problème, une alanine a été ajoutée à l'extrémité N-terminale du peptide d'Ang IV. Cet acide aminé est à la fois favorable au clivage par la furine et devrait être éliminé *in vivo* par les aminopeptidases afin d'assurer la conversion du peptide en Ang IV. Une construction identique à celle décrite au chapitre 4 pour l'Ang II de peau de crapaud, mais codant plutôt pour l'Ang IV humain (vecteur pIgPAngIV), a été transfectée dans des cellules GH<sub>4</sub>C1 et le

fragment d'immunoglobuline de la protéine de fusion sécrété dans le surnageant cellulaire a été immunoprécipité (Figure 5.1). Cette protéine de fusion est aussi clivée et sécrétée et l'efficacité de clivage de l'Ang IV humain dans ce système est évaluée à environ 50%. Ces deux constructions, après plus ample caractérisation, seront utilisées afin d'étudier le rôle de l'Ang II et de l'Ang IV produites localement dans des tissus via la génération de souris transgéniques. L'intérêt premier de cette approche est de cibler directement le produit d'une cascade enzymatique et d'éviter de devoir exprimer tous les composants du système. L'expression transitoire de l'Ang II de peau de crapeau dans le coeur de rat a produit un effet biologique local en absence d'effets systémiques. Si l'expression des transgènes tout au long de la vie de l'animal transgénique s'exerce aussi de façon strictement locale, il est alors possible de discriminer les effets systémiques et les effets tissulaires du SRA.

#### **5.4 Perspectives**

Les outils développés au cours de cette thèse (identification visuelle de souris transgéniques et ciblage de peptides), de même que le modèle de souris transgéniques produit, ont le potentiel de servir d'ébauches à de nouveaux projets de recherche pour l'étude des SRA tissulaires.

1. De nouvelles lignées de souris transgéniques exprimant la rénine humaine dans le foie ont été produites en utilisant la stratégie de co-injection du minigène de la tyrosinase décrite au chapitre 2. Il serait intéressant de poursuivre la comparaison

des niveaux d'expression du transgène d'intérêt avec l'intensité de pigmentation induite par l'expression de tyrosinase. Il serait ainsi possible de vérifier si la corrélation entre l'expression des deux transgènes co-intégrés dans les cellules de l'organisme est toujours élevée lorsque le transgène d'intérêt est exprimé dans un nouveau type cellulaire, les hépatocytes.

2. Des lignées de souris transgéniques exprimant la rénine humaine dans le foie (sécrétée dans le sang) ont été produites afin d'étudier la captation tissulaire de la protéine circulante. Les études d'immunohistochimie effectuées sur les différents tissus de ces souris indiquent que la protéine est présente dans le coeur. Afin de démontrer la captation de l'enzyme, l'angiotensinogène humain sera ciblé dans le coeur de nouvelles lignées de souris transgéniques qui seront par la suite croisées avec les lignées exprimant la rénine humaine dans le foie. La méthode développée au chapitre 3 (chromatographie liquide à haute performance et radioimmunoessai) sera à nouveau utilisée afin d'évaluer la production d'Ang I cardiaque.
  
3. Les aspects physiologiques du modèle de souris double-transgéniques co-exprimant la prorénine et l'angiotensinogène humains dans l'hypophyse n'ont pas été caractérisés au chapitre 3, le but du projet de recherche étant plutôt d'étudier l'activité enzymatique de la prorénine *in vivo*. Il s'avère toutefois que certaines lignées de souris double-transgéniques ont un comportement hyperactif et nettement agressif. Ceci est particulièrement évident avec les lignées 33 x 44B (rénine active et angiotensinogène) et 50 x 44B (prorénine native et

angiotensinogène). Il est possible que ce comportement soit induit par la production hypophysaire du peptide actif du SRA, l'Ang II. Des mesures de la pression artérielle de ces lignées et une étude de comportement seraient pertinentes afin de déterminer précisément le phénotype produit. Ce modèle n'est cependant pas idéal. Il nécessite la production de souris double-transgéniques afin de produire de l'Ang I, et le peptide d'Ang II n'a pas été détecté dans les hypophyses de ces souris. Un modèle plus approprié pour une étude physiologique serait d'utiliser l'approche décrite au chapitre 4 afin de cibler directement de l'Ang II dans l'hypophyse avec une protéine de fusion.

4. L'activité enzymatique de la prorénine humaine dans un tissu a été démontrée dans un modèle de souris transgéniques. Dans un avenir plus lointain, il est prévisible que l'importance physiologique de l'activité enzymatique du zymogène soit étudiée via une autre approche. La convertase responsable du clivage protéolytique du prosegment de la prorénine n'est pas encore identifiée à ce jour. L'identification de cette convertase, et subséquemment sa recombinaison homologue ou son inhibition pharmacologique, permettrait d'étudier l'activité de la prorénine en absence de rénine active et de distinguer la fonction circulante du système rénine-angiotensine de la fonction des nombreux systèmes tissulaires présumément de nature prorénine active-angiotensine.
5. Le phénotype induit lors de la recombinaison homologue des divers composants du SRA (malformation rénale), de même que l'expression de ces composants dans

