

Université de Montréal

Rôle de l'angiotensine II dans la libération des catécholamines par la médullosurrénale chez le chien anesthésié

par

Daniel Martineau

Faculté de pharmacie

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

mai, 2000



QV
705
U58
2000
v. 013

©Daniel Martineau, 2000
Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Rôle de l'angiotensine II dans la libération des catécholamines par la médullo-surrénale chez le chien anesthésié

Présentée par:

Daniel Martineau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

| | | |
|-------------------------|----------------------|-------|
| Directeurs: | Nobuharu Yamaguchi | _____ |
| | Richard Briand | _____ |
| Président rapporteur: | Daniel Lamontagne | _____ |
| Membre interne: | Jacques de Champlain | _____ |
| Membre externe: | Guy Drolet | _____ |
| Représentant de la FES: | Gaétan Thibault | _____ |

Thèse acceptée le: _____

I. SOMMAIRE

Objectifs: Identifier le rôle des récepteurs de l'angiotensine II (AT₁ et AT₂) et des canaux calciques de type-L dans la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales *in vivo*.

Théories et hypothèses: Selon plusieurs études réalisées en laboratoire, la sécrétion basale des catécholamines médullaires, en réponse à l'angiotensine II, est principalement contrôlée par la stimulation des récepteurs AT₁. Cette sécrétion des catécholamines n'est pas complètement inhibée en présence d'un antagoniste des récepteurs AT₁, ce qui suggère l'implication de d'autres voies d'activation, soit les récepteurs AT₂, soit les canaux calciques de type-L. De telles études n'ont jamais été réalisées à partir d'un modèle animal *in vivo*. Nous avons donc tenté de vérifier ces hypothèses dans les trois études présentées ici, dans lesquelles nous avons utilisé un antagoniste sélectif des récepteurs AT₁ (BMS 186295), deux antagonistes sélectifs des récepteurs AT₂, [le PD 123319 et le CGP 42112], et un bloqueur des canaux calciques de type-L, [la nifédipine].

Méthodes: Nous avons travaillé chez le chien anesthésié, ce qui nous a permis d'administrer les différents agents pharmacologiques directement dans la glande surrénale tout en minimisant les effets systémiques. Les concentrations plasmatiques des catécholamines étaient mesurées à partir d'échantillons prélevés de la veine surrénale et l'aorte. Le dosage des catécholamines a été réalisé par la technique de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) couplé à un détecteur électrochimique.

Résultats: Nos résultats confirment que la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales, en réponse à l'angiotensine II, est principalement contrôlée par la stimulation des récepteurs AT₁. En effet, le BMS 186295 a inhibé significativement la sécrétion de catécholamines induite par l'administration de l'angiotensine II. Le PD 123319 et le CGP 42112 ont également inhibé, la libération des catécholamines en réponse à l'angiotensine II, suggérant cette fois-ci une participation des récepteurs AT₂ dans la sécrétion des catécholamines. Enfin, nous avons observé que la nifédipine inhibe que partiellement la réponse médullaire à l'angiotensine II. Cependant, celle-ci a inhibé

complètement la libération des catécholamines induite par l'administration de Bay K 8644, un activateur sélectif du canal calcique de type-L. Nos résultats ont indiqué que la combinaison du BMS 186295 et du PD 123319 n'a pas davantage inhibé cette sécrétion lorsque comparé aux réponses obtenues avec le BMS 186295 ou le PD 123319 administré en monothérapie. De plus, nous avons démontré que la nifédipine combinée à ces deux antagonistes, diminuent significativement la sécrétion des catécholamines lorsque comparée à celle obtenue avec la combinaison des deux antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II.

Conclusions: Nos résultats suggèrent que les récepteurs à l'angiotensine II (AT_1 et AT_2) peuvent moduler la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales chez le chien anesthésié. Les canaux calciques de type-L, sensibles à la dihydropyridine, semblent également impliqués de façon directe et indirecte dans la sécrétion des catécholamines médullaires induite par l'angiotensine II. Puisque les deux mécanismes contrôlés par le récepteur AT_1 et le récepteur AT_2 sont fonctionnellement impliqués de façon similaire dans la sécrétion des catécholamines induite par l'angiotensine II, il semblerait que la stimulation simultanée de ces récepteurs soit nécessaire pour permettre cette sécrétion chez le chien anesthésié.

II. TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----|
| I. SOMMAIRE | iii |
| II. TABLE DES MATIÈRES | v |
| III. LISTE DES TABLEAUX | xi |
| IV. LISTE DES FIGURES | xii |
| V. LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS | xv |
| VI. DÉDICACE | xix |
| VII. REMERCIEMENTS | xx |
| VIII. AVANT-PROPOS | xxi |

PREMIÈRE PARTIE - INTRODUCTION

| | |
|---|----|
| CHAPITRE 1 - LE SYSTÈME NERVEUX AUTONOME | 2 |
| 1.1- ORGANISATION ANATOMIQUE | 4 |
| 1.1.1- Système nerveux parasympathique | 4 |
| 1.1.2- Système nerveux sympathique | 6 |
| 1.2- RÔLES | 9 |
| 1.2.1- Système nerveux parasympathique | 9 |
| 1.2.2- Système nerveux sympathique | 9 |
| 1.3- PHYSIOLOGIE | 10 |
| 1.3.1- Système nerveux parasympathique | 12 |
| 1.3.1.1- Transmission cholinergique | 12 |
| Synthèse et stockage | 12 |
| Libération | 14 |
| Dégradation | 15 |
| 1.3.1.2- Récepteurs cholinergiques | 15 |
| Récepteurs nicotiniques | 15 |
| Récepteurs muscariniques | 16 |
| 1.3.2- Système nerveux sympathique | 16 |
| 1.3.2.1- Transmission adrénergique | 16 |
| Synthèse et stockage | 18 |
| Libération | 21 |
| Recapture et catabolisme | 21 |
| 1.3.2.2- Récepteurs adrénergiques | 24 |
| Récepteurs α -adrénergiques | 27 |
| Récepteurs β -adrénergiques | 28 |

| | |
|---|--------|
| CHAPITRE 2 - LA GLANDE SURRÉNALE | 30 |
| 2.1- ORGANISATION ANATOMIQUE | 31 |
| 2.1.1- Médullo-surrénale | 31 |
| Cellules chromaffines | 32 |
| Innervation | 33 |
| 2.1.2- Cortex surrénalien | 35 |
| Cellules corticosurrénales | 36 |
| Innervation | 38 |
| 2.2- ALIMENTATION SANGUINE INTRAGLANDULAIRE | 38 |
| 2.2.1- Interaction hormonale intraglandulaire | 39 |
| 2.3- RÉGULATION DES SÉCRÉTIONS HORMONALES DE LA GLANDE | 40 |
| 2.3.1- Régulation de la sécrétion des catécholamines | 40 |
| Modulation transneuronale | 40 |
| Automodulation | 43 |
| Modulation hormonale | 44 |
| 2.3.2- Régulation de la sécrétion de minéralocorticoïdes | 45 |
| Biosynthèse de l'aldostérone | 45 |
| Modulation hormonale de la biosynthèse et de la sécrétion de l'aldostérone | 45 |
| 2.4- EXOCYTOSE DES CATÉCHOLAMINES MÉDULLAIRES | 47 |
| 2.4.1- Réseau cytosquelettique | 51 |
| 2.4.2- Mouvement des granules sécréteurs | 51 |
| 2.4.3- Protéines cytoplasmiques | 52 |
| 2.5- IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUES DES CATÉCHOLAMINES CIRCULANTES | 53 |
| 2.6- MÉTABOLISME DES CATÉCHOLAMINES CIRCULANTES | 55 |
| CHAPITRE 3 - LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTÉRONE | 57 |
| 3.1- LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE PLASMATIQUE | 58 |
| 3.1.1- Biosynthèse de l'angiotensine | 58 |
| 3.2- LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE TISSULAIRE | 59 |
| 3.3- EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'ANGIOTENSINE II | 61 |
| 3.3.1- Muscle lisse vasculaire et le coeur | 61 |
| 3.3.2- Rein et tractus gastro-intestinal | 63 |
| 3.3.3- Le système nerveux autonome | 64 |
| 3.3.4- Le cerveau | 64 |
| 3.3.5- La glande surrénale | 65 |
| La médullo-surrénale | 65 |

| | |
|---|----|
| Le cortex surrénalien | 65 |
| Interaction médullo-cortex | 66 |
| 3.4- ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DES AUTRES ANGIOTENSINES | 66 |
| 3.4.1- Angiotensine I | 66 |
| 3.4.2- Angiotensine III | 67 |
| 3.4.3- Angiotensine (1-7) | 68 |
| 3.4.4- Angiotensine IV | 69 |
| 3.5- LES RÉCEPTEURS À L'ANGIOTENSINE | 70 |
| 3.5.1- Récepteurs AT ₁ | 71 |
| Rôles physiologiques | 71 |
| Voies de signalisations | 72 |
| 3.5.2- Récepteurs AT ₂ | 74 |
| Rôles physiologiques | 74 |
| Voies de signalisations | 75 |
| 3.5.3- Récepteurs AT ₃ | 75 |
| Rôles et voies de signalisations | 76 |
| 3.5.4- Récepteurs AT ₄ | 76 |
| Rôles physiologiques | 76 |
| Voies de signalisations | 77 |
| 3.6- TACHYPHYLAXIE À L'ANGIOTENSINE | 77 |
| 3.7- HYPOTHÈSE ET OBJECTIF GÉNÉRAL | 78 |
| 3.7.1- Connaissances théoriques dans la médullo-surrénale | 78 |
| Rôle des récepteurs AT ₁ | 78 |
| Rôle des récepteurs AT ₂ | 79 |
| Implication fonctionnelle des canaux calciques | 79 |
| 3.7.2- Problématiques | 80 |
| 3.7.3- Hypothèse et objectifs généraux | 80 |

DEUXIÈME PARTIE - MÉTHODOLOGIE

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE 4 - CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES | 83 |
| 4.1- MODÈLE EXPÉRIMENTAL | 84 |
| 4.2- ANESTHÉSIE ET PROCÉDURE CHIRURGICALE | 85 |
| 4.3- PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL | 86 |

TROISIÈME PARTIE - RÉSULTATS

| | | |
|---------------------|--|------------|
| CHAPITRE 5 - | INHIBITION BY BMS 186295, A SELECTIVE NONPEPTIDE AT₁ ANTAGONIST, OF ADRENAL CATECHOLAMINE RELEASE INDUCED BY ANGIOTENSIN II IN THE DOG IN VIVO | 89 |
| 5.1- | ABSTRACT | 90 |
| 5.2- | INTRODUCTION | 91 |
| 5.3- | METHODS | 92 |
| | 5.3.1- Preparation of animal | 92 |
| | 5.3.2- Measured parameters | 93 |
| | 5.3.3- experimental protocol | 94 |
| | 5.3.4- Statistical analyses | 96 |
| 5.4- | RESULTS | 96 |
| | 5.4.1- Effect of angiotensin II on basal output of adrenal catecholamines | 96 |
| | 5.4.2- Effect of BMS 186295 on angiotensin II-induced catecholamine release | 97 |
| 5.5- | DISCUSSION | 98 |
| 5.6- | ACKNOWLEDGEMENTS | 102 |
| 5.7- | REFERENCES | 103 |
| | | |
| CHAPITRE 6- | FUNCTIONAL INVOLVEMENT OF ANGIOTENSIN AT₂ RECEPTOR IN ADRENAL CATECHOLAMINE SECRETION IN VIVO | 111 |
| 6.1- | ABSTRACT | 112 |
| 6.2- | INTRODUCTION | 113 |
| 6.3- | MATERIALS AND METHODS | 114 |
| | 6.3.1- Preparation of animals | 114 |
| | 6.3.2- Measured parameters | 116 |
| | 6.3.3- Experimental protocols | 116 |
| | 6.3.4- Statistical analyses | 119 |
| 6.4- | RESULTS | 119 |
| | 6.4.1- Effects of Ang-II and CGP 42112 on the basal catecholamine secretion | 119 |

| | |
|---|-----|
| 6.4.2- Effects of PD 123319 on Ang-II-induced catecholamine release | 120 |
| 6.4.3- Effects of CGP 42112 on Ang-II-induced catecholamine release | 120 |
| 6.5- DISCUSSION | 121 |
| 6.6- ACKNOWLEDGEMENTS | 126 |
| 6.7- REFERENCES | 127 |

| | | |
|---|--|------------|
| CHAPITRE 7 - | FUNCTIONAL EVIDENCE FOR L-TYPE Ca²⁺ CHANNELS | |
| | CONTROLLING ANG II-INDUCED ADRENAL CATECHOLAMINE | |
| | RELEASE IN VIVO | 139 |
| 7.1- SUMMARY | | 140 |
| 7.2- INTRODUCTION | | 141 |
| 7.3- METHODS | | 142 |
| 7.3.1- Surgical preparation | | 142 |
| 7.3.2- Measured parameters | | 143 |
| 7.3.3- Experimental protocol | | 144 |
| 7.3.4- Statistical analyses | | 146 |
| 7.4- RESULTS | | 146 |
| 7.4.1- Effect of BAY K 8644 on adrenal catecholamine secretion | | 146 |
| 7.4.2- Effect of nifedipine and ω -conotoxin on angiotensin II-induced catecholamine secretion | | 147 |
| 7.5- DISCUSSION | | 148 |
| 7.6- ACKNOWLEDGEMENTS | | 154 |
| 7.7- REFERENCES | | 155 |

QUATRIÈME PARTIE - DISCUSSION GÉNÉRALE

| | | |
|---------------------|---|------------|
| CHAPITRE 8 - | MÉCANISMES RÉGULATEURS DE LA SÉCRÉTION DES | |
| | CATÉCHOLAMINES DANS LA GLANDE SURRÉNALE: RÔLE DE | |
| | L'ANG II | 165 |

CINQUIÈME PARTIE - CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET RÉFÉRENCES

CONCLUSIONS 175
RÉFÉRENCES 176

III. LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1. Caractéristiques des sous-types de récepteurs cholinergiques | 17 |
| Tableau 2. Caractéristiques des sous-types de récepteurs adrénnergiques | 25 |
| Tableau 3. Couplage des récepteurs adrénnergiques aux protéines G ainsi que leurs effecteurs et seconds messagers. | 26 |
| Tableau 4. L'effet de différentes substances endogènes sur la sécrétion basale des catécholamines, sur l'entrée du Ca^{2+} , sur la production d' IP_3 , et sur la $[Ca^{2+}]_i$ dans la cellule chromaffine. . . . | 41 |
| Tableau 5. Mécanismes de transduction de la sécrétion d'aldostérone selon différents sécrétagogues. | 50 |
| Tableau 6. Basal values for plasma catecholamine concentrations and cardiovascular parameters observed in the first series of experiments | 137 |
| Tableau 7. Basal values for plasma catecholamine concentrations and cardiovascular parameters observed in the second series of experiments | 138 |

IV. LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Fig. 1. Structure du système nerveux autonome | 5 |
| Fig. 2. Représentation schématique de ganglions et rameaux communicants du système nerveux sympathique | 8 |
| Fig. 3. Biosynthèse et libération de l'acétylcholine | 13 |
| Fig. 4. Synthèse et libération de la norépinéphrine | 19 |
| Fig. 5. Biosynthèse de la norépinéphrine et de l'épinéphrine dans la médullo-surrénale. | 20 |
| Fig. 6. Métabolisme des catécholamines par la COMT et la MAO | 23 |
| Fig. 7. Représentation schématique du réseau vasculaire de la glande surrénale chez l'homme. | 37 |
| Fig. 8. Principales voies de biosynthèse de l'aldostérone | 46 |
| Fig. 9. Représentation schématique des différents mécanismes régulateurs de la sécrétion d'aldostérone | 48 |
| Fig.10. Principaux mécanismes régulateurs de la sécrétion d'aldostérone | 49 |
| Fig.11. Mécanisme proposé de l'action de l'annexine II (Calpactine) dans l'exocytose des granules des cellules chromaffines | 54 |
| Fig.12. Biosynthèse et dégradation de l'angiotensine II | 60 |
| Fig.13. Représentation schématique du système rénine-angiotensine plasmatique et tissulaire | 62 |
| Fig.14. Mécanisme du couplage récepteur AT_1 - effecteur | 73 |
| Fig.15. Effects of various doses of A-II locally infused into the left adrenolumbar artery on the basal output of adrenal epinephrine (EP) and norepinephrine (NE) | 107 |
| Fig.16. Effects on the basal output of adrenal epinephrine (EP) and norepinephrine (NE) of repetitive administrations of A-II (0.1 μ g/mL) into the left adrenolumbar artery in control dogs receiving | |

| | |
|--|-----|
| the vehicle | 108 |
| Fig. 17. Effects of various doses of BMS 186295 on adrenal epinephrine (EP) and norepinephrine (NE) release induced by repetitive administrations of A-II (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) into the left adrenolumbar artery | 109 |
| Fig. 18. Effects of BMS 186295 on the net increases in epinephrine (EP) and norepinephrine (NE) output induced by repetitive administrations of A-II (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 110 |
| Fig. 19. A) Effects on epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of Ang-II (0.05 μg , 0.1 μM) locally administered to the left adrenal gland in dogs receiving the vehicle B) Effects of various doses of CGP 42112 locally administered to the left adrenal gland on the basal output of adrenal epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) | 132 |
| Fig. 20. Effects on epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of Ang-II (0.05 μg , 0.1 μM) in three separate groups of dogs receiving A) 0.085 μg (0.23 μM , n = 5), B) 0.85 μg (2.3 μM , n = 5) and C) 8.5 μg (23 μM , n = 5) of PD 123319 | 133 |
| Fig. 21. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output induced by Ang-II (0.05 μg , 0.1 μM) in four separate groups of dogs receiving the vehicle (VH, n = 6), 0.05 μg (0.23 μM , PD0.085, n = 5), 0.85 μg (2.3 μM , PD0.85, n = 5) and 8.5 μg (23 μM , PD8.5, n = 6) of PD 123319 | 134 |
| Fig. 22. Effects on epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of Ang-II (0.05 μg , 0.1 μM) in two separate groups of dogs receiving A) 0.5 μg (1.0 μM , n = 5) and B) 5 μg (10 μM , n = 5) of CGP 42112 | 135 |
| Fig. 23. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output induced by Ang-II (0.05 μg , 0.1 μM) in three separate groups of dogs receiving the vehicle (VH, | |

| | |
|---|-----|
| n = 6), 0.5 μ g (1.0 μ M, CGP0.5, n = 5) and 5 μ g (10 μ M, CGP5.0, n = 5) of CGP 42112 (CGP) | 136 |
| Fig.24. Effects on epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of repetitive administrations of BAY-K 8644 (0.5 μ g) locally infused into the left adrenolumbar artery with an interval of 15 min | 160 |
| Fig.25. Effects of various doses of nifedipine on the increases in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output induced by repetitive administrations of BAY-K 8644 (0.5 μ g) into the left adrenolumbar artery | 161 |
| Fig.26. Effects on adrenal epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of angiotensin II (0.05 μ g) locally administered into the left adrenolumbar artery in dogs receiving the vehicle (n = 8, column A), nifedipine (50 μ g, n = 8, column B), and nifedipine combined with ω -conotoxin (25 μ g, n = 5, column C) | 162 |
| Fig.27. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output induced by angiotensin II in the presence of vehicle (VH), nifedipine (NIF), and nifedipine combined with ω -conotoxin (NIF + ω CTX) | 163 |
| Fig.28. La s cretion d' pin phrine (EPI) et de la norépinéphrine (NE) est induite par l'ANG II en présence du véhicule (VH), du BMS 186295 (BMS: 23 μ M), du PD 123319 (PD: 23 μ M), et de la combinaison du BMS et du PD (BMS + PD: 23 μ M) | 169 |
| Fig.29. La s cretion d'épinéphrine (EPI) et de la norépinéphrine (NE) induite par l'ANG II est inhibé par le BMS 186295 (BMS: 23 μ M), le PD 123319 (PD: 23 μ M), le BMS et le PD combiné (BMS + PD: 23 μ M) et la nifédipine combiné à BMS et au PD (BMS + PD + NIF) .. | 171 |
| Fig. 30. Résumé des trois mécanismes régulateurs de l'ANG II dans la réponse médullaire ... | 173 |

V. LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Dans la liste qui suit, la signification anglophone des abréviations est donnée en italique et la version française est placée entre parenthèses.

| | |
|-------------------------------|--|
| AA | Acide arachidonique |
| AC | Adényl cyclase |
| AcCoA | Acétylcoenzyme A |
| ACh | Acétylcholine |
| AChE | Acétylcholinestérase |
| AMP _c | Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique |
| ANG II, AII | Angiotensine II |
| ANP | <i>Atrial natriuretic peptide</i> (peptide natriurétique de l'oreillette) |
| ATD | Androsténédione |
| ATP | Adénosine 5'-triphosphate |
| Bay K 8644 | Activateur des canaux calciques de type-L |
| BMS 186295 | Antagoniste sélectif des récepteurs AT ₁ de l'angiotensine II |
| Ca ²⁺ _i | Calcium intracellulaire |
| CAGE | <i>Chymostatine-generating-enzyme</i> (enzyme qui génère l'angiotensine par la chymostatine) |
| CAs | Catécholamines |
| CGRP | <i>Calcitonin-gene-related-peptide</i> (peptide apparenté au gène de la calcitonine) |
| ChAT | Choline-acétyltransférase |
| CICR | <i>Calcium-induced-calcium-release</i> (libération de calcium induite par le calcium) |
| Cl ⁻ | Chlore |
| CO | Cyclooxygénase |
| COMT | Catéchol-O-méthyltransférase |
| CRF | <i>Corticotropin-releasing factor</i> (Facteur qui libère la corticotropine) |

| | |
|---------------------------------|--|
| DAG | Diacylglycérol |
| DOC | Déoxycorticostérone |
| d-tubo | d-Tubocurarine |
| D β H | Dopamine β éta-hydroxylase |
| DHEA | Déhydroépiandrostérone |
| DMPP | 1,1-diméthyl-4-phénylpipérazinium |
| DOPGAL | 3,4-dihydroxyphénylglycoaldéhyde |
| ECA | Enzyme de conversion de l'angiotensine |
| EPI | Epinéphrine |
| EPSP | <i>Excitatory postsynaptic slow potential</i> (Potentiel postsynaptique excitateur lent) |
| ET | Endothéline |
| FC | Fréquence cardiaque |
| GMP _c | Guanosine 3',5'-monophosphate cyclique |
| GTP | Guanosine 5'-triphosphate |
| H ⁺ | hydrogène |
| i.c.v. | Injection intra-cérébro-ventriculaire |
| IP ₃ | Inositol 1,4,5-triphosphate |
| ISO | Isoprotérénol |
| K ⁺ | Potassium |
| LO | Lipooxygénase |
| LTs | Leucotriènes |
| M ₁ à M ₅ | Sous-types de récepteurs muscariniques |
| MAO | Monoamine oxydase |
| MAP Kinase | <i>Mitogen Activated Protein</i> (protéine activant le mitogène) |
| Na ⁺ | Sodium |
| NE | Norépinéphrine |
| N _N | Récepteur nicotinique neuronal |
| N _M | Récepteur nicotinique de la jonction neuro-musculaire |

| | |
|-------------------------|---|
| NO | <i>Nitric oxyde</i> (monoxyde d'azote) |
| Noeud AV | Noeud auriculo-ventriculaire |
| Noeud SA | Noeud sino-auriculaire |
| NPY | Neuropeptide Y |
| PA | Potentiel d'action |
| PACAP | <i>Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i> (peptide hypophysaire activateur de l'adényl cyclase) |
| PIP2 | Phosphatidyl 4,5-biphosphate |
| PGE ₂ | Prostaglandine E ₂ |
| PGE ₂ -R | <i>PGE₂-receptor</i> (Récepteur à la PGE ₂) |
| PGs | Prostaglandines |
| PKA | Protéine kinase dépendante de l'AMP _c |
| PKC | Protéine kinase C |
| PLA ₂ | Phospholipase A ₂ |
| PLC | Phospholipase C |
| PLD | Phospholipase D |
| PMA | 4β-phorbol 12-myristate 13-acétate |
| PNMT | Phényléthanolamine N-méthyltransférase |
| Protéine G | Protéine régulatrice liant le GTP |
| Protéine G _q | Protéine G ubiquitaire |
| Protéine G _i | Protéine G inhibitrice |
| Protéine G _s | Protéine G stimulatrice |
| PTA | Phényltriméthylammonium |
| RE | Réticulum endoplasmique |
| ROCC | <i>Receptor-operated calcium channel</i> (canal calcique opéré par un récepteur) |
| SNC | Système nerveux central |
| SRA | Système rénine-angiotensine |
| TH | Tyrosine hydroxylase |

| | |
|------------------|--|
| TXA ₂ | Tromboxane A ₂ |
| VDCC | <i>Voltage-dependent calcium channel</i> (canal calcique dépendant du voltage) |
| VIP | <i>Vasoactive intestinal peptide</i> (peptide intestinal vasoactif) |
| VMA | <i>Vanillylmandelic acid</i> (acide 3-méthoxy-4-hydroxymandélique) |

VI. DÉDICACE

J'aimerais dédicacer cette thèse à ma conjointe, Annie, qui a su m'encourager et me motiver à rédiger cet ouvrage du début à la fin. En effet, j'ai pu puiser en elle énergie et bonne humeur pour me permettre d'atteindre mes objectifs.

J'aimerais également dédier mes pensées à ma famille: ma mère qui a toujours été présente dans les bons et mauvais moments, car j'ai pu retrouver en elle appui, encouragement et précieux conseils; Jean-Pierre, également, pour son soutien et son support moral; et Sylvain, mon frère, pour sa présence tout au long de ces longues études. Finalement, je voudrais dédier ce travail à une personne toute spéciale, feu ma tante Thérèse, qui a toujours été présente pour me pousser à persévérer et à continuer mes études et qui sera toujours pour moi une source d'inspiration et de motivation.

VII. REMERCIEMENTS

Plusieurs personnes sont en parties responsables de la réalisation de cet ouvrage, que ce soit de façon directe ou indirecte.

Tout d'abord, je voudrais remercier tout particulièrement mon directeur de recherche Dr. Nobuharu Yamaguchi, de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir transmis son savoir scientifique. Ses précieux et judicieux conseils et son support financier ont grandement contribué à la réalisation de cette thèse ainsi que de mes études doctorales dans leur ensemble. Je tiens à remercier, également, mon co-directeur, Dr. Richard Briand, pour son aide à ma recherche et pour son support financier.

J'aimerais, tout aussi, exprimer de la façon la plus sincère, mes remerciements à Madame Sanaë Yamaguchi et à Monsieur Richard Lalande pour leur support technique ainsi que pour leur bonne humeur constante.

J'aimerais remercier, de même, quelques étudiants de la faculté de pharmacie pour nos discussions intéressantes, qu'elles aient été de nature scientifique ou non. Merci à Louis Lamarche pour ses merveilleux conseils scientifiques lors de mes études de maîtrise et spécialement lors de mon examen pré-doctoral et à tout le groupe du laboratoire du Dr. Daniel Lamontagne. Finalement, un merci tout spécial à Stéphane Lamouche, candidat au doctorat pour sa très grande disponibilité et ses discussions intéressantes.

J'aimerais également remercier le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA), Bristol-Myers-Squibb, la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle et le Dr. Nobuharu Yamaguchi pour leur support financier. Un merci, également, à l'administration de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal pour tous les services rendus, et à mon professeur de Karaté *Kyoshi* Marco Della-Cioppa de m'avoir donné confiance en moi. Et Noëlle Racine, pour ses corrections de la langue française.

VIII. AVANT-PROPOS

Cette thèse se divise en quatre parties. La **première** est une revue générale sur la physiologie du système nerveux autonome et de la glande surrénale. Une attention particulière est portée sur le rôle du système rénine-angiotensine dans la sécrétion des catécholamines par la médullo-surrénale. Certaines considérations méthodologiques y sont discutées. On retrouve dans la **seconde** partie, trois publications scientifiques qui font l'objet de cet ouvrage, celles-ci ont été publiées dans des revues spécialisées en physiologie. La **troisième** partie, est une synthèse des résultats qui sont discutés en profondeur, et suit par la suite la **conclusion**. Les articles scientifiques sont présentés selon la séquence suivante:

1. **Martineau, D., N. Yamaguchi, and R. Briand.** 1995. Inhibition by BMS 186295, a selective nonpeptide AT₁ antagonist, of adrenal catecholamine release induced by angiotensin II in the dog in vivo. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 459-464.
2. **Martineau, D., Lamouche, S., Briand, R., and Yamaguchi, N.** 1999. Functional involvement of angiotensin AT₂ receptor in adrenal catecholamine secretion in vivo *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77: 367-374.
3. **Martineau, D., Briand, R., and Yamaguchi, N.** 1996. Functional evidence for L-type Ca²⁺ channels controlling adrenal catecholamine release induced by angiotensin II in vivo. *Am. J. Physiol.* 271: R1713-R1719.

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 LE SYSTÈME NERVEUX AUTONOME

L'organisme travaille sans cesse au maintien de l'homéostasie. Tous les organes contribuent à la stabilité relative du milieu interne, mais c'est le système nerveux autonome qui y préside par l'intermédiaire de neurones moteurs innervant les muscles lisses, le muscle cardiaque et les glandes (Marieb et Laurendeau 1992; Tortora et Anagnostakos 1987). Comme son nom l'indique (*autos* = soi-même, *nomos* = loi), le système nerveux autonome est doté d'une certaine indépendance. Il est aussi appelé "système nerveux involontaire" à cause de ses mécanismes inconscients, et "système moteur viscéral" en raison de la situation de la majorité de ses effecteurs. Le système nerveux autonome réagit à des fluctuations de l'environnement en augmentant l'irrigation dans les régions qui nécessitent un apport sanguin accru, en accélérant ou en ralentissant les fréquences cardiaque et respiratoire, en ajustant la pression artérielle et la température corporelle, ou encore en augmentant ou en diminuant les sécrétions gastriques. La plupart de ces modulations ne franchissent pas le seuil de la conscience.

Le système nerveux autonome est composé de deux structures analogues: le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique; la plupart des organes innervés par le système nerveux autonome reçoivent des neurones efférents viscéraux des deux composants de ce système. Malgré le fait que le système nerveux parasympathique et le système nerveux sympathique desservent généralement les mêmes viscères, leur action est contraire. Chacun des deux devient le contrepois de l'autre de manière à assurer le bon fonctionnement de l'organisme: le système nerveux sympathique mobilise l'organisme dans les situations extrêmes (e.g. la peur, l'exercice ou la colère), tandis que le système nerveux parasympathique nous permet de nous détendre pendant qu'il s'acquitte des tâches routinières de l'organisme, comme par exemple le repos et la digestion (Marieb et Laurendeau 1992).

1.1- ORGANISATION ANATOMIQUE

Le système nerveux parasympathique et le système nerveux sympathique se distinguent à plusieurs niveaux. D'une part, concernant leurs lieux d'origine, i.e. les fibres parasympathiques émergent de l'encéphale et de la région sacrée de la moëlle épinière, tandis que les fibres sympathiques prennent naissance dans la région thoraco-lombaire de la moëlle. D'autre part, ces deux systèmes diffèrent de par la longueur de leurs fibres: les fibres préganglionnaires sont longues et les fibres postganglionnaires sont courtes dans le système nerveux parasympathique, et inversement dans le système nerveux sympathique. Par ailleurs, ces deux systèmes se différencient par la localisation de leurs ganglions: la plupart des ganglions parasympathiques sont situés dans les organes viscéraux, tandis que les ganglions sympathiques se trouvent à proximité de la colonne vertébrale (Fig. 1).

1.1.1- Système nerveux parasympathique

Les corps cellulaires des fibres préganglionnaires du système nerveux parasympathique se trouvent à la fois dans les noyaux du tronc cérébral et dans ceux de la corne latérale du deuxième au quatrième segment sacré de la moëlle épinière (Fig. 1). Leurs fibres émergent à titre de composantes des nerfs crâniens ou rachidiens. Il est à noter que le système nerveux parasympathique est également appelé système crano-sacré.

Le parasympathique crânien comprend des fibres préganglionnaires qui quittent le tronc cérébral par les nerfs moteur oculaire commun (III), facial (VII), glossopharyngien (IX) et pneumogastrique ou vague (X). Le parasympathique sacré comprend des fibres préganglionnaires qui quittent les racines

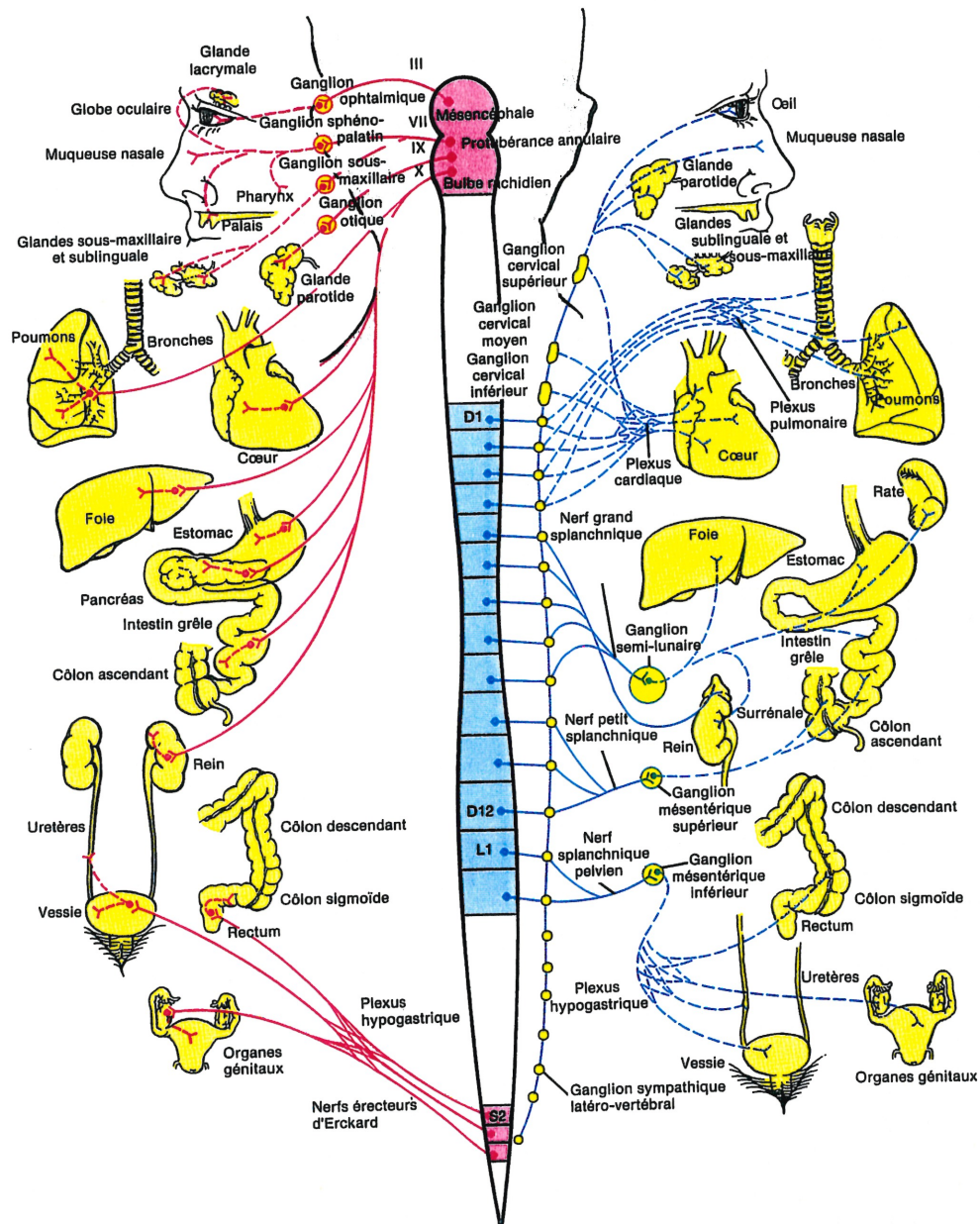


Fig. 1. Structure du système nerveux autonome. Le système nerveux parasympathique (lignes rouges) n'est illustré que du côté gauche et le système nerveux sympathique (lignes bleues) n'occupe que le côté droit. Les fibres préganglionnaires sont représentées par les lignes continues tandis que les fibres postganglionnaires par les lignes pointillées. Adapté de Tortora et Anagnostakos, 1988.

antérieures du deuxième au quatrième nerf sacré (S_2 à S_4).

Les fibres préganglionnaires parasympathiques crâniennes et sacrées s'étendent du système nerveux central jusqu'aux structures qu'ils innervent; une fois qu'elles y sont parvenues, elles font synapse avec des neurones postganglionnaires situés dans des ganglions terminaux qui se trouvent soit très près des organes cibles, soit à l'intérieur ou dans la paroi de ceux-ci. Les fibres postganglionnaires, très courtes, naissent des ganglions terminaux et font synapse avec des cellules effectrices situées à proximité (Fig. 1).

1.1.2- Système nerveux sympathique

Le système nerveux sympathique est plus complexe que le système nerveux parasympathique, en partie parce qu'il innerve un plus grand nombre d'organes. Il dessert non seulement les organes internes mais également des éléments internes de la peau et des muscles squelettiques. Cette étonnante constatation s'explique du fait que certaines glandes (comme les glandes sudoripares) et certains muscles lisses (comme les muscles arrecteurs des poils) nécessitent une innervation autonome et ne sont desservis que par des fibres sympathiques.

Toutes les fibres préganglionnaires du système nerveux sympathique émergent des corps cellulaires de neurones situés dans les segments médullaires T_1 à L_2 (Fig. 1; dans cette figure, l'expression "segments dorsaux" D_{1-12} est synonyme de "segments thoraciques", i.e. T_{1-12}). C'est la raison pour laquelle le système nerveux sympathique est aussi appelé système thoraco-lombaire. Les nombreux neurones préganglionnaires sympathiques présents dans la substance grise de la moëlle épinière

forment des cornes latérales (ou zones motrices viscérales) qui font saillie entre les cornes antérieures et postérieures, lesquelles abritent les neurones moteurs somatiques. Après être sorties de la moëlle épinière par la racine antérieure, les fibres préganglionnaires sympathiques passent par un rameau communicant blanc puis entrent dans le ganglion de la chaîne sympathique adjacent (Fig. 2).

Bien que les chaînes sympathiques s'étendent du cou au bassin, les fibres sympathiques émergent seulement des segments thoraciques (dorsaux) et lombaires de la moëlle épinière, comme le montre la figure 1. La taille, la localisation et le nombre de ganglions peuvent varier, mais on en trouve généralement 24 dans chaque chaîne sympathique, soit 3 cervicaux, 12 thoraciques, 4 lombaires, 4 sacrés et 1 coccygien.

Une fois qu'une fibre préganglionnaire a atteint un ganglion d'une chaîne sympathique, elle peut emprunter plusieurs voies comme par exemple: 1) elle peut faire synapse avec le corps cellulaire d'un neurone postganglionnaire situé dans le même ganglion; 2) elle peut monter ou descendre dans la chaîne sympathique et faire synapse dans un autre ganglion de cette même chaîne; et 3) elle peut traverser le ganglion et émerger de la chaîne sympathique sans faire synapse (Fig. 2). Les fibres préganglionnaires qui empruntent ce dernier trajet contribuent à former les nerfs grands splanchniques, qui font synapse avec des ganglions prévertébraux (comme c'est le cas du ganglion coeliaque), situés à l'avant de la colonne vertébrale.