le rein en développement et les défauts de développement rénal induits suite à la prise d'inhibiteurs du SRA, suggèrent une implication du SRA dans le développement rénal. Les souris déficientes pour les gènes codant pour la rénine *Ren-1* (31), l'angiotensinogène (32-34), l'ECA (35-37), et les deux récepteurs AT<sub>1</sub> (AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub>) (38) démontrent toutes une histologie rénale anormale, un retard de croissance, et un faible taux de survie avant le sevrage. Ce genre d'approche ne permet cependant pas de discriminer la contribution du SRA circulant et celle du SRA rénale (ou autre tissu) au défaut rénal. L'utilisation d'une protéine de fusion sera mise à profit afin d'étudier spécifiquement l'implication des angiotensines produites localement lors du développement rénal. L'Ang II et l'Ang IV seront indépendamment ciblées dans le rein des souris déficientes pour le gène de l'angiotensinogène afin de déterminer si l'expression locale de ces peptides peut corriger le défaut rénal des souris mutées. Un ciblage de l'Ang II dans le cerveau de ces mêmes souris permettra aussi d'étudier l'effet central de l'Ang II sur le développement rénal.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Tigerstedt, R. and P. G. Bergman. 1898. Niere und Kreislauf. *Skand. Arch. Physiol.* 8:223-271.
2. Goldblatt, H., J. Lynch, R. F. Hanzal, and W. W. Summerville. 1934. Studies on experimental hypertension I. The production of persistent elevation of blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 59:347-378.
3. Harrison, T. R., A. Blalock, and M. F. Mason. 1937. Effect on blood pressure of injection of kidney extracts of dogs with renal hypertension. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 35:38
4. Prinzmetal, M. and B. Friedman. 1937. Pressor effects of kidney extracts from patients and dogs with hypertension. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 35:122
5. Kohlstaedt, K. G., O. M. Helmer, and I. H. Page. 1938. Activation of renin by blood colloids. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 39:214
6. Page, I. H. and O. M. Helmer. 1940. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J. Exp. Med.* 71:29-42.
7. Braun-Menendez, E., J. C. Fasciolo, L. F. Leloir, and J. M. Munoz. 1939. La substancia hipertensora de la sangre del rinon isquimiado. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 15:420-425.
8. Skeggs, L. T., W. H. Marsh, J. R. Kahn, and N. P. Shumway. 1954. The existence of two forms of hypertensin. *J. Exp. Med.* 99:275
9. Schwyzer, R., B. Iselin, H. Kappeler, b. Riniker, w. Rittel, and H. Zuber. 1958. Effective synthesis of an octapeptide with the amino-acid sequence of angiotensin II in cow serum. *Helv. Chim. Acta* 41:1287-1295.
10. Schwyzer, R., B. Iselin, H. Kappeler, b. Riniker, w. Rittel, and H. Zuber. 1958. Effective synthesis of a decapeptide with the amino-acid sequence of Val<sup>5</sup>-angiotensin I. *Helv. Chim. Acta* 41:1273-1286.
11. Laragh, J. H., M. Angers, W. Kelly, and S. Lieberman. 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.
12. Biron, P., E. Koiw, W. Nowaczynski, J. Brouillet, and J. Genest. 1961. the effects of intravenous infusions of valine-5 angiotensin II and other pressor agents on urinary electrolytes and corticosteroids including aldosterone. *J. Clin. Invest.* 40:338-344.

13. Braun-Menendez, E. 1946. Renal Hypertension. Thomas C.C. editor. Springfield. 172
14. Skeggs, L. T., J. R. Kahn, and N. P. Schumway. 1956. The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 103:295-299.
15. Vane, J. R. 1969. The release and fate of vaso-active hormones in the circulation. *Brit. J. Pharmacol.* 35:209-242.
16. Yang, H. Y., E. G. Erdos, and Y. Levin. 1970. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim. Biophys. Acta* 214:374-376.
17. Lumbers, E. R. 1971. Activation of renin in human amniotic fluid by low pH. *Enzymologia* 40:329-336.
18. Cushman, D. W. and M. A. Ondetti. 1991. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* 17:589-592.
19. Galen, F. X., C. Devaux, T. Guyenne, J. Menard, and P. Corvol. 1979. Multiple forms of human renin. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 254:4848-4855.
20. Yokosawa, H., L. A. Holladay, T. Inagami, E. Haas, and K. Murakami. 1980. Human renal renin. Complete purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 255:3498-3502.
21. Slater, E. E. and H. V. Strout, Jr. 1981. Pure human renin. Identification and characterization and of two major molecular weight forms. *J. Biol. Chem.* 256:8164-8171.
22. Tewksbury, D. A., R. A. Dart, and J. Travis. 1981. The amino terminal amino acid sequence of human angiotensinogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99:1311-1315.
23. Stewart, T. A., J. A. Weare, and E. G. Erdos. 1981. Purification and characterization of human converting enzyme (kininase II). *Peptides* 2:145-152.
24. Takada, Y., K. Hiwada, and T. Kokubu. 1981. Isolation and characterization of angiotensin converting enzyme from human kidney. *J. Biochem.* 90:1309-1319.
25. Miyazaki, H., A. Fukamizu, S. Hirose, T. Hayashi, H. Hori, H. Ohkubo, S. Nakanishi, and K. Murakami. 1984. Structure of the human renin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5999-6003.



26. Kageyama, R., H. Ohkubo, and S. Nakanishi. 1984. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochem.* 23:3603-3609.
27. Soubrier, F., F. Alhenc-Gelas, C. Hubert, J. Allegrini, M. John, G. Tregear, and P. Corvol. 1988. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9386-9390.
28. Murphy, T. J., R. W. Alexander, K. K. Griendling, M. S. Runge, and K. E. Bernstein. 1991. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351:233-236.
29. Sasaki, K., Y. Yamano, S. Bardhan, N. Iwai, J. J. Murray, M. Hasegawa, Y. Matsuda, and T. Inagami. 1991. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351:230-233.
30. Mukoyama, M., M. Nakajima, M. Horiuchi, H. Sasamura, R. E. Pratt, and V. J. Dzau. 1993. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* 268:24539-24542.
31. Clark, A. F., M. G. F. Sharp, S. D. Morley, S. Fleming, J. Peter, and J. J. Mullins. 1997. Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J. Biol. Chem.* 272:18185-18190.
32. Kim, H. S., J. H. Krege, K. D. Kluckman, J. R. Hagaman, J. B. Hodgin, C. F. Best, J. C. Jennette, T. M. Coffman, N. Maeda, and O. Smithies. 1995. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2735-2739.
33. Niimura, F., P. A. Labosky, J. Kakuchi, S. Okubo, H. Yoshida, T. Oikawa, T. Ichiki, A. J. Naftilan, A. Fogo, and T. Inagami. 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.
34. Tanimoto, K., F. Sugiyama, Y. Goto, J. Ishida, E. Takimoto, K. Yagami, A. Fukamizu, and K. Murakami. 1994. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J. Biol. Chem.* 269:31334-31337.
35. Krege, J. H., S. W. John, L. L. Langenbach, J. B. Hodgin, J. R. Hagaman, E. S. Bachman, J. C. Jennette, D. A. O'Brien, and O. Smithies. 1995. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375:146-148.

36. Esther, C. R., Jr., T. E. Howard, E. M. Marino, J. M. Goddard, M. R. Capecchi, and K. E. Bernstein. 1996. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab. Invest.* 74:953-965.
37. Carpenter, C., A. A. Honkanen, H. Mashimo, K. A. Goss, P. Huang, M. C. Fishman, M. Assad, C. R. Dorso, and H. Cheung. 1996. Renal abnormalities in mutant mice. *Nature* 380:292
38. Tsuchida, S., T. Matsusaka, X. Chen, S. Okubo, F. Niimura, H. Nishimura, A. Fogo, H. Utsunomiya, T. Inagami, and I. Ichikawa. 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.
39. Fukamizu, A., K. Sugimura, E. Takimoto, F. Sugiyama, M. S. Seo, S. Takahashi, T. Hatae, N. Kajiwara, K. Yagami, and K. Murakami. 1993. Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J. Biol. Chem.* 268:11617-11621.
40. Merrill, D. C., M. W. Thompson, C. L. Carney, B. P. Granwehr, G. Schlager, J. E. Robillard, and C. D. Sigmund. 1996. Chronic hypertension and altered baroreflex responses in transgenic mice containing the human renin and human angiotensinogen genes. *J. Clin. Invest.* 97:1047-1055.
41. Ganten, D., J. Wagner, K. Zeh, M. Bader, J. B. Michel, M. Paul, F. Zimmermann, P. Ruf, U. Hilgenfeldt, U. Ganten, M. Kaling, S. Bachmann, A. Fukamizu, J. J. Mullins, and K. Murakami. 1992. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7806-7810.
42. Walker, W. G., P. K. Whelton, H. Saito, R. P. Russell, and J. Hermann. 1979. Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1:287-291.
43. Fasola, A. F., B. L. Martz, and O. M. Helmer. 1966. Renin activity during supine exercise in normotensives and hypertensives. *J. Appl. Physiol.* 21:1709-1712.
44. Watt, G. C., S. B. Harrap, C. J. Foy, D. W. Holton, H. V. Edwards, H. R. Davidson, J. M. Connor, A. F. Lever, and R. Fraser. 1992. Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners

- approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J. Hypertens.* 10:473-482.
45. Jeunemaitre, X., F. Soubrier, Y. V. Kotelevtsev, R. P. Lifton, C. S. Williams, A. Charru, S. C. Hunt, P. N. Hopkins, R. R. Williams, J. M. Lalouel, and et al. 1992. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71:169-180.
  46. Jeunemaitre, X., A. Charru, G. Chatellier, C. Dumont, P. Sassano, F. Soubrier, J. Menard, and P. Corvol. 1993. M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. *J. Hypertens.* 11:S80-S81.
  47. Hata, A., C. Namikawa, M. Sasaki, K. Sato, T. Nakamura, K. Tamura, and J.-M. Lalouel. 1994. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J. Clin. Invest.* 93:1285-1287.
  48. Sielecki, A. R., K. Hayakawa, M. Fujinaga, M. E. Murphy, M. Fraser, A. K. Muir, C. T. Carilli, J. A. Lewicki, J. D. Baxter, and M. N. James. 1989. Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science* 243:1346-1351.
  49. Blundell, T., B. L. Sibanda, and L. Pearl. 1983. Three-dimensional structure, specificity and catalytic mechanism of renin. *Nature* 304:273-275.
  50. Morris, B. J. 1986. New possibilities for intracellular renin and inactive renin now that the structure of the human renin gene has been elucidated. *Clin. Sci.* 71:345-355.
  51. Griendling, K. K., T. J. Murphy, and R. W. Alexander. 1993. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 87:1816-1828.
  52. Do, Y. S., T. Shinagawa, H. Tam, T. Inagami, and W. A. Hsueh. 1987. Characterization of pure human renal renin. *J. Biol. Chem.* 262:1037-1043.
  53. Gomez, R. A. and J. M. Gloor. 1995. Expression of the renin-angiotensin system in the kidney. In *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Laragh J.H. and Brenner B.M. editor. Raven Press, New York. 1637-1652.
  54. Kim, S., M. Hosoi, K. Nakajima, and K. Yamamoto. 1991. Immunological evidence that kidney is primary source of circulating inactive prorenin in rats. *Am. J. Physiol.* 260:E526-E536.