Quel que soit l'endroit de la synapse, tous les ganglions sympathiques sont proches de la moëlle épinière, et les fibres postganglionnaires, qui s'étendent d'un ganglion aux organes qu'elles desservent,

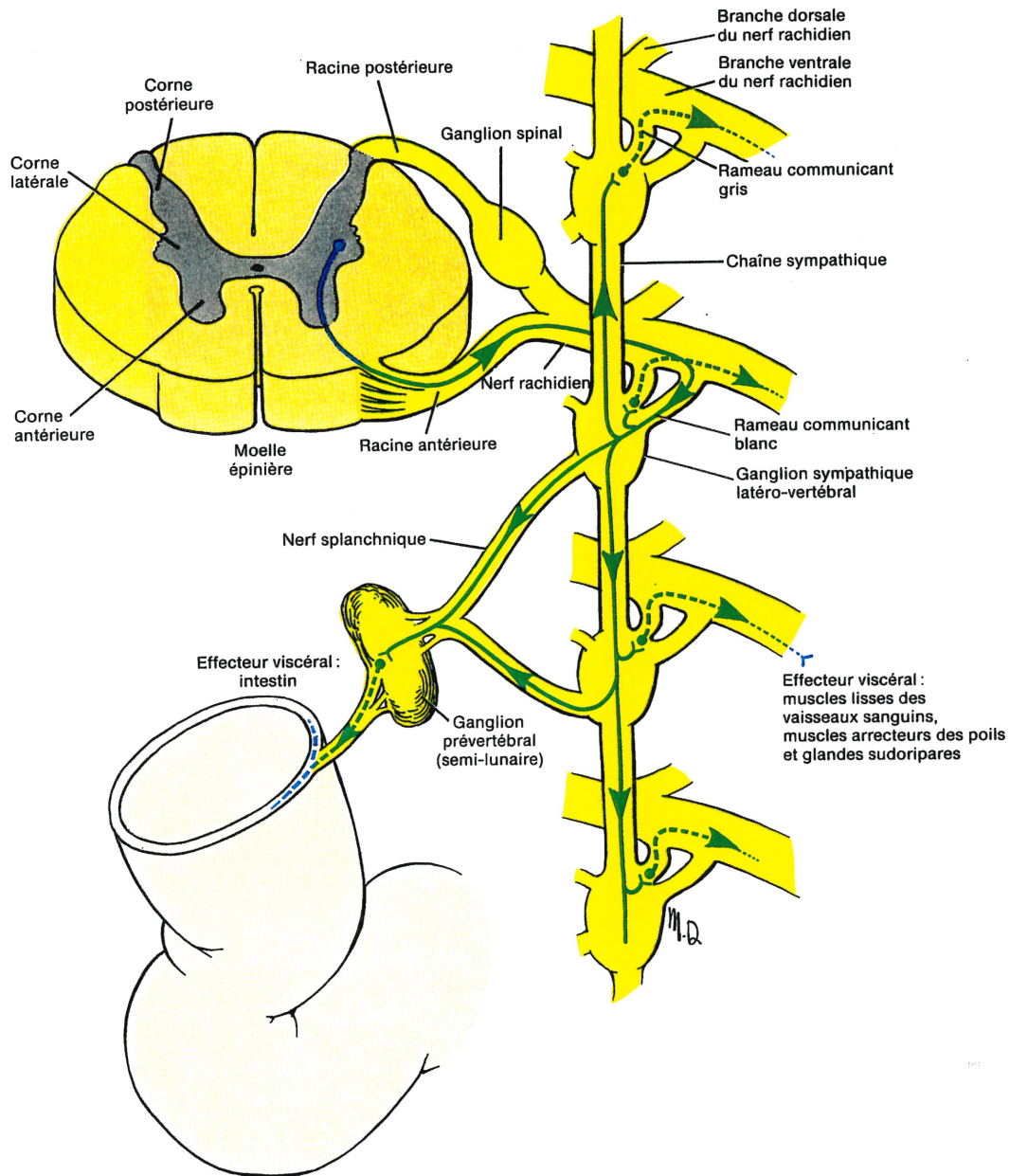


Fig.2. Représentation schématique de ganglions et rameaux communicants du système nerveux sympathique. Adapté de Tortora et Anagnostakos, 1988.

sont généralement beaucoup plus longues que les fibres préganglionnaires.

1.2- RÔLES

1.2.1- Système nerveux parasympathique

Le rôle du système nerveux parasympathique consiste principalement à réduire la consommation d'énergie tout en accomplissant les activités de maintenance mais vitales que sont par exemple la digestion et l'élimination des déchets (le système nerveux parasympathique est également connu sous l'expression "rest and digest").

1.2.2- Système nerveux sympathique

C'est le système nerveux sympathique qui, dans les situations d'urgence, nous prépare à la fuite ou à la lutte ("flight or fight"). Son activité se manifeste lorsque nous sommes excités, effrayés ou menacés. Le système nerveux sympathique amorce une série de réactions qui permettent à l'organisme de s'adapter de manière rapide et efficace aux situations qui pourraient perturber l'homéostasie. Son rôle est de créer les conditions les plus favorables au déclenchement de la réaction appropriée à toute menace que cette réaction soit la fuite, une meilleure vision ou la pensée critique. L'influence du système nerveux sympathique sur les vaisseaux sanguins permet, en outre, la régulation de la pression artérielle.

1.3- PHYSIOLOGIE

La transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses entre les neurones préganglionnaires et postganglionnaires ou entre les neurones postganglionnaires et les cellules effectrices se fait par l'intermédiaire d'agents chimiques appelés neurotransmetteurs. Cette transmission, de type neurohormonale, est essentielle au fonctionnement du système nerveux autonome. Depuis les études de Loewi (1926) qui ont démontré que les terminaisons nerveuses pourraient libérer l'acétylcholine (ACh), plusieurs autres neurotransmetteurs ont été découverts. Par contre, différents critères doivent être satisfaits pour qu'une molécule soit identifiée comme neurotransmetteur: 1) **présence** du neurotransmetteur dans l'élément présynaptique; 2) **synthèse**: les précurseurs et les enzymes nécessaires à la synthèse du neurotransmetteur sont présents dans le neurone présynaptique; 3) **libération**: le neurotransmetteur est libéré en réponse à l'activation du neurone présynaptique et en quantité suffisante pour produire une réponse postsynaptique (cette libération doit être dépendante des ions calcium: Ca^{2+}); 4) **fixation sur des récepteurs postsynaptiques spécifiques**: a) des récepteurs spécifiques du neurotransmetteur sont présents sur la membrane postsynaptique, b) l'application de la substance au niveau de l'élément postsynaptique reproduit la réponse postsynaptique obtenue par la stimulation du neurone présynaptique, c) les médicaments qui bloquent ou potentialisent de façon spécifique la réponse postsynaptique ont les mêmes effets sur la réponse induite par l'application du neurotransmetteur; 5) **inactivation**: des éléments du tissu nerveux synaptique (éléments pré- ou postsynaptiques, cellules gliales, membrane basale) possèdent un ou plusieurs des mécanismes d'inactivation du neurotransmetteur (Hammond et Tritsch 1990).

Les terminaisons nerveuses du système nerveux autonome possèdent la capacité de synthétiser, d'emmagasinier, de libérer, et de recapter des neurotransmetteurs spécifiques ainsi que leur précurseur immédiat (e.g. la tyrosine et la choline). Les fibres cholinergiques libèrent l'ACh dans la fente synaptique par les terminaisons des fibres préganglionnaires sympathiques et parasympathiques, ainsi que par les fibres postganglionnaires parasympathiques. Comme l'ACh est rapidement inactivée par l'acétylcholinestérase (AChE), les effets des fibres cholinergiques sont locaux et de brève durée (Dale 1914).

D'autre part, les terminaisons nerveuses postganglionnaires sympathiques libèrent la norépinéphrine emmagasinée dans les vésicules des varicosités sympathiques pour ainsi modifier l'activité des cellules effectrices sympathiques. Ces fibres sont impliquées dans la transmission adrénérique. Par conséquent, selon le neurotransmetteur produit, on peut classer les fibres autonomes en fibres cholinergiques (ACh) et adrénériques (norépinéphrine) (Tortora et Anagnostakos 1987).

Bien que la médullo-surrénale fasse partie du système nerveux sympathique, cette partie centrale de la glande surrénale synthétise les catécholamines (épinéphrine > norépinéphrine > dopamine), où l'épinéphrine et la norépinéphrine agissent comme des hormones endocrines puisqu'elles sont libérées dans la circulation sanguine (Marieb et Laurendeau 1992; Cryer 1992).

1.3.1- Système nerveux parasympathique

1.3.1.1- Transmission cholinergique

La transmission synaptique cholinergique est un phénomène bien connu. Elle est souvent schématisée en grandes étapes que l'on peut décrire de la manière suivante. Le potentiel d'action, après s'être propagé à la terminaison présynaptique, y entraîne l'ouverture du canal Ca^{2+} . Les ions Ca^{2+} entrés dans le neurone présynaptique déclenchent alors la libération du médiateur chimique, l'ACh, qui diffuse dans la fente synaptique jusqu'à l'élément postsynaptique où elle se lie à des récepteurs spécifiques. Cette liaison permet, directement (par les récepteurs nicotiques) ou indirectement (récepteurs muscariniques), l'ouverture de canaux spécifiques à certains ions, dont le flux va modifier localement la différence de potentiel transmembranaire. Cette action de l'ACh est limitée à un temps très bref par l'intervention d'une enzyme extracellulaire, l'AChE qui hydrolyse l'ACh en acétate et choline. Cette dernière est recaptée par le neurone présynaptique cholinergique, au moyen d'un mécanisme spécifique, le "transporteur" à choline, afin d'être réutilisée pour la synthèse d'ACh (Baux et Fossier 1992).

Synthèse et stockage:

L'ACh est synthétisé à partir d'une réaction entre l'acétylcoenzyme A (Ac-CoA) et la choline catalysée par la choline-acétyltransférase (ChAT) localisée dans le cytoplasme (Fig. 3). La synthèse de l'ACh s'effectue essentiellement dans les terminaisons présynaptiques cholinergiques, dans le voisinage même des sites de libération du médiateur. L'Ac-CoA est produit par les mitochondries, lesquelles sont présentes en grand nombre dans les terminaisons nerveuses, tandis que la choline provient essentiellement du milieu extracellulaire et est captée par les terminaisons synaptiques, afin de pouvoir

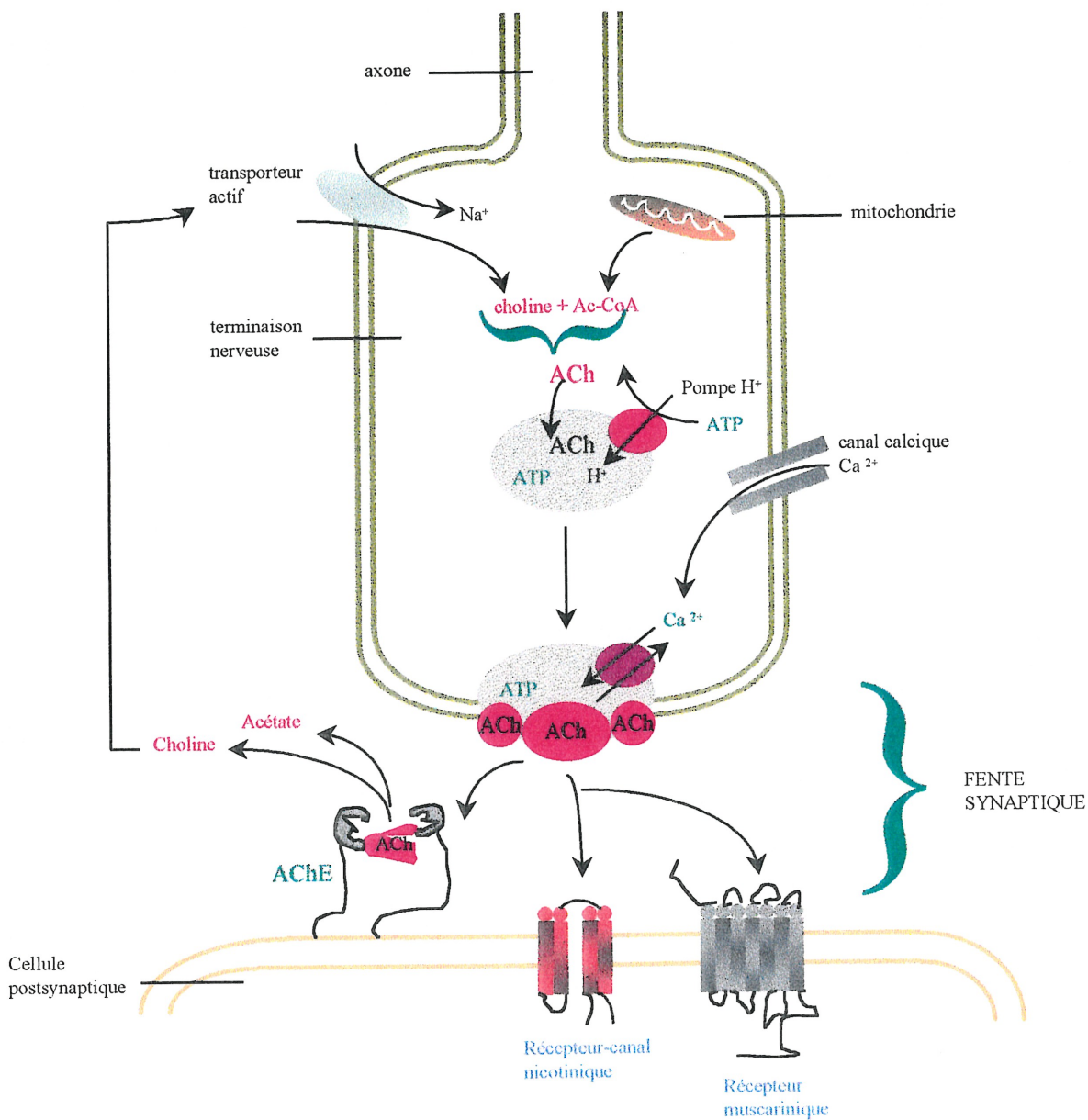


Fig. 3. Biosynthèse et libération de l'acétylcholine. ACh: acétylcholine; Ac-CoA: acétyl-coenzyme A; AChE: l'enzyme de dégradation acétylcholinestérase; ATP: adénosine triphosphate; ADP: adénosine diphosphate. Adapté de Katzung (1998).

être utilisée dans la synthèse de l'ACh. La choline apparaît essentiellement liée au transport à haute affinité, qui dépend de la présence d'ions sodium (Na^+) (Baux et Fossier 1992). Le transport actif de la choline est le facteur limitant de la synthèse de l'ACh.

Une fois synthétisée dans le cytoplasme, l'ACh est alors transportée, puis emmagasinée dans des vésicules synaptiques. Ce transport de l'ACh s'effectue contre un gradient de concentration et utilise l'énergie emmagasinée par l'accumulation de protons dans la vésicule. La membrane vésiculaire possède une "pompe" à protons consommant de l'ATP (Fig. 3) (Bloch 1992).

Libération:

La libération de l'ACh, a pu être démontré au niveau des sites de la transmission cholinergique, au niveau des synapses ganglionnaires sympathiques et parasymphatiques ainsi qu'au niveau des synapses postganglionnaires parasymphatiques. Cette libération de l'ACh se produit d'une manière explosive (1,000 à 50,000 molécules d'ACh se trouvant dans chaque vésicule synaptique) sous l'effet de la dépolarisation induite par la stimulation nerveuse où cette libération de l'ACh dépend de l'influx d'ions Ca^{2+} (Bloch 1992). Ce dernier pénètre dans la terminaison nerveuse lorsqu'elle est stimulée et provoque la fusion des vésicules avec la membrane cellulaire, ce qui libère de l'ACh dans la fente synaptique (Fig. 3). Ce phénomène porte le nom d'exocytose et est généralement observé lors de la libération des neuromédiateurs chimiques.

Une fois libérée par les terminaisons nerveuses présynaptiques suite au phénomène d'exocytose, l'ACh diffuse à travers la fente synaptique pour se lier à son récepteur postsynaptique nicotinique ou

muscarinique situé à la surface membranaire du neurone ou de la cellule effectrice. L'ACh produit son effet biologique par l'entremise de seconds messagers tels que le 1,4,5-inositol triphosphate (IP_3), le diacylglycérol (DAG), la protéine kinase C (PKC), et le Ca^{2+} . L'implication fonctionnelle de ces seconds messagers sera discuté plus loin.

Dégradation:

L'activité de l'ACh dépend de son inactivation par destruction sous l'effet des cholinestérases telle l'AChE; cette inactivation de l'ACh libérée se produit dans un délai variable selon le type de fonction impliqué. Les produits de dégradation de l'ACh sont la choline et l'acétate tels que mentionnés précédemment.

1.3.1.2- Récepteurs cholinergiques

Récepteurs nicotiques:

La transmission ganglionnaire se traduit par la libération présynaptique de l'ACh des ganglions autonomes et l'activation des récepteurs neuronaux postsynaptiques, de type nicotinique (N_N). Ces récepteurs neuronaux (N_N) agissent comme des canaux ioniques et, lorsqu'ils sont activés, ils causent une augmentation rapide de la perméabilité cellulaire aux ions Na^+ et Ca^{2+} , ce qui amène une dépolarisation et une excitation cellulaire. Il existe également des récepteurs nicotiques au niveau des plaques motrices des muscles squelettiques que l'on nomme N_M . Ces deux types de récepteurs nicotiques sont des protéines pentamériques membranaires où le récepteur N_N est composé des sous-unités α et β et le récepteur N_M de quatre sous-unités distinctes $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (McGehee et Role 1995; Hammond et Tritsch 1990). La sous-unité α des récepteurs nicotiques est l'entité responsable de

la liaison de l'ACh.

Récepteurs muscariniques:

Contrairement aux récepteurs nicotiniques, les récepteurs muscariniques appartiennent à la famille des récepteurs à 7 passages transmembranaires couplés à la protéine G. Jusqu'à ce jour, 5 sous-types de récepteurs muscariniques ont été clonés, soit M_1 à M_5 . Ces sous-types de récepteurs sont localisés dans une variété de tissus et ils sont couplés à des protéines G distinctes. En fait, les récepteurs M_1 , M_3 et M_5 activent une protéine G de type G_q , qui, elle, est responsable de la stimulation de la phospholipase C (PLC) menant à la formation, en outre, du second messager l' IP_3 , causant une relâche du Ca^{2+} emmagasiné dans le réticulum endoplasmique. Les récepteurs M_2 et M_4 , quant à eux, interagissent avec les protéines G_i et G_o , lesquelles causent une inhibition de l'enzyme adényl cyclase (Lefkowitz et al. 1996). Les caractéristiques des différents sous-types de récepteurs muscariniques et nicotiniques sont résumés au tableau 1.

1.3.2- Système nerveux sympathique

1.3.2.1- Transmission adrénérergique

La transmission adrénérergique s'effectue via les catécholamines. La norépinéphrine est le principal neurotransmetteur des fibres sympathiques postganglionnaires et de certains réseaux du système nerveux central. L'épinéphrine est l'hormone principale contenue dans les médullo-surrénales et la dopamine est le neurotransmetteur responsable de la transmission du système extrapyramidal et de plusieurs réseaux neuronaux du système mésocortical et mésolimbique (Lefkowitz et al. 1996).