55. Derkx, F. H. and M. A. Schalekamp. 1988. Human prorenin: pathophysiology and clinical implications. *Clin. Exper. Hypertens. Theory & Practice* 10:1213-1225.
56. Sealey, J. E., S. A. Atlas, and J. H. Laragh. 1980. Prorenin and other large molecular weight forms of renin. *Endocr. Rev.* 1:365-391.
57. Dzau, V. J., D. W. Burt, and R. E. Pratt. 1988. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.* 255:F563-F573.
58. Printz, M. P., J. M. Printz, and R. T. Dworschack. 1977. Human angiotensinogen. Purification partial characterization, and a comparison with animal prohormones. *J. Biol. Chem.* 252:1654-1662.
59. Doolittle, R. F. 1983. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. *Science* 222:417-419.
60. Jeunemaitre, X., J. Ménard, E. Clauser, and P. Corvol. 1995. Angiotensinogen: molecular biology and genetics. In *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Laragh J.H. and Brenner B.M. editor. Raven Press, New York. 1653-1664.
61. Kimura, S., J. J. Mullins, B. Bunnemann, R. Metzger, U. Hilgenfeldt, F. Zimmermann, H. Jacob, K. Fuxe, D. Ganten, and M. Kaling. 1992. High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. *EMBO J.* 11:821-827.
62. Mullins, J. J., C. D. Sigmund, C. Kane-Haas, K. W. Gross, and R. A. McGowan. 1989. Expression of the DBA/2J Ren-2 gene in the adrenal gland of transgenic mice [published erratum appears in *EMBO J* 1990 Mar; 9(3):972]. *EMBO J.* 8:4065-4072.
63. Chai, S. Y. and C. I. Johnston. 1998. Tissue distribution of angiotensin-converting enzyme. In *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Laragh J.H. and Brenner B.M. editor. Raven Press, New York. 1683-1693.
64. Howard, T. E., S. Y. Shai, K. G. Langford, B. M. Martin, and K. E. Bernstein. 1990. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol. Cell. Biol.* 10:4294-4302.
65. Wei, L., F. Alhenc-Gelas, F. Soubrier, A. Michaud, P. Corvol, and E. Clauser. 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.
66. Skidgel, R. A. and E. G. Erdos. 1993. Angiotensin I-converting enzyme. In *Hypertension Primer*. Izzo J.L.Jr and Black H.R. editor. American Heart Association, Dallas. 12-13.
  67. Sealey, J. E. and J. H. Laragh. 1995. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Laragh J.H. and Brenner B.M. editor. Raven Press, New York. 1763-1796.
  68. Swanson, G. N., J. M. Hanesworth, M. F. Sardinia, J. K. Coleman, J. W. Wright, K. L. Hall, A. V. Miller-Wing, J. W. Stobb, V. I. Cook, E. C. Harding, and et al. 1992. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Reg. Peptides* 40:409-419.
  69. Johns, D. W., M. J. Peach, R. A. Gomez, T. Inagami, and R. M. Carey. 1990. Angiotensin II regulates renin gene expression. *Am. J. Physiol.* 259:F882-F887.
  70. Schunkert, H., J. R. Ingelfinger, A. T. Hirsch, Y. Pinto, W. J. Remme, H. Jacob, and V. J. Dzau. 1993. Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II. *Circ. Res.* 72:312-318.
  71. Danser, A. H. J., L. M. A. Sassen, P. J. J. Admiraal, F. H. M. Derkx, P. D. Verdouw, and M. A. D. H. Schalekamp. 1991. Regional production of angiotensins I and II: Contribution of vascular kidney-derived renin. *J. Hypertens.* 9:S234-S235.
  72. Danser, A. H., J. P. van Kats, P. J. Admiraal, F. H. Derkx, J. M. Lamers, P. D. Verdouw, P. R. Saxena, and M. A. Schalekamp. 1994. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 24:37-48.
  73. von Lutterotti, N., D. F. Catanzaro, J. E. Sealey, and J. H. Laragh. 1994. Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence. *Circulation* 89:458-470.
  74. Husain, A., P. DeSilva, R. C. Speth, and F. M. Bumpus. 1987. Regulation of angiotensin II in rat adrenal gland. *Circ. Res.* 60:640-648.
  75. Deschepper, C. F., D. A. Crumrine, and W. F. Ganong. 1986. Evidence that the gonadotrophs are the likely site of production of angiotensin II in the anterior pituitary of the rat. *Endocrinology* 119:36-43.

76. Seikaly, M. G., B. S. Arant, Jr., and F. D. Seney, Jr. 1990. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J. Clin. Invest.* 86:1352-1357.
77. Dell'Italia, L. J., Q. C. Meng, E. Balcells, C. C. Wei, R. Palmer, G. R. Hageman, J. Durand, G. H. Hankes, and S. Oparil. 1997. Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. *J. Clin. Invest.* 100:253-258.
78. Glorioso, N., S. A. Atlas, J. H. Laragh, R. Jewelewicz, and J. E. Sealey. 1986. Prorenin in high concentrations in human ovarian follicular fluid. *Science* 233:1422-1424.
79. Zimmerman, B. G. and E. W. Dunham. 1997. Tissue renin-angiotensin system: a site of drug action?. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:53-69.
80. Shier, D. N., E. Kusano, G. D. Stoner, R. Franco-Saenz, and P. J. Mulrow. 1989. Production of renin, angiotensin II, and aldosterone by adrenal explant cultures: response to potassium and converting enzyme inhibition. *Endocrinology* 125:486-491.
81. Campbell, D. J., A. Kladis, S. L. Skinner, and J. A. Whitworth. 1991. Characterization of angiotensin peptides in plasma of anephric man. *J. Hypertens.* 9:265-274.
82. Campbell, D. J., A. Kladis, and A.-M. Duncan. 1993. Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides. *Hypertension* 22:513-522.
83. Tokita, Y., H. Oda, R. Franco-Saenz, and P. J. Mulrow. 1995. Role of the tissue renin-angiotensin system in the action of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 208:391-396.
84. Sweet, C. S., P. T. Arbegast, S. L. Gaul, E. H. Blaine, and D. M. Gross. 1981. Relationship between angiotensin I blockade and antihypertensive properties of single doses of MK-421 and captopril in spontaneous and renal hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 76:167-176.
85. Waeber, B., H. R. Brunner, D. B. Brunner, A. L. Curtet, G. A. Turini, and H. Gavras. 1980. Discrepancy between antihypertensive effect and angiotensin converting enzyme inhibition by captopril. *Hypertension* 2:236-242.
86. Schunkert, H., V. J. Dzau, S. S. Tang, A. T. Hirsch, C. S. Apstein, and B. H. Lorell. 1990. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J. Clin. Invest.* 86:1913-1920.

87. Fisher, N. D., D. R. Allan, C. L. Gaboury, and N. K. Hollenberg. 1995. Intrarenal angiotensin II formation in humans. Evidence from renin inhibition. *Hypertension* 25:935-939.
88. Yamaguchi, T., R. Franco-Saenz, and P. J. Mulrow. 1992. Effect of angiotensin II on renin production by rat adrenal glomerulosa cells in culture. *Hypertension* 19:263-269.
89. Sealey, J. E. and S. Rubattu. 1989. Prorenin and renin as separate mediators of tissue and circulating systems. *Am. J. Hypertens.* 2:358-366.
90. Velletri, P. A., D. R. Aquilano, E. Bruckwick, C. H. Tsai-Morris, M. L. Dufau, and W. Lovenberg. 1985. Endocrinological control and cellular localization of rat testicular angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1). *Endocrinology* 116:2516-2522.
91. Mendelsohn, F. A., C. J. Lloyd, C. Kachel, and J. W. Funder. 1982. Glucocorticoid induction of angiotensin converting enzyme production from bovine endothelial cells in culture and rat lung in vivo. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol. Supp.* 7:57-62.
92. Esther, C. R., E. M. Marino, T. E. Howard, A. Machaud, P. Corvol, M. R. Capecchi, and K. E. Bernstein. 1997. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J. Clin. Invest.* 99:2375-2385.
93. Admiraal, P. J., F. H. Derkx, A. H. Danser, H. Pieterman, and M. A. Schalekamp. 1990. Metabolism and production of angiotensin I in different vascular beds in subjects with hypertension. *Hypertension* 15:44-55.
94. Stornetta, R. L., C. L. Hawelu-Johnson, P. G. Guyenet, and K. R. Lynch. 1988. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* 242:1444-1446.
95. Imboden, H., J. W. Harding, U. Hilgenfeldt, M. R. Celio, and D. Felix. 1987. Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain. *Brain Res.* 410:74-77.
96. Thomas, W. G., K. J. Greenland, T. A. Shinkel, and C. Sernia. 1992. Angiotensinogen is secreted by pure rat neuronal cell cultures. *Brain Res.* 588:191-200.
97. Ganong, W. F. 1995. Reproduction and the renin-angiotensin system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19:241-250.

98. Ganong, W. F. 1993. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front. Neuroendocrinol.* 14:233-249.
99. Hashimoto, H., T. Noto, and T. Nakajima. 1988. A study on the release mechanism of vasopressin and oxytocin. *Neuropeptides* 12:199-206.
100. Lang, R. E., W. Rascher, J. Heil, T. Unger, G. Wiedemann, and D. Ganten. 1981. Angiotensin stimulates oxytocin release. *Life Sci.* 29:1425-1428.
101. Naruse, K., Y. Takii, and T. Inagami. 1981. Immunohistochemical localization of renin in luteinizing hormone-producing cells of rat pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7579-7583.
102. Platia, M., K. Catt, and G. Aguilera. 1985. Localization of angiotensin converting enzyme in the rat gonadotrophs. *Fed. Proc.* 44:1358.
103. Deschepper, C. F. and W. F. Ganong. 1991. Distribution of angiotensinogen immunoreactivity in rat anterior pituitary glands. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 197:304-309.
104. Sernia, C., T. Zeng, D. Kerr, and B. Wyse. 1997. Novel perspectives on pituitary and brain angiotensinogen. *Front. Neuroendocrinol.* 18:174-208.
105. Deschepper, C. F., S. H. Mellon, F. Cumin, J. D. Baxter, and W. F. Ganong. 1986. Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7552-7556.
106. Hellmann, W., F. Suzuki, H. Ohkubo, S. Nakanishi, G. Ludwig, and D. Ganten. 1988. Angiotensinogen gene expression in extrahepatic rat tissues: application of a solution hybridization assay. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv. Pharmacol.* 338:327-331.
107. Saavedra, J. M. 1992. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr. Rev.* 13:329-380.
108. Chevillard, C. and J. M. Saavedra. 1982. High angiotensin-converting enzyme activity in the neurohypophysis of Brattleboro rats. *Science* 216:646-647.
109. Imboden, H., J. W. Harding, and D. Felix. 1989. Hypothalamic angiotensinergic fibre systems terminate in the neurohypophysis. *Neurosci. Lett.* 96:42-46.
110. Aguilera, G., C. L. Hyde, and K. J. Catt. 1982. Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology* 111:1045-1050.