Tableau 1. Caractéristiques des sous-types de récepteurs cholinergiques.

| Récepteurs | Agonistes | Tissus | Réponses | Antagonistes |
|----------------|---------------------------|--|--|---|
| M ₁ | Oxotrémorine McN-A-343 | ganglion autonome SNC | dépolarisation (EPSP lent) non défini | Atropine Pirenzépine |
| M ₂ | | COEUR: noeud SA oreillette noeud AV ventricule | hyperpolarisation ↓ de la durée du PA; ↓ FC ↓ de la vitesse de conduction ↓ légère de la FC | AF-DX 115 Atropine |
| M ₃ | | muscle lisse | contraction | Atropine Hexahydrosi- ladifénidol |
| N _N | DMPP | ganglion autonome médullo- surrénale SNC | dépolarisation postsynaptique et activation du neurone postganglionnaire dépolarisation de la cellule chromaffine non défini | Pentolinium Trimétaphan |
| N _M | PTA | jonction neuromusculaire | dépolarisation de la jonction et contraction du muscle | d-tubo- curanine |

PTA: phényltriméthylamonium; DMPP: 1,1-diméthyl-4-phénylpipérazinium iodé; PA: potentiel d'action; FC: force de contraction; EPSP: potentiel postsynaptique exciteur lent. Adapté de Lefkowitz et al. 1996.

Synthèse et stockage:

Les catécholamines sont synthétisées dans les neurones sympathiques et également dans les cellules chromaffines de la médullo-surrénale, à partir d'un précurseur commun: la tyrosine (Fig. 4 et 5). Cette dernière est un acide aminé qui provient de l'alimentation ou de l'hydroxylation de la phénylalanine par l'enzyme phénylalanine hydroxylase (venant du foie). La tyrosine est présente dans le sang, passe la barrière hématoencéphalique et est captée par les neurones, via le système de transport des acides aminés neutres.

Les enzymes impliquées dans la synthèse des catécholamines sont synthétisées dans les corps cellulaires des neurones et sont alors acheminées par transport axonal jusqu'aux terminaisons nerveuses. Au cours de la synthèse, la tyrosine est convertie en L-DOPA par l'action catalytique de la tyrosine hydroxylase (qui est l'étape limitante de la synthèse des catécholamines). Cette enzyme cytoplasmique peut être activée par une stimulation nerveuse adrénergique (Hammond et Tritsch 1990). La L-DOPA est à son tour transformée en dopamine par une autre enzyme cytoplasmique, la DOPA-décarboxylase. La dopamine ainsi formée est transportée activement dans les vésicules de stockage contenant l'enzyme dopamine β -hydroxylase où s'effectuera la synthèse de la norépinéphrine (Fig. 4). La synthèse des catécholamines dans les fibres sympathiques se termine par la formation de la norépinéphrine.

Dans la médullo-surrénale, on retrouve deux types de populations cellulaires, soient les cellules contenant de la norépinéphrine et celles contenant de l'épinéphrine. Ces deux hormones catécholaminergiques sont emmagasinées dans des vésicules de stockage à l'intérieur des cellules

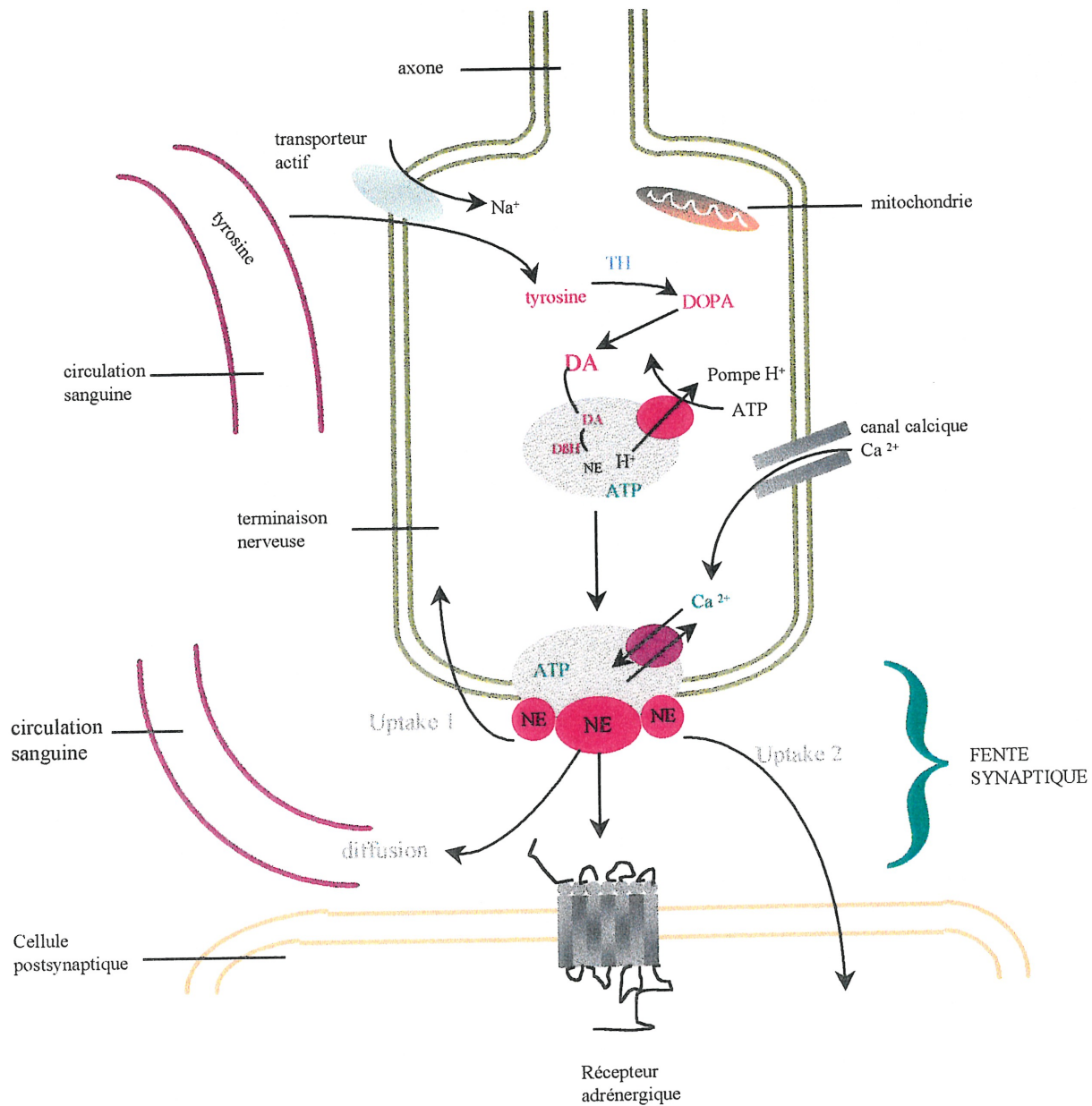


Fig. 4. Synthèse et libération de la norépinéphrine. TH: tyrosine hydroxylase; DA: dopamine; NE: norépinéphrine; DBH: dopamine-β hydroxylase; ATP: adénosine triphosphate. Adapté de Katzung (1998).

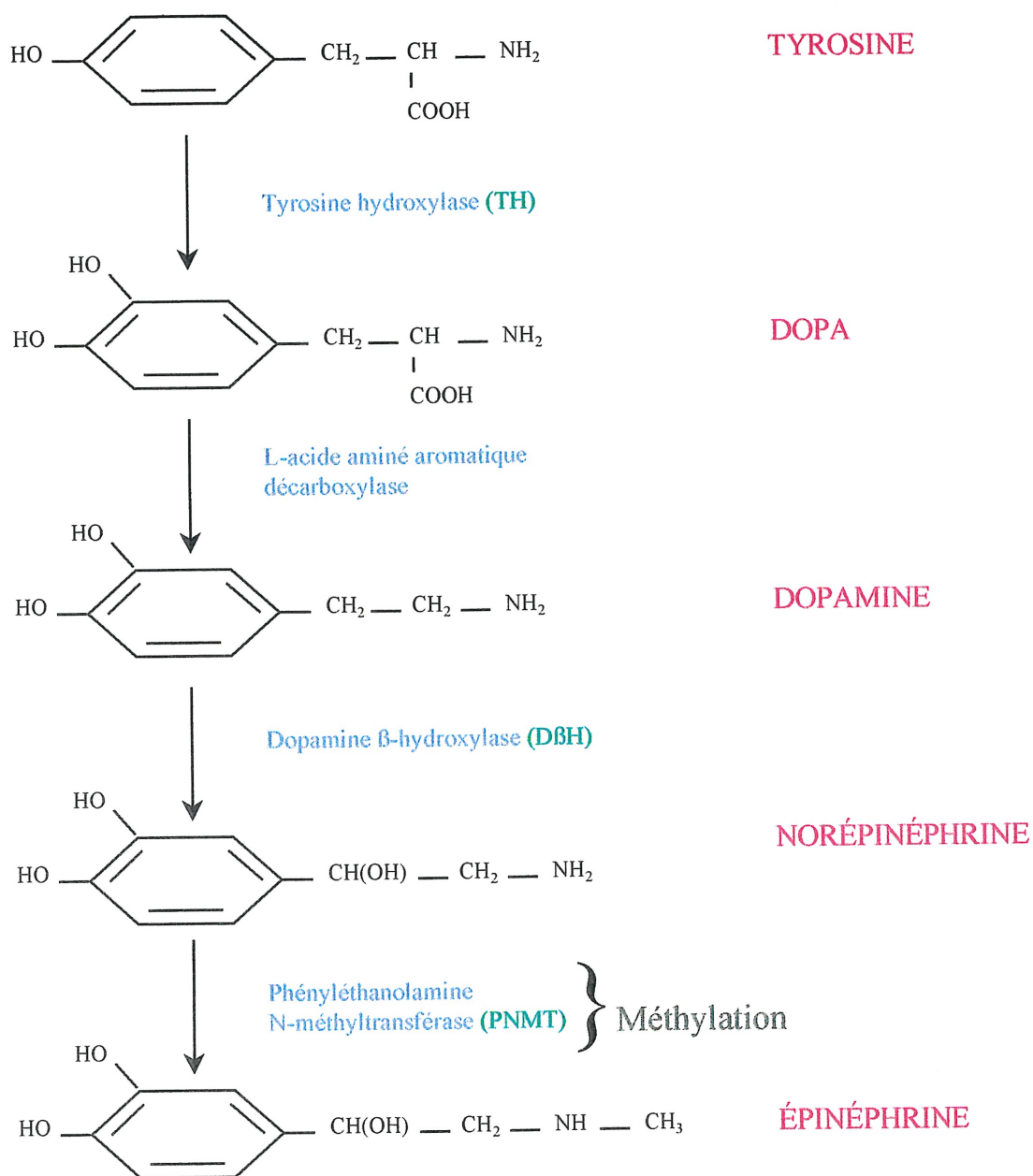


Fig. 5. Biosynthèse de la norépinéphrine et de l'épinéphrine dans la médullo-surrénale. Les quatre enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse sont représentées en bleu. Adapté de Verhofstad (1993).

chromaffines. Les cellules contenant de l'épinéphrine contiennent également de la PNMT (Phényléthanolamine N-méthyl transférase) présente dans le cytoplasme, responsable de la méthylation de la norépinéphrine en épinéphrine (Lefkowitz et al. 1996).

Libération:

La libération de la norépinéphrine a lieu à l'arrivée d'un signal électrique qui provoque la fusion des vésicules de stockage avec la membrane cytoplasmique (Schwartz 1992). Cette libération se fait par un mécanisme d'exocytose qui est dépendant du Ca^{2+} . Dans la médullo-surrénale, la libération de l'ACh par les fibres préganglionnaires et son interaction avec les récepteurs nicotiniques situés sur les cellules chromaffines produit une dépolarisation localisée. Par la suite, on observe une entrée de Ca^{2+} dans ces cellules. C'est ainsi que se produit l'exocytose menant à la vidange des catécholamines (en outre), dans la fente synaptique qui sépare la terminaison neuronale de la cellule effectrice. Les mécanismes d'exocytoses et de libération des catécholamines seront discutés plus en détail à la section 2.4.

Recapture et métabolisme:

La quantité de norépinéphrine libérée dans la fente synaptique est fonction de divers paramètres, en particulier de l'importance de la volée du potentiel d'action. Une partie de la norépinéphrine va être restockée par une recapture (uptake 1) dont elle est issue: une autre va atteindre l'effecteur par une capture extraneuronale (uptake 2); et, une fraction va passer dans le sang, i.e. diffuser hors de la fente synaptique.

La recapture neuronale (uptake 1) est le mécanisme le plus important par lequel l'activité de la norépinéphrine se termine (Axelrod 1966). Pour fonctionner, le transport intraneuronale a besoin d'un transporteur membranaire qui se comporte comme une pompe à Na^+ . Ce phénomène uptake 1 peut être bloqué en présence de certains agents pharmacologiques, dont les antidépresseurs tricycliques (e.g. la désipramine et l'imipramine) et la cocaïne. Ces agents bloquent le transport membranaire et empêchent la recapture neuronale, pour ainsi augmenter la concentration synaptique de la norépinéphrine et la transmission adrénergique (Schindler et al. 1995). Une fois transportées dans le neurone, la norépinéphrine et l'épinéphrine sont désaminées en 3,4-dihydroxyphénylglycoaldéhyde (DOPGAL) par la monoamine oxydase (MAO) neuronale. Cette dernière est surtout présente dans les terminaisons nerveuses sympathiques où elle s'associe à la membrane des mitochondries (Lefkowitz et al. 1996). L'épinéphrine sera moins sujette à être éliminée par la recapture neuronale que la norépinéphrine puisque le transport membranaire a moins d'affinité pour l'épinéphrine. Également, le mécanisme de recapture neuronale peut être impliqué dans le réapprovisionnement de la norépinéphrine des terminaisons nerveuses sympathiques. C'est-à-dire que la norépinéphrine va pénétrer dans la vésicule synaptique par l'entremise, cette fois-ci, d'un transporteur vésiculaire. La norépinéphrine pourra par la suite être réutilisée dans la transmission adrénergique.

La capture extraneuronale (uptake 2) est le processus par lequel les catécholamines présentes dans la fente synaptique pénètrent dans la cellule effectrice. La norépinéphrine et l'épinéphrine seront respectivement dégradées par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) tissulaire en normétanéphrine et métanéphrine (Fig. 6). Cependant la capture extraneuronale favorise plus l'épinéphrine, étant donné sa plus grande affinité envers cette dernière (Osswald et Guimaraes 1983).

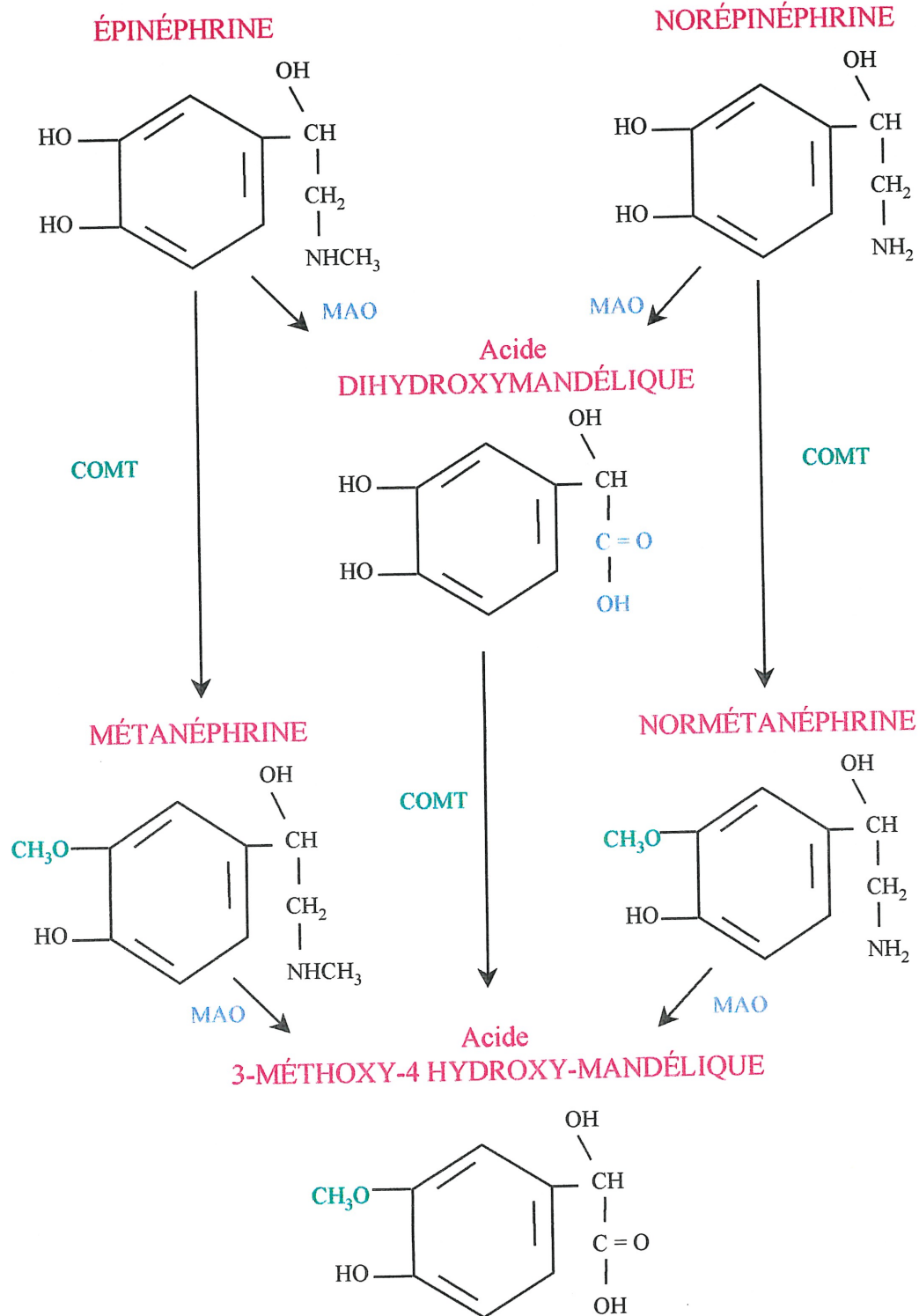


Fig. 6. Métabolisme des catécholamines par la COMT et la MAO. COMT: catéchol-O-méthyltransférase; MAO: monoamine oxydase. Adapté de Cryer (1992).

Une autre voie mettant fin à la transmission adrénergique consiste en la diffusion de la norépinéphrine hors de l'espace synaptique et ce, bien qu'une petite proportion de la norépinéphrine libérée des fibres sympathiques diffuse jusqu'au plasma (~10%).

La norépinéphrine et l'épinéphrine, qu'elles soient stockées immédiatement ou qu'elles soient métabolisées par l'enzyme COMT et la MAO, ont des effets brefs ($t_{1/2}$ plasmatique: ~1-2 min). Le principal métabolite de la norépinéphrine est l'acide vanillylmandélique (VMA) ou acide 3-méthoxy-4-hydroxymandélique (Fig. 6). Il est à noter que la dopamine subit également une biotransformation par les mêmes enzymes où son métabolite principal est l'acide homovanillique.

1.3.2.2- Récepteurs adrénergiques

En 1948, Ahlquist a été le premier à proposer l'existence de plusieurs types de récepteurs adrénergiques en se basant sur le fait que les catécholamines peuvent réguler plusieurs processus pharmacologiques. Ces récepteurs se sont avérés être les récepteurs α et β -adrénergiques. Les actions des catécholamines, ainsi que certains agonistes adrénergiques sur ces récepteurs, sont résumés au tableau 2. Les récepteurs adrénergiques appartiennent à la grande famille des récepteurs à 7 hélices transmembranaires couplés aux protéines G. Les effecteurs dont les récepteurs adrénergiques font partis sont présentés au tableau 3. Ces récepteurs se distinguent par leurs réactions particulières qu'ils provoquent et par leur union sélective avec les médicaments qui les excitent ou les inhibent. Cependant, en raison de la très grande diversité d'action des récepteurs adrénergiques, le lecteur est référé aux sections ultérieures ainsi qu'au tableau 2 pour une description plus complète de la transmission adrénergique et de ses effets biologiques.