111. Paglin, S., H. Stukenbrok, and J. D. Jamieson. 1984. Interaction of angiotensin II with dispersed cells from the anterior pituitary of the male rat. *Endocrinology* 114:2284-2292.
112. Saint-Andre, J. P., V. Rohmer, F. Alhenc-Gelas, J. Menard, J. C. Bigorgne, and P. Corvol. 1986. Presence of renin, angiotensinogen, and converting enzyme in human pituitary lactotroph cells and prolactin adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63:231-237.
113. Dzau, V. J., K. E. Ellison, T. Brody, J. Ingelfinger, and R. E. Pratt. 1987. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology* 120:2334-2338.
114. Strittmatter, S. M., E. B. De Souza, D. R. Lynch, and S. H. Snyder. 1986. Angiotensin-converting enzyme localized in the rat pituitary and adrenal glands by [<sup>3</sup>H]captopril autoradiography. *Endocrinology* 118:1690-1699.
115. Healy, D. P., A. R. Maciejewski, and M. P. Printz. 1985. Autoradiographic localization of [<sup>125</sup>I]-angiotensin II binding sites in the rat adrenal gland. *Endocrinology* 116:1221-1223.
116. Naruse, K., M. Murakoshi, R. Y. Osamura, M. Naruse, H. Toma, K. Watanabe, H. Demura, T. Inagami, and K. Shizume. 1985. Immunohistological evidence for renin in human endocrine tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61:172-177.
117. Sarzani, R., F. Fallo, P. Dessi-Fulgheri, M. Pistorello, A. Lanari, V. M. Paci, F. Mantero, and A. Rappelli. 1992. Local renin-angiotensin system in human adrenals and aldosteronomas. *Hypertension* 19:702-707.
118. Doi, Y., K. Atarashi, R. Franco-Saenz, and P. J. Mulrow. 1984. Effect of changes in sodium or potassium balance, and nephrectomy, on adrenal renin and aldosterone concentrations. *Hypertension* 6:1124-1129.
119. Nakamaru, M., K. S. Misono, M. Naruse, R. J. Workman, and T. Inagami. 1985. A role for the adrenal renin-angiotensin system in the regulation of potassium-stimulated aldosterone production. *Endocrinology* 117:1772-1778.
120. Morgan, T., J. Davis, and A. Gillies. 1982. Release of renin into the circulation. *Kidney Int.* 12:S63-S66.
121. Celio, M. R. and T. Inagami. 1981. Angiotensin II immunoreactivity coexists with renin in the juxtaglomerular granular cells of the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3897-3900.

122. Hunt, M. K., S. P. Ramos, K. M. Geary, L. L. Norling, M. J. Peach, R. A. Gomez, and R. M. Carey. 1992. Colocalization and release of angiotensin and renin in renal cortical cells. *Am. J. Physiol.* 263:F363-F373.
123. Mercure, C., D. Ramla, R. Garcia, G. Thibault, C. F. Deschepper, and T. L. Reudelhuber. 1998. Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS Lett.* 422:395-399.
124. Braam, B., K. D. Mitchell, J. Fox, and L. G. Navar. 1993. Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. *Am. J. Physiol.* 264:F891-F898.
125. Jung, F. F., B. Bouyounes, R. Barrio, S. S. Tang, D. Diamant, and J. R. Ingelfinger. 1993. Angiotensin converting enzyme in renal ontogeny: hypothesis for multiple roles. *Pediat. Nephrol.* 7:834-840.
126. Spence, S. G., M. A. Cukierski, J. M. Manson, R. T. Robertson, and R. S. Eydelloth. 1995. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of the AT1-selective angiotensin II receptor antagonist losartan in rats. *Teratology* 51:383-397.
127. Tufro-McReddie, A., L. M. Romano, J. M. Harris, L. Ferder, and R. A. Gomez. 1995. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am. J. Physiol.* 269:F110-F1155.
128. Pryde, P. G., A. B. Sedman, C. E. Nugent, and M. Barr. 1996. Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3:1575-1582.
129. Vinson, G. P., E. Saridogan, J. R. Puddefoot, and O. Djahanbakhch. 1997. Tissue renin-angiotensin systems and reproduction. *Hum. Reprod.* 12:651-662.
130. Pandey, K. N., M. Ascoli, and T. Inagami. 1985. Induction of renin activity by gonadotropic hormones in cultured Leydig tumor cells. *Endocrinology* 117:2120-2126.
131. Pandey, K. N. and T. Inagami. 1986. Regulation of renin angiotensins by gonadotropic hormones in cultured murine Leydig tumor cells. Release of angiotensin but not renin. *J. Biol. Chem.* 261:3934-3938.
132. Millan, M. A. and G. Aguilera. 1988. Angiotensin II receptors in testes. *Endocrinology* 122:1984-1990.
133. Vinson, G. P., J. R. Puddefoot, M. M. Ho, S. Barker, J. Mehta, E. Saridogan, and O. Djahanbakhch. 1995. Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J. Endocrinol.* 144:369-378.

134. Grove, K. L. and R. C. Speth. 1989. Rat epididymis contains functional angiotensin II receptors. *Endocrinology* 125:223-230.
135. Sibony, M., J. M. Gasc, F. Soubrier, F. Alhenc-Gelas, and P. Corvol. 1993. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 21:827-835.
136. Sealey, J. E., M. Goldstein, T. Pitarresi, T. T. Kudlak, N. Glorioso, S. A. Fiamengo, and J. H. Laragh. 1988. Prorenin secretion from human testis: no evidence for secretion of active renin or angiotensinogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66:974-978.
137. Mukhopadhyay, A. K., J. Cobilanschi, W. Schulze, B. Brunswig-Spickenheier, and F. A. Leidenberger. 1995. Human seminal fluid contains significant quantities of prorenin: its correlation with the sperm density. *Mol. Cell. Endocrinol.* 109:219-224.
138. Jaiswal, A. K., J. N. Panda, M. V. Kumar, and P. Joshi. 1985. Androgen dependence of testicular and epididymal angiotensin converting enzyme. *Andrologia* 17:92-97.
139. Sealey, J. E., S. A. Atlas, N. Glorioso, H. Manapat, and J. H. Laragh. 1985. Cyclical secretion of prorenin during the menstrual cycle: synchronization with luteinizing hormone and progesterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8705-8709.
140. Sealey, J. E., I. Cholst, N. Glorioso, C. Troffa, I. D. Weintraub, G. James, and J. H. Laragh. 1987. Sequential changes in plasma luteinizing hormone and plasma prorenin during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65:1-5.
141. Sealey, J. E., N. Glorioso, A. Toth, S. A. Atlas, and J. H. Laragh. 1985. Stimulation of plasma prorenin by gonadotropic hormones. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 153:596-597.
142. Sealey, J. E., D. McCord, P. A. Taufield, K. A. Ales, M. L. Druzin, S. A. Atlas, and J. H. Laragh. 1985. Plasma prorenin in first-trimester pregnancy: relationship to changes in human chorionic gonadotropin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 153:514-519.
143. Li, X. F. and A. Ahmed. 1997. Compartmentalization and cyclic variation of immunoreactivity of renin and angiotensin converting enzyme in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum. Reprod.* 12:2804-2809.
144. Timmermans, P. B., P. C. Wong, A. T. Chiu, W. F. Herblin, P. Benfield, D. J. Carini, R. J. Lee, R. R. Wexler, J. A. Saye, and R. D. Smith. 1993. Angiotensin

- II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45:205-251.
145. Itskovitz, J., S. Rubattu, J. Levron, and J. E. Sealey. 1992. Highest concentrations of prorenin and human chorionic gonadotropin in gestational sacs during early human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75:906-910.
  146. Skinner, S. L., E. J. Crán, R. Gibson, R. Taylor, W. A. Walters, and K. J. Catt. 1975. Angiotensins I and II, active and inactive renin, renin substrate, renin activity, and angiotensinase in human liquor amnii and plasma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121:626-630.
  147. Poisner, A. M., G. W. Wood, R. Poisner, and T. Inagami. 1982. Renin and inactive renin in human amnion at term pregnancy. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 169:4-6.
  148. Skinner, S. L., E. R. Lumbers, and E. M. Symonds. 1968. Renin concentration in human fetal and maternal tissues. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 101:529-533.
  149. Poisner, A. M., G. W. Wood, R. Poisner, and T. Inagami. 1981. Localization of renin in trophoblasts in human chorion laeve at term pregnancy. *Endocrinology* 109:1150-1155.
  150. Shaw, K. J., Y. S. Do, S. Kjos, P. W. Anderson, T. Shinagawa, L. Dubeau, and W. A. Hsueh. 1989. Human decidua is a major source of renin. *J. Clin. Invest.* 83:2085-2092.
  151. Naftilan, A. J., W. M. Zuo, J. Inglefinger, T. J. Ryan, Jr., R. E. Pratt, and V. J. Dzau. 1991. Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall [published erratum appears in *J Clin Invest* 1992 May;89(5):1695]. *J. Clin. Invest.* 87:1300-1311.
  152. Cassis, L. A., J. Saye, and M. J. Peach. 1988. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 11:591-596.
  153. Rogerson, F. M., S. Y. Chai, I. Schlawe, W. K. Murray, P. D. Marley, and F. A. Mendelsohn. 1992. Presence of angiotensin converting enzyme in the adventitia of large blood vessels. *J. Hypertens.* 10:615-620.
  154. Phillips, M. I., E. A. Speakman, and B. Kimura. 1993. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Reg. Peptides* 43:1-20.
  155. de Gasparo, M., S. Bottari, and N. R. Levens. 1995. Characteristics of angiotensin II receptors and their role in cell and organ physiology. In

Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Laragh J.H. and Brenner B.M. editor. Raven Press, New York. 1695-1720.

156. Allen, A. M., H. Yamada, and F. A. Mendelsohn. 1990. In vitro autoradiographic localization of binding to angiotensin receptors in the rat heart. *Int. J. Cardiol.* 28:25-33.
157. Skeggs, L. T., Jr. and F. E. Dorer. 1989. Incorporation of labeled renin into the tissues of the rabbit. *Am. J. Hypertens.* 2:768-779.
158. Hiruma, M., S. Kim, F. Ikemoto, K. Murakami, and K. Yamamoto. 1988. Fate of recombinant human renin administered exogenously to anesthetized monkeys. *Hypertension* 12:317-323.
159. Lindpaintner, K. and D. Ganten. 1991. The cardiac renin-angiotensin system: a synopsis of current experimental and clinical data. *Acta Cardiologica* 46:385-397.
160. Drexler, H., K. Lindpaintner, W. Lu, B. Schieffer, and D. Ganten. 1989. Transient increase in the expression of cardiac angiotensinogen in a rat model of myocardial infarction and failure. *Circulation* 80(suppl II):II-459.
161. Linz, W., B. A. Scholkens, and D. Ganten. 1989. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin. Exper. Hypertens. - Part A, Theory & Practice* 11:1325-1350.
162. Stock, P., L. Liefeldt, M. Paul, and D. Ganten. 1995. Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology* 86:2-8.
163. Wagner, J., A. H. Jan Danser, F. H. Derkx, T. V. de Jong, M. Paul, J. J. Mullins, M. A. Schalekamp, and D. Ganten. 1996. Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br. J. Ophthalmol.* 80:159-163.
164. Danser, A. H., M. A. van den Dorpel, J. Deinum, F. H. Derkx, A. A. Franken, E. Peperkamp, P. T. de Jong, and M. A. Schalekamp. 1989. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68:160-167.
165. Weinreb, R. N., R. Sandman, M. I. Ryder, and T. R. Friberg. 1985. Angiotensin-converting enzyme activity in human aqueous humor. *Arch. Ophthalmol.* 103:34-36.