Tableau 2. Caractéristiques des sous-types de récepteurs adrénergiques.

| Récepteurs | Agonistes | Tissus | Réponses | Antagonistes |
|--------------|-----------------------------|--|----------------------------------|-------------------------|
| α_1^* | Epi>NE>Iso Phényléphrine | muscle lisse vasculaire foie | contraction glycogénolyse | Prazosine Térazosine |
| α_2^* | Epi>NE>>Iso Clonidine | ilôts du pancréas (β) | diminution sécr. d'insuline | Yohimbine Idazoxane |
| β_1 | Iso>Epi=NE Dobutamine | coeur | inotrope + chronotrope + | Métoprolol Aténolol |
| β_2 | Iso>Epi>>NE Terbutaline | muscle lisse (vasculaire, bronchique, GI) | relaxation | ICI 118551 |
| β_3 | Iso=NE>Epi BRL 37344 | adipocyte | lipolyse | ICI 118551 |

α_1^* et α_2^* : récepteurs adrénergiques renfermant chacun au moins trois sous-type de récepteurs α_1 et α_2 -adrénergique; Epi: Epinéphrine; NE: Norépinéphrine; Iso: Isoprotérénol; GI; tractus gastro-intestinale. Adapté de Lefkowitz et al. 1996

Tableau 3. Couplage des récepteurs adrénérgiques aux protéines G ainsi que leurs effecteurs et seconds messagers.

| Récepteurs | Protéines G | Effecteurs | Seconds messagers |
|------------|--|--|---------------------------------|
| α_1 | G_q G_q $G_q / G_i / G_0$ G_q | \uparrow PLC \uparrow PLD \uparrow PLA ₂ \uparrow ?canal Ca ²⁺ | formation IP ₃ |
| α_2 | G_i $G_i (\beta\gamma)$ G_0 | \downarrow AC \uparrow canal K ⁺ \downarrow canal Ca ²⁺ (type-L et N) | diminution d'AMP _c |
| β_1 | G_s | \uparrow AC \uparrow canal Ca ²⁺ (type-L) | augmentation d'AMP _c |
| β_2 | G_s | \uparrow AC | augmentation d'AMP _c |
| β_3 | G_s | \uparrow AC | augmentation d'AMP _c |

G_{q0} : Protéine G régulatrice de type G_{q0} ; G_{si} : Protéine G régulatrice stimulante/inhibitrice de l'adényl cyclase (AC); IP₃: 1,4,5-inositol triphosphate; AMP_c: adénosine monophosphate cyclique; PLC, D, et A₂, phospholipase C, D, et A₂. Adapté de Lefkowitz et al. 1996.

Récepteurs α -adrénergiques:

Récemment, six récepteurs α -adrénergiques différents ont été clonés et identifiés comme étant α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} (Ford et al. 1994), α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} (Bylund et al. 1994). Le sous-type de récepteur α_{1C} n'est pas représenté ici, car il existe certaines controverses quant à la classification de ce sous-type de récepteur. Tout porte à croire qu'il soit pharmacologiquement identique au sous-type α_{1A} (Watson et Girdleston 1995).

Les récepteurs α_1 sont présents sur la membrane postsynaptique et assurent une grande variété d'effets dont la plupart impliquent le muscle lisse vasculaire, tandis que les récepteurs α_2 sont essentiellement présynaptiques et lorsque stimulés, ils inhibent, en outre, la libération de la norépinéphrine des terminaisons nerveuses adrénérergiques. De plus, il existe des récepteurs α_2 -adrénérergiques postsynaptiques au niveau des vaisseaux sanguins et des plaquettes. La stimulation de ces récepteurs amène, respectivement, une vasoconstriction et une augmentation de l'agrégation plaquettaire. Ainsi, la stimulation des récepteurs α_2 -adrénérergiques postsynaptiques engendrent des effets similaires à ceux des récepteurs α_1 .

À l'exception des récepteurs α_{1A} -adrénérergiques qui augmentent l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule suite à l'activation des canaux Ca^{2+} de type-L (Minneman 1988), les autres sous-types de récepteurs α_1 -adrénérergiques empruntent tous la même voie de signalisation. La stimulation des récepteurs α_1 -adrénérergiques (périphériques) par les catécholamines peut influencer, en outre, le métabolisme de certains phospholipides membranaires et favoriser la production d' IP_3 . Celui-ci entraîne une augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} qui est libéré du réticulum endoplasmique.

Ces mouvements intracellulaires de Ca^{2+} expliquent les contractions du muscle lisse vasculaire contrôlées par les catécholamines et les agonistes α_1 -adrénergiques. Dans d'autres tissu-cibles (e.g. intestin), leurs actions sont de type inhibiteurs, suite à une hyperpolarisation subie par les cellules, selon des mouvements ioniques encore inconnus.

Quant à eux, les récepteurs α_2 -adrénergiques (périphériques) sont vraisemblablement couplés à l'enzyme adényl cyclase par l'intermédiaire de la sous-unité inhibitrice $G_{i-\alpha}$ de la protéine régulatrice G, elle-même sensible à la toxine pertussique. Dans un tel cas, l'activité de l'enzyme est réprimée et la concentration de l'adénosine monophosphate cyclique (AMP_c) diminue à l'intérieur de la cellule. Du même coup, l'activité de la protéine kinase A (PKA) diminue dans la cellule. Cette diminution inhibe ou ralentit les phosphorylations dépendantes de l' AMP_c .

Récepteurs β -adrénergiques:

Dans les années 60, les récepteurs β -adrénergiques étaient au nombre de deux, i.e. β_1 (myocarde) et β_2 (muscle lisse et la plupart des autres tissus) d'après des propriétés pharmacologiques (Lands et al. 1967). Un gène humain codant pour un troisième sous-type β -adrénergique (β_3) a depuis été cloné (Granneman et al. 1993; Emorine et al. 1989). Il semblerait que ce sous-type β_3 -adrénergique soit impliqué dans la régulation de la lipolyse chez l'homme (Rosenbaum et al. 1993; Krief et al. 1993; Lonnqvist et al. 1993).

En générale, la stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques postsynaptiques mène à une action chronotrope et inotrope positive sur le coeur, tandis qu'au niveau des reins, elle induit une production accrue de rénine. Les récepteurs β_2 -adrénergiques présynaptiques, contrairement aux récepteurs α_2 -adrénergiques présynaptiques, facilitent la libération de la norépinéphrine des terminaisons nerveuses sympathiques par un mécanisme de rétroaction positive. Quant aux récepteurs β_2 postsynaptiques, ils produisent une relaxation des bronches, des muscles lisses vasculaires ainsi que des muscles gastro-intestinaux.

Les trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques sont couplés à une même protéine régulatrice G_s (stimulatrice; activée par la toxine choléra) qui stimule l'enzyme adényl cyclase. L'activation de l'un des récepteurs amène l'accumulation d'AMP_c à partir de l'ATP, laquelle active la PKA, qui active à son tour différentes kinases impliquées dans une multitude d'effets physiologiques et pathophysiologiques. L'effet des β -stimulants est augmenté par les inhibiteurs des phosphodiésterases (e.g. méthylxanthine) qui empêche la destruction de l'AMP_c. L'ordre de puissance des agonistes sur les récepteurs β -adrénergiques est représenté au tableau 2.

CHAPITRE 2 LA GLANDE SURRÉNALE

La glande surrénale est un organe relativement dynamique en terme de mouvement cellulaire. Ce dernier est, en partie, soutenu par un mécanisme endogène qui suggère l'implication de facteurs internes incluant, en outre, des facteurs de croissance agissant de façon paracrine ou autocrine (Cryer 1992).

2.1- ORGANISATION ANATOMIQUE

Les glandes surrénales sont des organes en forme de pyramide, perchés au sommet des reins et enveloppés d'une capsule fibreuse et d'une couche de graisse. Chaque glande surrénale comprend deux portions qui diffèrent tant du point de vue structural que fonctionnel. C'est pourquoi la glande surrénale renferme, sous une même capsule, deux systèmes endocriniens. D'une part, le cortex surrénalien où il y a production de stéroïdes tels que l'aldostérone et, d'autre part, la médullo-surrénale qui sécrète l'épinéphrine (en plus grande porportion) et la norépinéphrine (Marieb et Laurendeau 1992).

2.1.1- Médullo-surrénale

La médulla (portion interne de la glande recouverte par le cortex), appelée médullo-surrénale, dérive de la crête neurale et fonctionnellement, elle appartient au système nerveux sympathique. La médullo-surrénale fonctionne en synergie avec ce système et les cellules médullaires sont stimulées directement par des fibres sympathiques préganglionnaires. Par conséquent, la médullo-surrénale peut être conceptualisée comme un neurone postganglionnaire sympathique sans axone. L'origine commune du développement de la médullo-surrénale et des neurones postganglionnaires sympathiques fait qu'ils

partagent une variété de processus physiologiques incluant la synthèse, le stockage et la relâche des catécholamines (Cryer 1992). De plus, les cellules chromaffines (unité fonctionnelle de la médullo-surrénale) communément appelées cellules médullaires, dérivées embryologiquement d'une cellule précurseur commune aux cellules de la médulla et neurones postganglionnaires sympathiques, sont largement distribuées et intimement associées avec le ganglion sympathique durant la vie foetale.

La médullo-surrénale et le système nerveux sympathique forment une unité anatomique et physiologique portant le nom de "système sympatho-surrénalien". Contrairement aux autres structures nerveuses du système sympathique, les fibres préganglionnaires qui innervent les médullo-surrénales se propagent de la moëlle épinière à la glande surrénale sans faire synapse au niveau de la chaîne paravertébrale sympathique. Ainsi, les cellules chromaffines de la médullo-surrénale sont innervées par des fibres préganglionnaires qui relâchent de l'ACh, provoquant, du même coup, la sécrétion de catécholamines, qui est sous le contrôle cholinergique et qui est assurée par des rameaux splanchniques.

Cellules chromaffines:

Les cellules chromaffines, sont groupées en amas irréguliers autour de capillaires et de sinusoides. Les cellules chromaffines sont appelées ainsi en raison de leur affinité aux sels de chrome utilisés en coloration histologique. Embryologiquement, les cellules chromaffines dérivent des ganglions sympathiques et partagent certains aspects morphologiques, biochimiques et physiologiques avec les neurones postganglionnaires sympathiques. C'est dans ce type de cellules que ce fait la synthèse et le stockage des catécholamines. Ces cellules endocrines spécialisées sont contenues dans la portion

médullaire des glandes surrénales (Landsberg et Young 1992). On retrouve dans les cellules chromaffines des vésicules de sécrétion qui sont des organelles caractéristiques à ces cellules que l'on appelle "vésicules chromaffines". Ces dernières contiennent environ 80% d'épinéphrine et environ 20% de norépinéphrine. De plus, les vésicules contenant de l'épinéphrine sont en présence de haute concentration de la PNMT, l'enzyme qui catalyse la méthylation de la norépinéphrine en épinéphrine (Fig. 5).

Innervation:

Les nerfs de la glande surrénale originent du plexus surrénalien. Ce dernier s'étend du plexus cœliaque au corps surrénalien (Netter 1965), et est connecté aux plexus phrénique inférieur ("rostrally") et rénal ("caudally"). Cette innervation renferme les constituants afférents et préganglionnaires des nerfs splanchniques (grand, moyen et petit), et les composants du nerf phrénique et des fibres postganglionnaires avec leurs cellules d'origine dans le ganglion cœliaque. L'innervation de la cellule chromaffine dans la médullo-surrénale est alimentée par les fibres préganglionnaires sympathiques prenant leur origine dans la racine ventrale de la moëlle épinière du 5^e segment thoracique (T5) au premier segment lombaire (L1) et ce, sans intervention de ganglions cellulaires. Les terminaisons nerveuses préganglionnaires cholinergiques parcourent toute la portion médullaire de la surrénale et innervent directement les cellules chromaffines, ce qui permet à la glande de répondre rapidement à un stimulus. Ces fibres nerveuses cholinergiques (relâchant l'ACh) sont en grande partie responsables de la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales.

Les fibres postganglionnaires sympathiques des nerfs surrenaliens sont distribuées aux lits vasculaires partout dans les portions médullaires et corticales de la glande.

Une étude effectuée sur l'innervation splanchnique chez le rat, a démontré que les fibres préganglionnaires sympathiques innervent surtout les cellules chromaffines de la médullo-surrénale mais que des fibres postganglionnaires peuvent également innerver ces cellules (Kesse et al. 1988). Les auteurs ont démontré la présence de corps cellulaires postganglionnaires dans les ganglions sympathiques aux niveaux des segments thoraciques T₄, T₉, T₁₀ et T₁₂, où le nombre maximal de corps cellulaires a été observé dans les ganglions des segments T₉ et T₁₀. De plus, des cellules postganglionnaires ont été retrouvées dans le ganglion suprarénal (surrénale) et aucune n'ont été retrouvée au niveau du ganglion coélique.

Cette étude confirme les travaux de Swinyard, en 1937, qui a démontré une innervation postganglionnaire de la surrénale chez le rat. Il a observé que plus de 30% des fibres dans la médullo-surrénale demeuraient intactes après sectionnement des dix derniers segments thoraciques et des deux premiers segments lombaires suggérant que les fibres restantes étaient de nature postganglionnaire.

En plus d'une innervation cholinergique préganglionnaire, on a également suggéré que l'activité de la glande soit modifiée par des afférences sensorielles de type-C, bien que les premières études n'ont pu établir de façon précise l'existence de ces fibres dans la médullo-surrénale (Swinyard 1937). Les afférences sensorielles de type-C renferment la substance P, un neuropeptide présent dans les terminaisons nerveuses splanchniques des glandes surrenales. La substance P potentialise la libération

des catécholamines en réponse à une stimulation électrique (Zhou et Livett 1990; Linnoila et al. 1980).

Plusieurs études publiées au cours des années 80 ont démontré la présence de différents peptides (le VIP [Vasoactive Intestinal Peptide] (Hokfelt et al. 1981), le CGRP [Calcitonin-Gen-Related-Peptide] (Kuramoto et al. 1987), le NPY [Neuropeptide Y] (Kuramoto et al. 1986), la neurotensine et le CRF [Corticotropin Releasing-Factor] (Brunn et al. 1987; Rundle et al. 1988)) dans les terminaisons nerveuses des glandes surrénales (nerf splanchnique) et les cellules chromaffines (Kondo 1985).

Bien que l'ACh soit le neurotransmetteur le plus important impliqué dans la régulation de la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales, il est également possible qu'une population hétérogène de neuropeptides puissent influencer la réponse sécrétrice des surrénales (Kondo 1985). Ces peptides possèdent des propriétés vasoactives et peuvent par conséquent être impliqués dans la régulation du débit sanguin des surrénales.

2.1.2- Cortex surrénalien

Le cortex, appelé cortico-surrénale, est la portion la plus volumineuse et la plus externe de la glande. Il recouvre la médullo-surrénale et origine du mésoderme embryonnaire. La cortico-surrénale synthétise une trentaine d'hormones stéroïdiennes. On distingue 3 différentes couches anatomiques au niveau du cortex: 1) la zone glomérulée qui est la plus près de la région sous capsulaire de la glande; 2) la zone fasciculée qui est la plus épaisse du cortex; et 3) la zone réticulée qui est la couche

avoisinante de la médullo-surrénale (Fig. 7).

Le cortex surrénalien, comme plusieurs autres tissus endocriniens, est sous le contrôle homéostatique du système neuro-endocrinien, lequel régularise non seulement l'activité sécrétrice de la glande (comme la production de stéroïdes surrénaliens), mais aussi son état trophique. Contrairement à d'autres organes glandulaires, le cortex est fortement dépendant d'un stimulus externe pour maintenir son état trophique (Estivariz et al. 1992).

Cellules cortico-surrénales:

Les cellules corticales, de grande dimension et chargées de lipides, sont disposées en trois zones concentriques en surface. Les amas de cellules formant la zone glomérulée produisent les minéralocorticoïdes tels que l'aldostérone et participent à l'équilibre hydro-électrolytique du sang. Au centre, les cellules de la zone fasciculée forment des cordons plus ou moins rectilignes et sécrètent les hormones métaboliques appelées glucocorticoïdes (i.e. le cortisol). Enfin, les cellules de la zone réticulée contiguës à la médullo-surrénale sont disposées en réseaux; elles produisent des glucocorticoïdes et de petites quantités d'hormones sexuelles ou gonadocorticoïdes. Bien que chaque zone ait sa "spécialité", la zone réticulée fabrique l'ensemble des corticostéroïdes (Marieb et Laurendeau 1992).

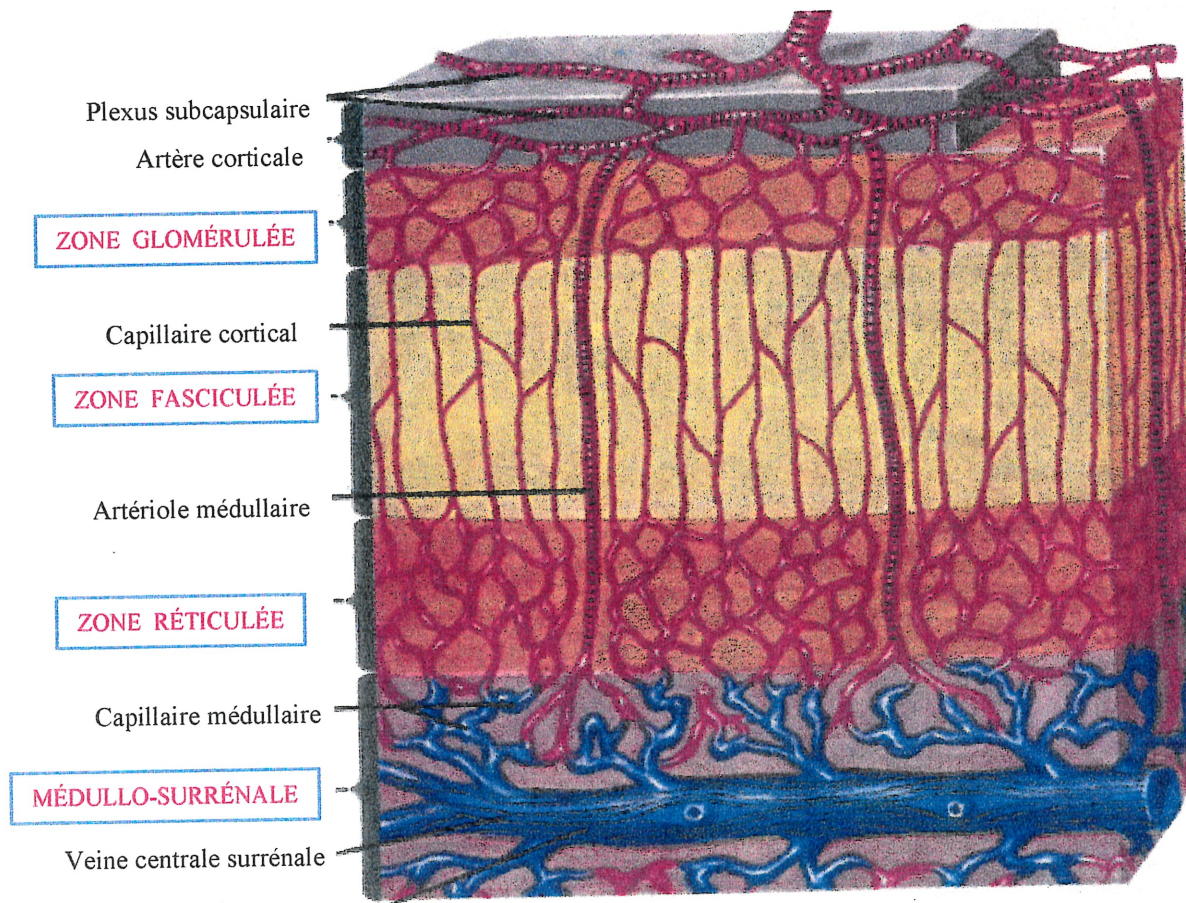


Fig. 7. Représentation schématique du réseau vasculaire de la glande surrénale chez l'homme. Des artères distinctes alimentent le cortex jusqu'à la médulla. Adapté de Netter (1965).

Innervation:

Le tissu cortical, à l'opposé du tissu médullaire, est probablement dépourvu d'une innervation directe. Cependant, on a déjà observé la présence de fibres cholinergiques préganglionnaires dans le cortex chez plusieurs espèces, ainsi que chez l'homme (Dogiel 1894; Robinson et al. 1977). De plus, comme mentionné précédemment, les fibres postganglionnaires sympathiques des nerfs splanchniques surrénaliens sont distribuées non seulement aux lits vasculaires dans la portion médullaire, mais, aussi, partout dans les portions corticales de la glande (Kesse et al. 1988; Netter 1980). Une étude publiée en 1985, a démontré qu'il existait une innervation adrénérgique postganglionnaire au niveau du cortex surrénalien chez le rat (Kleitman et al. 1985).

En relation avec ces études, on a démontré que la sécrétion endocrine du cortex est modulée par une innervation noradrénergique (Gilchrist et al. 1993; Vizi et al. 1992; Charlton et al. 1992) et que la norépinéphrine relâchée des neurones joue un rôle important dans la régularisation du débit sanguin à l'intérieur de la glande surrénale (Vizi et al. 1992).

2.2- ALIMENTATION SANGUINE INTRAGLANDULAIRE

L'apport sanguin de la glande surrénale est assuré par trois artères principales: 1) l'artère surrénalienne supérieure qui est une branche de l'artère phrénique inférieure; 2) l'artère surrénalienne moyenne provenant directement de l'aorte; et, 3) l'artère surrénalienne inférieure émanant de l'artère rénale, qui se divisent dans le plexus subcapsulaire (Landsberg et Young 1992).

Chez le rat, la glande surrénale reçoit du sang provenant de 30 à 50 petites artères qui pénètrent la capsule à différents points et forment le plexus sous capsulaire. Ces artères corticales alimentent en sang les capillaires corticales qui s'étendent le long du cortex. Il y a un phénomène de transition, i.e. les capillaires se rendent jusqu'à la médullo-surrénale comme des veines corticales. De plus, il y a des artérioles médullaires (qui partent du plexus subcapsulaire) qui traversent directement le cortex pour former des capillaires médullaires dans la médullo-surrénale. Donc, la médullo-surrénale a une alimentation sanguine à la fois veineuse et artérielle (Fig. 7). Ces deux catégories de vaisseaux se joignent pour former des veines médullaires qui drainent le sang dans une large veine appelée "veine centrale surrénale". De là, le sang veineux de la glande surrénale droite se jette dans la veine cave par la veine surrénale droite et celui de la glande surrénale gauche s'en va directement dans la veine rénale gauche. Ce drainage veineux surrénalien est présent chez l'homme et le rat (Breslow 1992), tandis que chez le chien, les veines surrénales gauches et droites se jettent directement dans la veine cave inférieure (Yamaguchi 1993a).

2.2.1- Interaction hormonale intraglandulaire

Des évidences suggèrent que la médullo-surrénale exerce un contrôle paracrine sur l'activité sécrétagogue du cortex par les catécholamines. Des études récentes suggèrent que la libération de catécholamines par la médullo-surrénale provoquée par certains produits peptidiques, tels que le VIP (Mazzocchi et al. 1993; Hinson et al. 1992; Hinson 1990), le NPY (Bernet et al. 1994) et le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) (Neri et al. 1996), peuvent réguler la sécrétion d'aldostérone.

2.3- RÉGULATION DES SÉCRÉTIONS HORMONALES DE LA GLANDE

2.3.1- Régulation de la sécrétion des catécholamines

L'ACh est le stimulus physiologique classique de la sécrétion des catécholamines par les glandes surrénales. Elle induit ces effets sécréteurs en se liant à ses récepteurs nicotiniques et muscariniques postsynaptiques (Chritton et al. 1991; Burgoyne 1984). Plusieurs autres substances endogènes, telles que le PACAP, le VIP, l'ET (Endothéline-1), et l'ANG II (Angiotensine II), modulent la sécrétion des catécholamines par un mécanisme non-cholinergique. Le tableau 4 résume l'effet de différentes substances endogènes sur la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales.

Modulation transneuronale:

La modulation transneuronale est, par définition, la modulation de la relâche d'un transmetteur d'un type de neurone par un transmetteur relâché par un autre type de neurone (Rand et al. 1990). L'ACh, le principal médiateur libéré des terminaisons nerveuses splanchniques, est le sécrétagogue le plus important des catécholamines dans la médullo-surrénale (Dale 1914; Feldberg et al. 1934). Lorsqu'un influx nerveux traverse les nerfs splanchniques, l'ACh, emmagasinée dans les vésicules de stockage, diffuse dans la fente synaptique jusqu'à l'élément postsynaptique où elle se lie aux récepteurs nicotiniques N_N . Cette liaison permet l'ouverture des canaux sodiques (Na^+) amenant une entrée massive d'ions Na^+ dans la cellule chromaffine (Cheek 1991). Ce phénomène provoque une dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation membranaire stimule l'ouverture des canaux Ca^{2+}

Tableau 4. L'effet de différentes substances endogènes sur la sécrétion basale des catécholamines, sur l'entrée du Ca^{2+} , sur la production d' IP_3 , et sur la $[Ca^{2+}]_i$ dans la cellule chromaffine.

| Substances endogènes | Sécrétion basale | Entrée Ca^{2+} | IP_3 | $[Ca^{2+}]_i$ | Stimulation nicotinique |
|--|------------------|------------------|---------|---------------|-------------------------|
| ANG II (récepteur AT_1) (récepteur AT_2) | ↑ ↑ | ↑ | ↑↑ | ↑ | |
| ANP | | ↑ | | | ↑ |
| Bradykinine (récepteur B_2) | ↑ | ↑ | ↑↑ | ↑ | |
| Dopamine (récepteur D_1) (récepteur D_2) | | ↑ ↓ | | | ↓ |
| Endothéline-1 (récepteur ET_A) (récepteur ET_B) | ↑* ↑? | ↑** ↑? | ↑ ↑? | ↑ ↑? | |
| Histamine (récepteur H_1) | ↑↑↑ | ↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑↑ | |
| ACh (récepteur $M_1?$) (récepteur N_N) | ↑↑** ↑↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑ ↑ | ↑↑ ↑↑↑ | présence |
| Substance P | ↑ | ↓? | ↑ | ↑ | ↓ |
| PACAP | ↑↑↑↑*** | ↑*** | ↑ | ↑ | |
| VIP | ↑↑† | ↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑ |

IP_3 : inositol 1,4,5-triphosphate; Ca^{2+}_i : concentration du calcium intracellulaire; ↑: stimulation; ↓: inhibition; M_1 : récepteur muscarinique de type 1; N_N : récepteur nicotinique de type neuronal; *Yamaguchi 1997 (chien *in vivo*); ** Yamaguchi 1995 (chien *in vivo*); *** Geng et al, 1997 (chien *in vivo*); † Yamaguchi 1993a (chien *in vivo*) et Wakade et al, 1991 (rat *in vitro*). Adapté de Burgoyne (1991).

à voltage dépendant de type-L, menant à une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Ca^{2+}_i) et, par conséquent, à la libération de catécholamines par exocytose (Cardenas et al. 1988; Winkler et al. 1986).

L'ACh peut aussi provoquer la libération de catécholamines par les médullo-surrénales, en stimulant les récepteurs muscariniques localisés sur la surface des cellules chromaffines (Chritton et al. 1991; Role et Perlman 1983). Cette liaison entraîne une production accrue d' IP_3 ainsi qu'une augmentation du Ca^{2+}_i (Burgoyne et al. 1991). Bien que le sous-type de récepteur muscarinique impliqué demeure encore un sujet controversé, le récepteur M_1 semble être le meilleur candidat en lice (Kimura et al. 1992).

Les fibres cholinergiques innervant les médullo-surrénales possèdent aussi des réserves d'oxyde nitrique (NO). Cet oxyde est co-libéré avec l'ACh (Bredt et al. 1990). Le NO agit comme inhibiteur de la libération des catécholamines médullaires en augmentant les concentrations cytoplasmiques de guanosine 3',5'-monophosphate cyclique (GMP_c) dans les cellules chromaffines. À l'instar du NO, le VIP et le PACAP sont également impliqués en tant que co-transmetteurs et sont responsable principalement de l'augmentation intracellulaire de l' AMP_c provoquant ainsi la libération de catécholamines chez le chien *in vivo* (Gaspo et al. 1997; 1995).

Automodulation:

Le terme "automodulation" désigne un procédé auquel un transmetteur libéré peut moduler la relâche subséquente de transmetteurs en agissant sur des récepteurs associés aux axones terminaux du neurone, constituant ainsi une boucle de rétro-action positive ou négative (Rand et al. 1990).

Le concept d'automodulation de la relâche de transmetteurs vient d'études faites sur la transmission neuroeffectrice sympathique (Langer 1974; Brown et Gillespie 1957). L'existence des récepteurs α_2 - et β_2 -adrénergiques présynaptiques situés sur les terminaisons nerveuses sympathiques et leurs implications dans l'automodulation de la transmission adrénérique sont bien établies (Langer 1997). En effet, les récepteurs α_2 -adrénergiques localisés au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques, quant à eux, sont responsables du mécanisme de rétro-action négatif sur la libération de la norépinéphrine neuronale tandis que les récepteurs β_2 -adrénergiques présynaptiques facilitent la relâche de la norépinéphrine (Lefkowitz et al. 1996; Yamaguchi et al. 1977).

Des études réalisées chez le chien anesthésié ont montré qu'une infusion i.v. de l'isoprotérénol, un agoniste sélectif des récepteurs β_2 -adrénergiques, (Foucart et al. 1988) potentialise la libération des catécholamines par les surrénales suite à une stimulation électrique apportée au nerf splanchnique (Koganei et al. 1995). Cette potentialisation a effectivement été inhibée en présence d'un antagoniste sélectif à ces récepteurs, soit le ICI 118551. Toutefois, des résultats contraires ont été obtenus à partir de modèles *in vitro* (Collett et al. 1984; Greenberg et Zinder 1982).

Certaines observations appuient l'hypothèse que les récepteurs α_2 -adrénergiques inhibent la libération des catécholamines par la glande surrénale par un mécanisme de rétro-action négative, notamment chez le bovin (Boonyaviroj et Gutman 1979) et le chien (Foucart et al. 1987). Par contre, d'autres chercheurs n'ont pu confirmer ces résultats (Yamaguchi et Brassard 1988; Sharma et al. 1987). Ces observations contradictoires peuvent être dues au type de stimulation utilisée, par exemple, une stimulation électrique par opposition à une stimulation réflexe, ce qui pourrait expliquer la différence de réponse. Il n'en demeure pas moins qu'il peut y avoir une différence de réponse entre les espèces animales étudiées. De plus, à savoir si la libération d'ACh endogène sur la sécrétion des catécholamines lors d'une stimulation électrique apportée au nerf splanchnique ou réflexe résulte d'une neurotransmission cholinergique (nicotinique et/ou muscarinique) ou peptidergique dans la médullo-surrénale demeure inconnue.

Le concept de rétro-action négatif de la relâche de transmetteurs existe chez d'autres systèmes, comme par exemple, la jonction synaptique cholinergique, dopaminergique, et le système nerveux central (Chesselet 1984; Starke 1981). L'activation des récepteurs D_2 -dopaminergique inhibe la sécrétion des catécholamines médullaires (Sontag et al. 1990).

Modulation hormonale:

Il y a plusieurs substances endogènes qui modulent la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales en agissant sur leurs propres récepteurs localisés à la surface membranaire des cellules chromaffines. Parmi celles-ci, on retrouve des hormones endocrines, locales, et autacoïdes dont l'ANG II, l'ET-1, la bradykinine (BK), la prostaglandine E_2 (PGE_2), et l'acide γ -aminobutyrique

(GABA). Les voies de transduction de ces substances endogènes sont complexes et varient d'une substance à l'autre (Tableau 4).

2.3.2- Régulation de la sécrétion de minéralocorticoïdes

Le cortex surrénalien sécrète différents groupes d'hormones appelées "corticostéroïdes". Ces hormones sont toutes synthétisées à partir du cholestérol. Parmi ces corticostéroïdes, on retrouve deux types d'hormones différentes: les minéralocorticoïdes (aldostérone) et les glucocorticoïdes (cortisol) (Guyton 1991).

Biosynthèse de l'aldostérone:

L'aldostérone, à l'instar des autres corticostéroïdes, est formée principalement à partir du cholestérol absorbé directement de la circulation sanguine par endocytose. Les principales étapes de synthèse sont décrites à la figure 8. La synthèse se fait dans deux organelles distinctes de la cellule, soit la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Chaque étape de la formation de l'aldostérone est catalysée par un système enzymatique spécifique.

Modulation hormonale de la biosynthèse et de la sécrétion de l'aldostérone:

L'aldostérone est un minéralocorticoïde qui régule la concentration des électrolytes (sels minéraux), et particulièrement celles des ions Na^+ et K^+ , dans le sang et les liquides extracellulaires (Marieb et Laurendeau 1992). Bien qu'il existe plusieurs minéralocorticoïdes, l'aldostérone représente plus de 95% de la production de minéralocorticoïdes et est le plus puissant et le plus abondant .

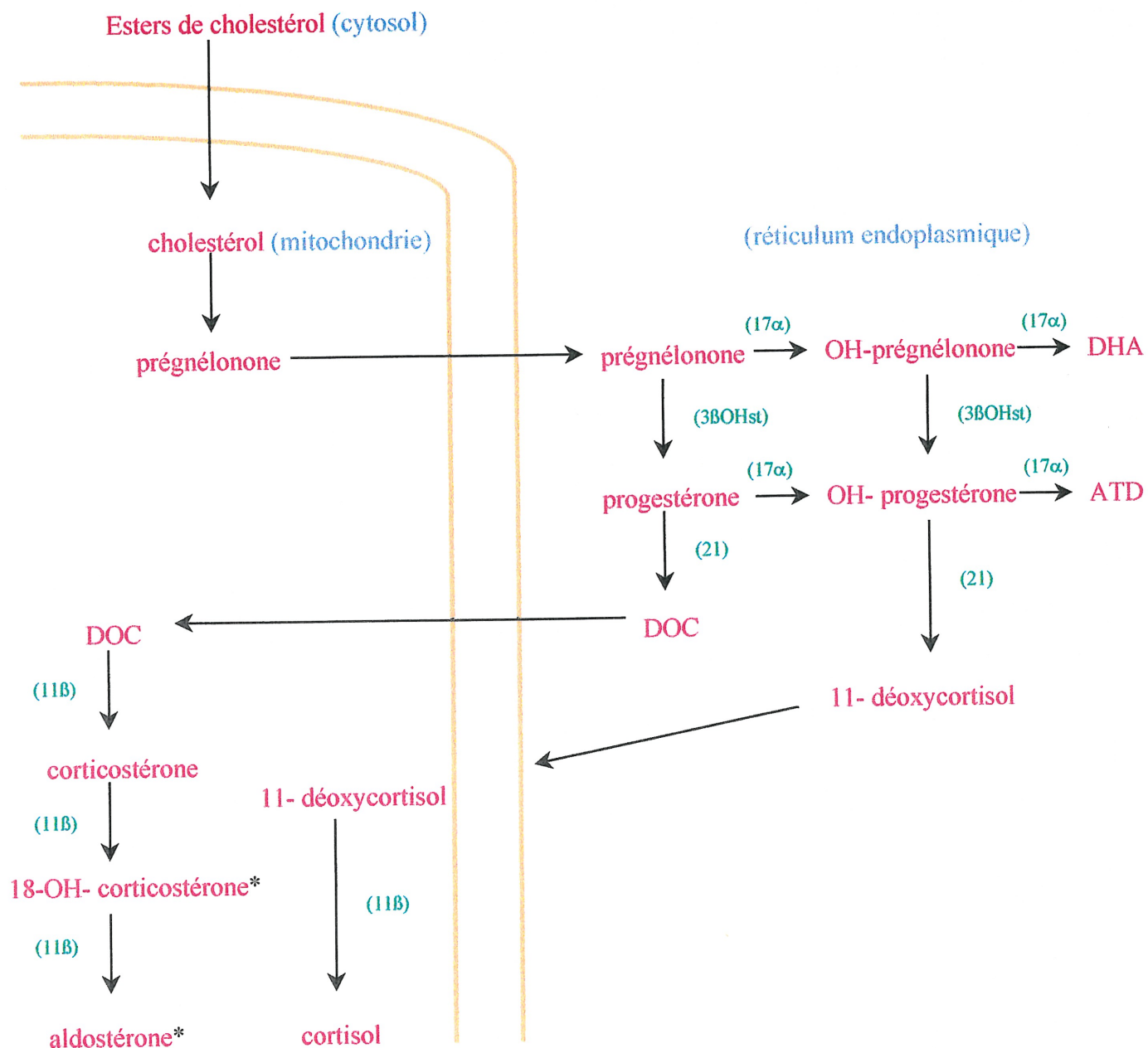


Fig. 8. Principales voies de biosynthèse de l'aldostérone. Les parenthèses désignent des enzymes du cytochrome P450 ou des déhydrogénases. * réactions qui apparaissent seulement au niveau de la zone glomérulée du cortex surrénalien; DOC: déoxycorticostérone; DHA: déhydroépiandrostérone; ATD: androsténédione. Adapté de McNicol (1992).

L'aldostérone, en plus de son action sur la régulation hydroélectrolytique de l'organisme, stimule la biosynthèse des catécholamines par les médullo-surrénales, en stimulant la synthèse des enzymes, telles la PNMT, la tyrosine hydroxylase et la dopamine β -hydroxylase. Comme il y a entremêlement des portions corticale et médullaire, l'aldostérone peut donc traverser le système vasculaire pour ainsi stimuler directement la synthèse des enzymes contenues dans les cellules chromaffines (Hinson 1990).

Plusieurs facteurs ont pour effet de stimuler la sécrétion d'aldostérone: une élévation de la kaliémie, une baisse de la natriurémie, une diminution de la volémie et une baisse de la pression artérielle. Les trois plus importants sécrétagogues de l'aldostérone sont l'ANG II, le K^+ et l'ACTH (Fig. 9). Il y a cinq mécanismes qui président à la régulation complexe de la sécrétion d'aldostérone: le système rénine-angiotensine (SRA), la kaliémie, la natriurémie, la sécrétion d'ACTH (corticotropine) et la concentration plasmatique du facteur natriurétique de l'oreillette (Fig. 10). Les mécanismes de transduction sont, en outre: 1) la régulation du Ca^{2+}_i cytosolique et de l'activité de la PKC via le système PIP2; 2) la formation d'AMP_c; 3) modification du canal ionique; 4) modification du potentiel membranaire; et, 5) la formation de GMP_c. La plupart de ces mécanismes augmentent la phosphorylation d'une variété de protéines intracellulaires conduisant à un changement dans l'activité enzymatique des stéroïdes et de la sécrétion de l'aldostérone (Tableau 5).