166. Fernandez, L. A., J. Twickler, and A. Mead. 1985. Neovascularization produced by angiotensin II. *J. Lab. Clin. Med.* 105:141-145.
167. Sealey, J. E., C. Moon, J. H. Laragh, and S. A. Atlas. 1977. Plasma prorenin in normal, hypertensive, and anephric subjects and its effect on renin measurements. *Circ. Res.* 40:I41-I45.
168. Hosoi, M., S. Kim, T. Tabata, H. Nishitani, Y. Nishizawa, H. Morii, K. Murakami, and K. Yamamoto. 1992. Evidence for the presence of differently glycosylated forms of prorenin in the plasma of anephric man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74:680-684.
169. Hatae, T., E. Takimoto, K. Murakami, and A. Fukamizu. 1994. Comparative studies on species-specific reactivity between renin and angiotensinogen. *Mol. Cell. Biochem.* 131:43-47.
170. Sharp, M. G., D. Fettes, G. Brooker, A. F. Clark, J. Peters, S. Fleming, and J. J. Mullins. 1996. Targeted inactivation of the Ren-2 gene in mice. *Hypertension* 28:1126-1131.
171. Lira, S. A., E. B. Crenshaw, 3d, C. K. Glass, L. W. Swanson, and M. G. Rosenfeld. 1988. Identification of rat growth hormone genomic sequences targeting pituitary expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4755-4759.
172. Hsueh, W. A. and J. D. Baxter. 1991. Human prorenin. *Hypertension* 17:469-479.
173. Cumin, F., G. Evin, J. A. Fehrentz, R. Seyer, B. Castro, J. Menard, and P. Corvol. 1985. Inhibition of human renin by synthetic peptides derived from its prosegment. *J. Biol. Chem.* 260:9154-9157.
174. Derkx, F. H., M. P. Schalekamp, and M. A. Schalekamp. 1987. Two-step prorenin-renin conversion. Isolation of an intermediary form of activated prorenin. *J. Biol. Chem.* 262:2472-2477.
175. Heinrikson, R. L., J. Hui, H. Zürcher-Neely, and R. A. Poorman. 1989. A structural model to explain the partial catalytic activity of human prorenin. *Am. J. Hypertens.* 2:367-380.
176. Pitarresi, T. M., S. Rubattu, R. Heinrikson, and J. E. Sealey. 1992. Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. *J. Biol. Chem.* 267:11753-11759.

177. Lenz, T., J. E. Sealey, R. W. Lappe, C. Carilli, G. T. Oshiro, J. D. Baxter, and J. H. Laragh. 1990. Infusion of recombinant human prorenin into rhesus monkeys. Effects on hemodynamics, renin-angiotensin-aldosterone axis and plasma testosterone. *Am. J. Hypertens.* 3:257-261.
178. Lenz, T., J. E. Sealey, T. Maack, G. D. James, R. L. Heinrikson, D. Marion, and J. H. Laragh. 1991. Half-life, hemodynamic, renal, and hormonal effects of prorenin in cynomolgus monkeys. *Am. J. Physiol.* 260:R804-R810.
179. Sealey, J. E., N. Glorioso, J. Itskovitz, S. A. Atlas, T. M. Pitarresi, J. J. Preibisz, C. Troffa, and J. H. Laragh. 1987. Ovarian prorenin. *Clin. Exper. Hypertens. Theory & Practice* 9:1435-1454.
180. Derkx, F. H., J. Deinum, M. Lipovski, M. Verhaar, W. Fischli, and M. A. Schalekamp. 1992. Nonproteolytic "activation" of prorenin by active site-directed renin inhibitors as demonstrated by renin-specific monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 267:22837-22842.
181. Dunn, B. 1997. Splitting image. *Nature Struct. Biol.* 4:969-972.
182. Mullins, J. J., J. Peters, and D. Ganten. 1990. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344:541-544.
183. Bachmann, S., J. Peters, E. Engler, D. Ganten, and J. Mullins. 1992. Transgenic rats carrying the mouse renin gene--Morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int.* 41:24-36.
184. Peters, J., K. F. Hilgers, C. Maser-Gluth, and R. Kreutz. 1996. Role of the circulating renin-angiotensin system in the pathogenesis of hypertension in transgenic rats. TGR(mREN2)27. *Clin. Exp. Hypertens.* 18:933-948.
185. Véniant, M., J. Ménard, P. Bruneval, S. Morley, M. Gonzales, and J. Mullins. 1997. Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *J. Clin. Invest.* 98:1966-1970.
186. Sealey, J. E. 1995. Evidence for cardiovascular effects of prorenin. *J. Hum. Hypertens.* 9:381-384.
187. Watanabe, T., T. Nakagawa, J. Ikemizu, M. Nagahama, K. Murakami, and K. Nakayama. 1992. Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 267:8270-8274.