2.4- EXOCYTOSE DES CATÉCHOLAMINES MÉDULLAIRES

De nombreuses approches innovatrices ont été utilisées pour étudier en détail le phénomène d'exocytose au niveau des cellules chromaffines. L'utilisation des techniques de "patch-clamp" ont

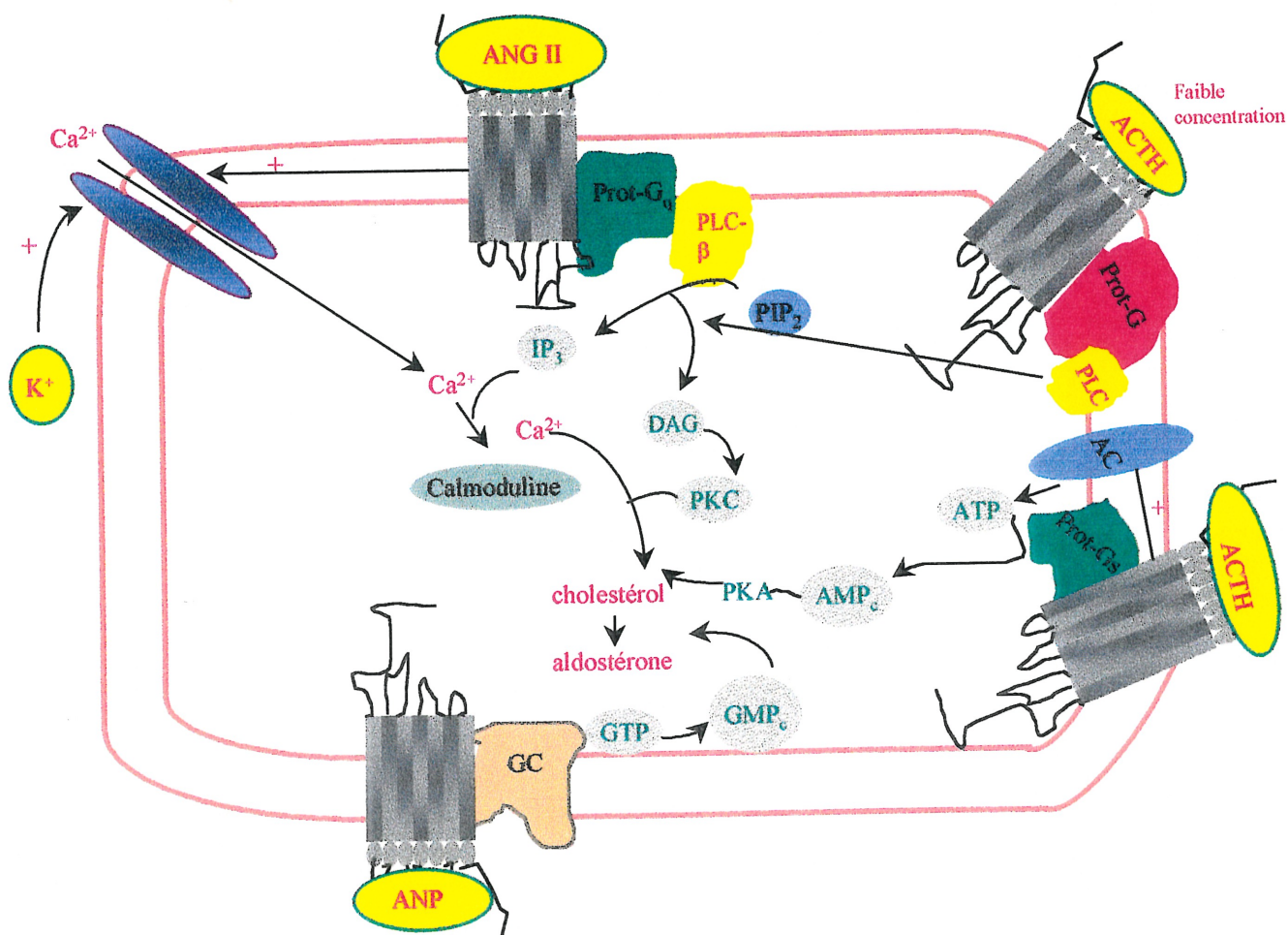


Fig. 9. Représentation schématique des différents mécanismes régulateurs de la sécrétion d'aldostérone. Le K^+ extracellulaire dépolarise la membrane et active le canal Ca^{2+} à voltage dépendant (indiqué par "+"). L'angiotensine II et l'ACTH causent une dépolarisation membranaire pour ensuite activer le canal Ca^{2+} . L'angiotensine II active la PLC via la G_q , et à très forte concentration inhibe l'adényl cyclase via la G_i (protéine G inhibitrice). L'ACTH utilise la voie de la G_s et active la PLC à très faible concentration. Le peptide natriurétique des oreillettes (ANP) augmente le niveau intracellulaire de GMP_c pour favoriser la sécrétion de l'aldostérone. AC: adényl cyclase; GC: guanyl cyclase; calmoduline: calmoduline-dépendante d'une protéine kinase; G_q : protéine G_q stimulant la PLC- β ; G_s : protéine G_s stimulant l'enzyme adényl cyclase; PLC- β : phospholipase de type C- β ; PKC: protéine kinase de type C; PKA: protéine kinase de type A. PIP_2 : phosphatidyl 4,5-biphosphate; IP_3 : inositol 1,4,5-triphosphate; DAG: 1,2-diacylglycérol. Adapté de Quinn et al. 1992.

- Baisse de la volémie
- Baisse de la pression artérielle
- Baisse de la natriurémie
- Hausse de la kaliémie

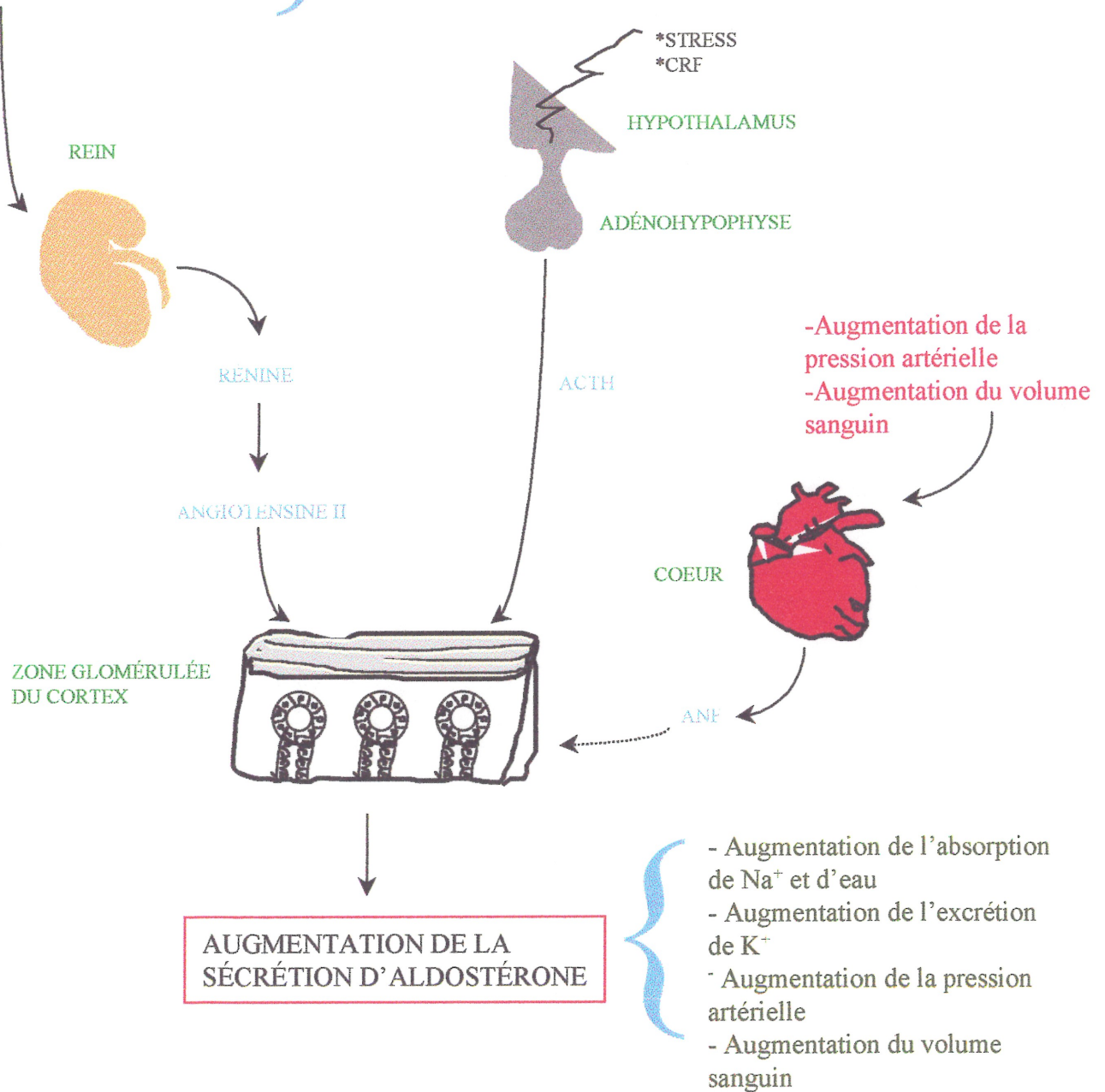


Fig. 10. Principaux mécanismes régulateurs de la sécrétion d'aldostérone. ANF: Facteur natriurétique de l'oreillette; La flèche en pointillé représente l'effet inhibiteur de l'ANF sur la libération de l'aldostérone. Adapté de Marieb et Laurendeau, 1992.

Tableau 5. Mécanismes de transduction de la sécrétion d'aldostérone selon différents sécrétagogues.

| Facteurs Sécrétagogues | Récepteurs | Potentiel membranaire | Flux Ca^{2+} | Ca^{2+} cytosolique | AMP_c | GMP_c | PIP_2 |
|------------------------|------------|-----------------------|----------------|-----------------------|---------|---------|---------|
| ACTH | + | + | + | + / non | + | non | + / non |
| ANG II | + | + | + | + / non | - | non | + |
| K^+ | | + | + | + | + / non | non | + / non |
| Vasopressine | + | + | + | + | non | | + |
| Sérotonine | + | + | non | non | + | | non |

PIP_2 : Phosphatidyl 4,5- biphosphate; +: activation; -: inhibition.

permis de mieux suivre les changements ioniques qui surviennent dans les cellules chromaffines au moment de l'exocytose. La technique d'image vidéo a permis d'observer la distribution spatiale des ions cytoplasmiques, notamment celle du Ca^{2+} lors de l'exocytose (Malhotra et al. 1988).

2.4.1- Réseau cytosquelettique

Le réseau cytosquelettique est principalement responsable de la régulation de l'exocytose dans les cellules chromaffines. En plus de contenir des granules de sécrétions, les cellules chromaffines renferment des protéines cytoplasmiques qui forment un réseau cortical ramifié. À l'état de repos, les granules de sécrétions sont liés à ce réseau, l'empêchant ainsi d'atteindre la membrane cytoplasmique et de limiter l'exocytose. Le concept selon lequel le réseau cytosquelettique agit comme une barrière au passage des granules, évitant ainsi leur fusion à la membrane cytoplasmique, a été proposé par Orci et coll. (1972).

2.4.2- Mouvement des granules sécréteurs

L'entrée massive du Ca^{2+} dans la cellule chromaffine neutralise le réseau cytosquelettique pour favoriser la relâche des granules sécrétrices en permettant leurs ancrages et la réunion de celles-ci avec la membrane cytoplasmique. Ceci permet le déversement du contenu des granules dans la circulation sanguine (Burgoyne 1991). Ce phénomène est appelé exocytose. On peut noter que chaque cellule chromaffine possède environ 30 000 granules de sécrétions (Phillips 1982) et qu'il y a environ 10 000 granules relâchées par exocytose par cellule.

La nicotine, l'ester de phorbol (PMA), le barium, et le K^+ sont tous des agents pharmacologiques qui induisent rapidement la réorganisation du réseau cytosquelettique (Burgoyne 1991). Le Ca^{2+} semble être le principal signal qui contrôle la réorganisation du réseau. Lorsque le Ca^{2+} pénètre dans la cellule chromaffine, l'ion reste confiné sous la membrane plasmique pour être, par la suite, distribué dans tout le cytoplasme. Cette distribution spatiale du cation est ensuite suivie par une mobilisation du Ca^{2+} des sites de stockage intracellulaire, contrôlé soit par le mécanisme de libération de Ca^{2+} induit par le Ca^{2+} (CICR), soit par l' IP_3 .

2.4.3- Protéines cytoplasmiques

L'entrée du Ca^{2+} dans la cellule chromaffine initie différents procédés qui conduisent à l'exocytose, dont le mouvement de la vésicule de sécrétion vers la membrane, l'arrimage de la vésicule à la membrane avant la fusion; et finalement, la fusion de la vésicule à la membrane plasmique (Burgoyne 1991).

Certaines protéines cytoplasmiques ont été récemment identifiées dans les cellules chromaffines, notamment l'annexine I (lipocortine), l'annexine II (calpactine), l'annexine IV et l'annexine VII (synexine). Cette dernière serait responsable de l'agrégation des granules de chromaffines en présence du Ca^{2+} (Creutz et al. 1978). Dans certaines circonstances, cette agrégation par l'annexine VII conduirait à la fusion membranaire de ces granules de sécrétions.

L'annexine II serait impliquée dans l'exocytose. L'annexine II est localisée à la surface interne cytoplasmique de la membrane plasmique (Burgoyne et Cheek 1987). Contrairement aux études de

Creutz et coll. (1978), l'annexine II semble être la seule annexine à provoquer l'agrégation des granules sécrétrices à une concentration du Ca^{2+}_i similaire à celle requise pour activer l'exocytose dans les cellules chromaffines (Drust et Creutz 1988). Le mécanisme proposé est le suivant. A) À l'état de repos, l'annexine II est localisée à la surface de la membrane intracellulaire de la cellule chromaffine. B) Suivant une augmentation du Ca^{2+}_i , l'annexine II forme un pont entre les granules sécréteurs et la membrane cytoplasmique des cellules chromaffines. C) Par la suite, les granules se fusionnent avec la membrane cytoplasmique et le contenu granulaire des vésicules se déverse alors dans la circulation sanguine (Fig 11).

2.5- IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE DES CATÉCHOLAMINES CIRCULANTES

Les catécholamines relâchées par le système nerveux sympathique et la médullo-surrénale sont impliquées dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques. Les catécholamines circulantes ont des effets physiologiques similaires à ceux de la norépinéphrine des terminaisons sympathiques (Hoffman et Lefkowitz 1996). Toutefois, les catécholamines circulantes peuvent stimuler certaines cellules qui ne sont pas innervées par les fibres sympathiques (plaquettes, leucocytes). De plus, il appert dans la plupart des cas, que les récepteurs α_2 - et β_2 -adrénergiques postsynaptiques soient éloignés du site de libération des catécholamines (Hoffman et Lefkowitz 1996). Les catécholamines circulantes, principalement l'épinéphrine libérée des médullo-surrénales, peuvent stimuler ces récepteurs (Cryer 1992). Par exemple, les récepteurs α_2 -adrénergiques postsynaptiques situés sur les plaquettes ne peuvent être atteints par les fibres sympathiques: ils sont plutôt activés par les catécholamines circulantes.

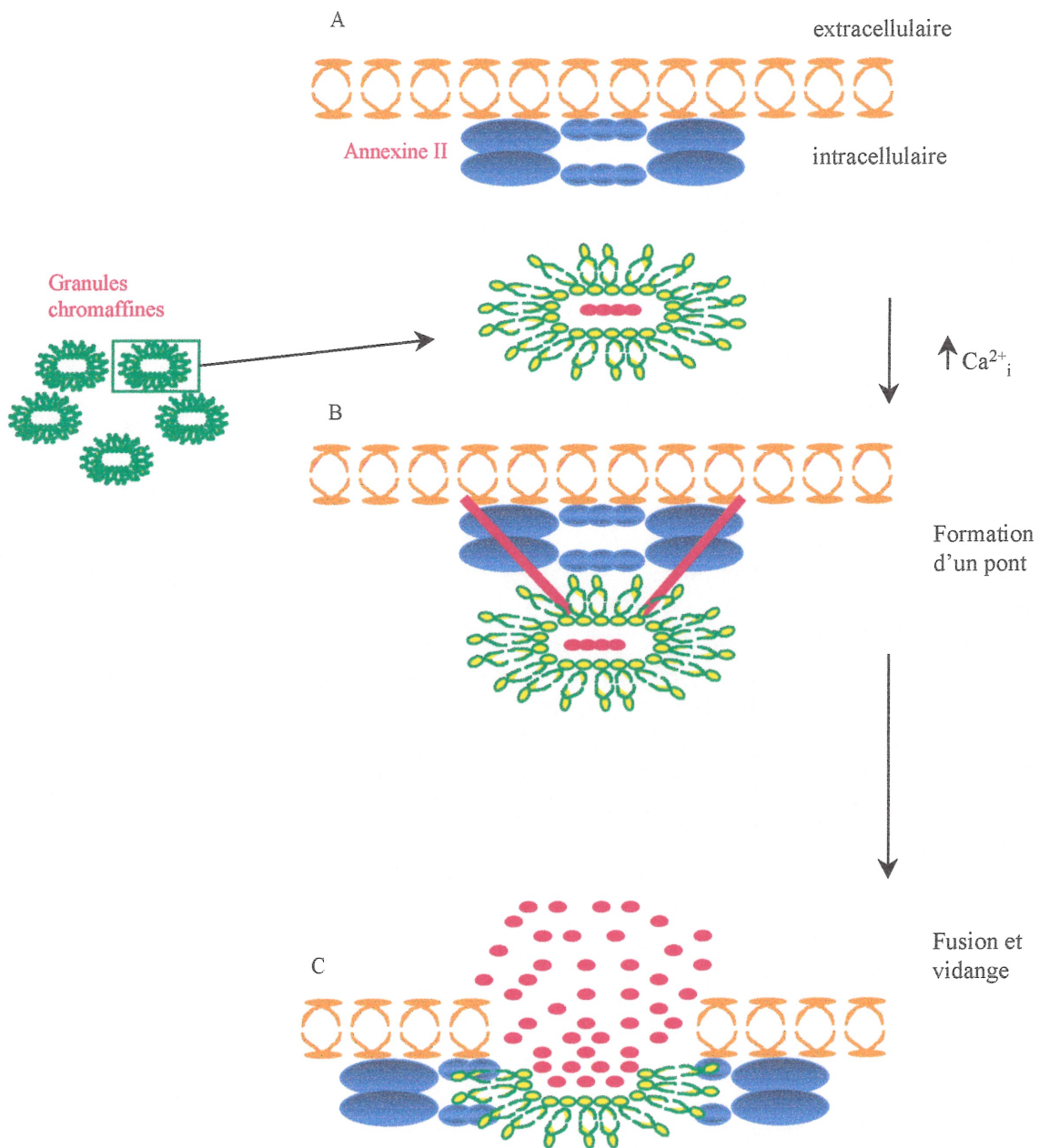


Fig. 11. Mécanisme proposé de l'action de l'annexine II (Calpactine) dans l'exocytose des granules des cellules chromaffines. Adapté de Waisman (1995).

La stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques postsynaptiques produit notamment des effets métaboliques, vasculaires et respiratoires importants. L'épinéphrine libéré de la médullo-surrénale et présente dans la circulation a une affinité de liaison plus élevée que la norépinéphrine envers les récepteurs β_2 -adrénergiques. On croit que les catécholamines circulantes diffusent jusqu'aux récepteurs α_2 - ou β_2 -adrénergiques présynaptiques des fibres sympathiques pour ainsi inhiber ou faciliter la libération de la norépinéphrine contenue dans ces fibres.

2.6- MÉTABOLISME DES CATÉCHOLAMINES CIRCULANTES

La demi-vie apparente d'élimination de l'épinéphrine présente dans l'espace synaptique est d'environ une minute, tandis que celle de la norépinéphrine est approximativement de deux minutes (Péronnet et al. 1988). Dans le même ordre d'idées, la demi-vie des catécholamines qui se trouvent dans la circulation est prolongée de 5 à 10 fois par rapport à celle des terminaisons nerveuses (Hoffman et Lefkowitz 1996). Cette différence dans la demi-vie d'élimination des catécholamines vient du fait que les catécholamines circulantes emploient une voie métabolique qui dépend surtout de la O-méthylation par la COMT, tandis que la capture neuronale y joue un rôle moins important. La COMT est retrouvée en grande quantité dans le rein et son site d'action est principalement à l'extérieur du neurone (extra-neuronale). Ainsi les métabolites respectifs de l'épinéphrine et de la norépinéphrine circulants sont la métanéphrine et la normétanéphrine. Par la suite, ces deux métabolites sont transformés en acide 3-méthoxy-4-hydroxy-mandélique (VMA) (Fig. 6).

Bien que moins importante, la MAO extra-neuronale est également impliquée dans la dégradation des catécholamines circulantes (Fig. 6). Cette enzyme convertit les catécholamines et leur produit O-méthylé en dérivé aldéhyde.

CHAPITRE 3 LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTÉRONÉ

La découverte du SRA a été faite il y a plus d'un siècle, lorsque Tigerstedt et Bergam (1898) ont extrait une substance pressive au niveau du rein. Cette dernière était la rénine. Au cours des années 40, la rénine a été identifiée comme étant une enzyme qui produit l'agent presseur actuel (Braun-Menendez et al. 1940; Page et Helmer 1940), lequel plus tard portera le nom de l'angiotensine. Au cours des années qui ont suivi, d'autres éléments du SRA ont été identifiés et leurs rôles dans la régulation de l'homéostasie cardio-vasculaire et de la balance des fluides ont été caractérisés. Le SRA agit à la fois comme un système hormonal plasmatique et tissulaire (Johnston 1992).

3.1- LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE PLASMATIQUE

Les éléments du SRA tels la rénine, l'angiotensinogène, l'angiotensine I, l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'angiotensine II et ses récepteurs ont été identifiés au niveau de la cellule endothéliale, du muscle lisse vasculaire et de l'adventice (Dzau 1987). Le SRA plasmatique est considéré comme un régulateur aiguë du tonus vasculaire et du maintien de l'homéostasie des électrolytes et des fluides (Johnston 1992; Ganten et al. 1989). Il joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle (Bottari et al. 1993; Johnston 1990).

3.1.1- Biosynthèse de l'angiotensine

La rénine, une enzyme protéolytique produite dans le cortex rénal par les cellules spécialisées de l'artériole afférente du glomérule, détache de son substrat l'angiotensinogène qui est une α_2 -macroglycoprotéine synthétisée par le foie en clivant la liaison Leu¹⁰-Leu¹¹ pour former l'angiotensine

I (Bottari et al. 1993). Ce décapeptide est rapidement hydrolysé en ANG II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui clive la liaison His⁹-Leu¹⁰ de l'angiotensine I (Bottari et al. 1993; Garrison et Peach 1990). L'octapeptide, l'ANG II, est hydrolysé à son tour en petits fragments peptidiques par des peptidases non spécifiques, telles que l'aminopeptidase et l'endopeptidase. La t_{1/2} (demi-vie) plasmatique de l'ANG II est très courte: elle varie entre 15 et 60 sec (Van Kats et al. 1997; Johnston 1990). Les produits de dégradation sont, en outre, l'angiotensine III, l'angiotensine IV (angiotensine II [3-8]) et l'angiotensine II (1-7), et ils semblent tous avoir des activités biologiques (Swanson et al. 1992; Schiavone et al. 1990; Garrison et Peach 1990) (Fig. 12). L'ANG II est détectée au niveau plasmatique et tissulaire même lorsque l'ECA est inhibée (Mento et Wilkes 1987), ce qui suggère que d'autres enzymes sont impliquées dans la synthèse de l'ANG II. Par exemple, la chymase a été identifiée dans le coeur chez l'homme (Urata et al. 1996). Cette dernière est une endopeptidase qui convertit l'ANG I en ANG II et hydrolyse la liaison Phe⁸-His⁹ du décapeptide. Cependant, cette chymase ne forme pas l'ANG II directement à partir de l'angiotensinogène, comme ce peut être le cas avec la tonine, cathepsine, trypsine et la kallikréine (Campbell 1987). En plus de la rénine, plusieurs autres enzymes peuvent être impliquées dans le clivage de l'angiotensinogène en ANG I. Ces enzymes sont la cathepsine D, pepsine, et les protéases (Campbell 1987) (Fig. 12).

3.2- LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE TISSULAIRE

Depuis les années 80, on a démontré que certains tissus contenaient tous les éléments de la cascade enzymatique du SRA et avaient la capacité de former l'ANG II. Le SRA tissulaire a été identifié à la suite d'études réalisées *in vitro* dans le coeur (Lindpainter et Ganten 1991; Dzau 1987), le cerveau

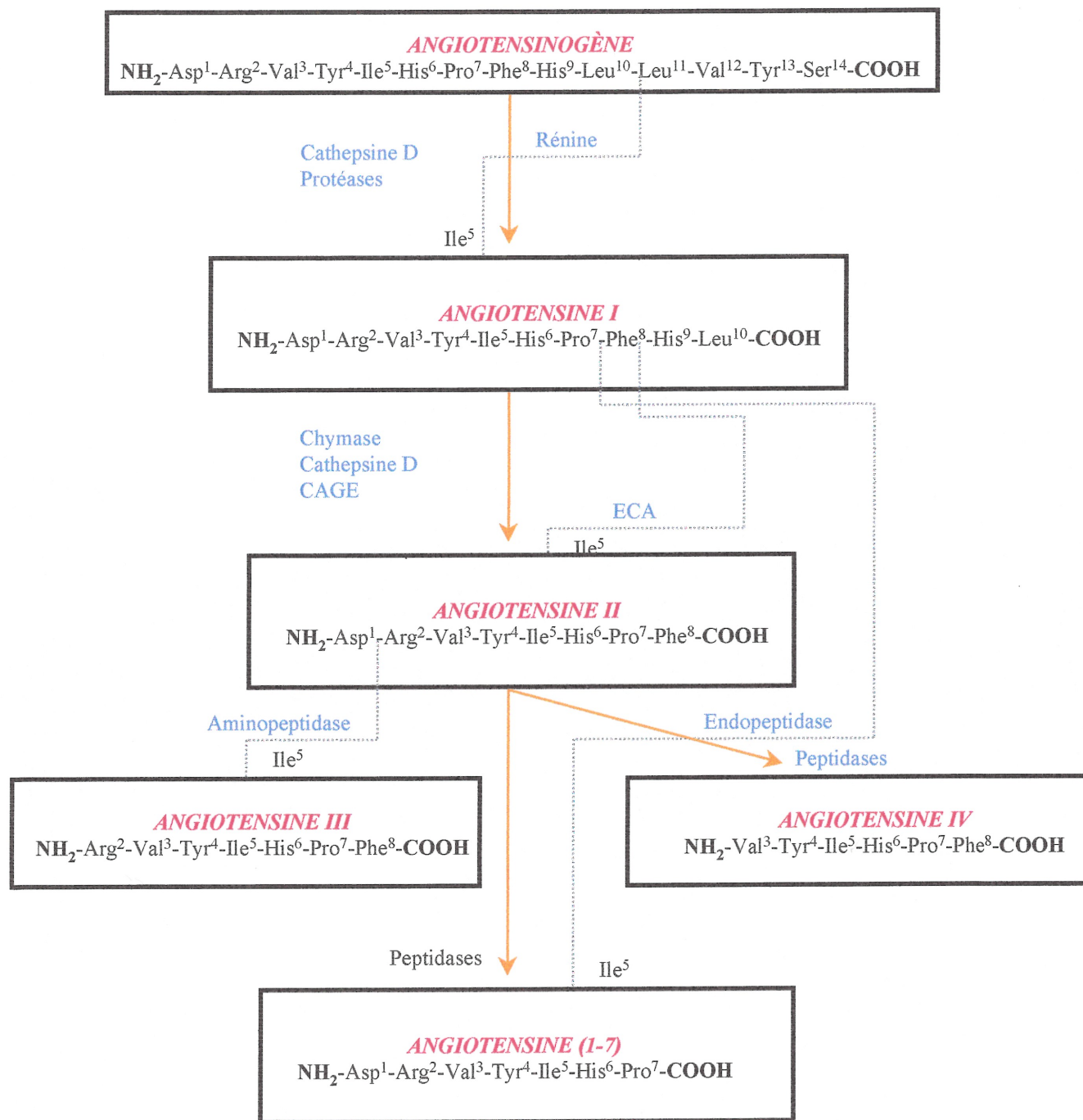


Fig. 12. Biosynthèse et dégradation de l'ANG II. Les flèches indiquent la voie classique de formation de l'ANG II tandis que les lignes en pointillé représentent les voies mineures alternatives. CAGE: chymostatine-sensible à l'angiotensine; ECA: enzyme de conversion à l'angiotensine; Ile⁵: acide aminé Isoleucine en position 5. Adapté de Jackson et Garrison, 1996.

(Saavedra 1992; Unger et al. 1988), le rein (Levens et al. 1981), les tissus reproducteurs (Speth et Husain 1988; Pandey et al. 1984) ainsi que dans la glande surrénale (Danser 1996). Le SRA tissulaire favorise le maintien du tonus vasculaire et du débit sanguin, la régulation des fluides et du Na⁺, ainsi que la modulation du système nerveux sympathique et de la structure cardio-vasculaire (Jonhston 1992). L'activité de l'ECA est augmentée en présence d'hypertrophie vasculaire et cardiaque, où l'administration des inhibiteurs de l'ECA amène une régression de l'hypertrophie suggérant que les effets bénéfiques de ces agents soient reliés à l'inhibition du SRA tissulaire (Urata et al. 1995; Jonhston 1992).

Bien que les éléments composant le SRA tissulaire aient été caractérisés, la régulation de la production locale d'ANG II et l'importance physiologique de ce système ne sont pas bien comprises. Le SRA plasmatique peut jouer un rôle dans la production locale d'ANG II (Jonhston 1990) (Fig. 13). Les composés tels que la rénine, l'angiotensinogène et l'ECA peuvent être captés par endocytose et utilisés pour la synthèse locale d'ANG II. Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) tissulaire d'ANG II varie de 15 à 30 minutes alors que la $t_{1/2}$ plasmatique est moins d'une minute (Van Kats et al. 1997). Dans la plupart des tissus, il est difficile de déterminer la contribution relative du SRA tissulaire et plasmatique dans la production de l'ANG II.

3.3- EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'ANGIOTENSINE II

3.3.1- Muscle lisse vasculaire et le coeur

Il est bien connu que l'ANG II participe au maintien de la résistance vasculaire périphérique et à la

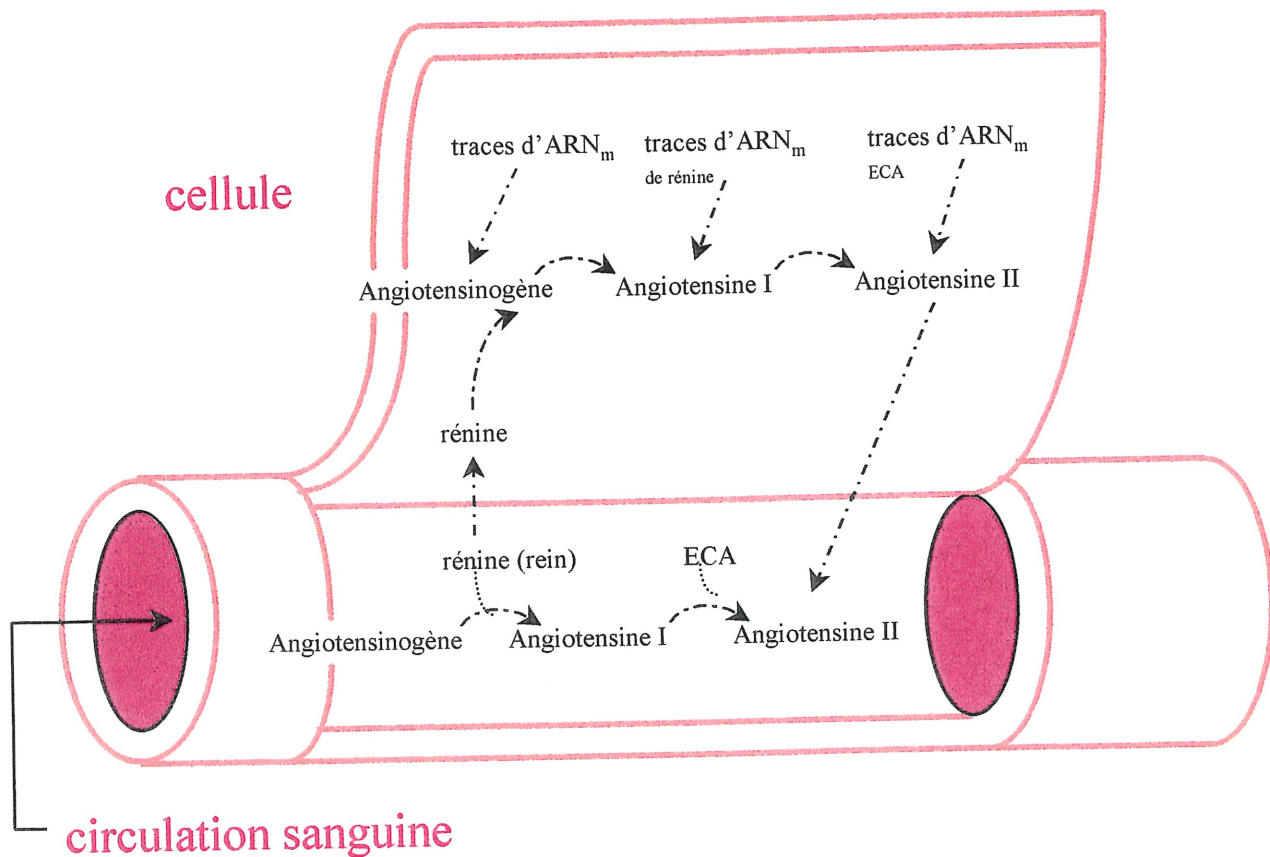


Fig. 13. Représentation schématique du système rénine-angiotensine plasmatique et tissulaire. ECA: enzyme de conversion à l'angiotensine; ARN_m: acide ribonucléique messager. Adapté de Johnston (1992).

pression sanguine. C'est un puissant vasoconstricteur agissant directement sur les cellules du muscle lisse vasculaire (Bottari et al. 1993; Jonhston 1990). L'ANG II facilite la contraction neurogénique en augmentant la relâche de la norépinéphrine à partir de la terminaison nerveuse sympathique (Peach et Dostal 1990). Il y a des différences au niveau de certains lits vasculaires quant à la vasoconstriction engendrées par l'ANG II (Bottari et al. 1993). Par exemple, les vaisseaux sanguins dans les territoires mésentérique, rénale et cutanée répondent à de faibles doses d'ANG II, tandis que ceux du cerveau, du poumon et des muscles squelettique répondent à de plus fortes doses. L'ANG II possède également des effets pléiotropiques et contribue à l'hypertrophie (Holycross et al. 1993; Timmermans et al. 1993; Berk et al. 1989; Geisterfer et al. 1988) et à l'hyperplasie (Timmermans et al. 1993; Campbell-Boswell et Robertson 1981) vasculaires. Dans le coeur, l'ANG II a des effets inotropes et chronotropes positifs (Jonhston 1990). Il augmente l'influx de Ca^{2+} dans les myocytes par le canal Ca^{2+} voltage dépendant (Bottari et al. 1993).

3.3.2- Rein et tractus gastro-intestinal

Etant donné son effet sur la pression artérielle et sur la résistance vasculaire de l'artère rénale, l'ANG II contrôle le taux de filtration glomérulaire et l'hémodynamie rénale. L'ANG II influence également la réabsorption tubulaire et la perméabilité glomérulaire (Bottari et al. 1993; Jonhston 1990; Garrison et Peach 1990). Une réponse typique inclut un effet antidiurétique et antinatriurétique. À faibles doses (i.e. 10^{-12} - 10^{-10} M), l'ANG II stimule l'absorption du Na^+ , tandis qu'à fortes doses (10^{-7} - 10^{-5} M) elle l'inhibe (Bottari et al. 1993).

L'ANG II à faibles doses stimule l'absorption du Na⁺ et de l'eau dans l'intestin alors qu'à fortes doses il inhibe leur absorption.

3.3.3- Le système nerveux autonome

L'ANG II interagit avec le système nerveux autonome. Elle augmente la relâche de la norépinéphrine (NE) par les nerfs sympathiques et augmente la sensibilité de la membrane postsynaptique aux effets de la NE (Nagase et al. 1996; Brasch et al. 1993; Szabo et al. 1990; Palaic et Khairallah 1967). De plus, l'ANG II peut aussi dépolariser les cellules chromaffines conduisant à la relâche des catécholamines (Peach 1977; Bickerton et Buckley 1961). L'effet vasoconstricteur de l'ANG II, qui représente la principale réponse à l'ANG II, est favorisé par une augmentation simultanée de l'activité du système nerveux sympathique. L'ANG II exerce également un effet vasoconstricteur indirect, influençant ainsi la pression artérielle par une augmentation du débit central (*outflow*) sympathique et par la relâche de catécholamines (Bickerton et Buckler 1961).

3.3.4- Le cerveau

L'action centrale de l'ANG II participe aussi à la régulation de l'homéostasie des fluides. L'administration intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v.) de l'ANG II élève la pression sanguine et induit à la fois le désir de boire et l'appétit sodée (Saavedra 1992; Phillips 1987). L'ANG II administré à très faibles doses au niveau du SNC induit une natriurèse (Bottari et al. 1993; Saavedra 1992) et stimule la relâche de l'hormone adrénocorticotropine (ACTH) par l'hypophyse antérieure (adénohypophyse). L'administration de l'ANG II dans le cerveau augmente la pression sanguine en augmentant l'activité sympathique et la relâche de la vasopressine à partir de l'hypophyse postérieure (neurohypophyse),

où elle exerce une vasoconstriction et une inhibition des baroréflexes (Saavedra 1992; Phillips 1987). Elle stimule également la relâche d'oxytocine et de prolactine par l'hypophyse, et peut participer aux effets de l'hormone lutéinisante.

3.3.5- La glande surrénale

La médullo-surrénale:

L'ANG II augmente la sécrétion basale des catécholamines chez le rat (Belloni et al. 1998; Wong et al. 1990), le chien (Robinson 1967), et le bovin (Cheek et al. 1993; Powis et O'Brien 1991; Stauderman et Pruss 1989; Bunn et Marley 1989). L'effet sécréteur de l'ANG II est assuré par la stimulation des récepteurs AT_1 localisés à la surface membranaire de la cellule chromaffine. La stimulation du récepteur AT_1 amène une augmentation du Ca^{2+}_i via le canal Ca^{2+} de type-L sensible aux dihydropyridines. Les catécholamines ainsi relâchées par la glande surrénale stimulent le coeur et contribuent à l'élévation de la pression artérielle (Garrison et Peach 1990).

Le cortex surrénalien:

L'ANG II est un important régulateur de la sécrétion d'aldostérone durant les changements du volume extracellulaire ou de la balance sodée (Wang et al. 1998; Aguilera 1992; Balla et al. 1991; Pratt et McAteer 1989). L'aldostérone agit sur le rein pour mener à une rétention du Na^+ et à une excrétion des ions K^+ et H^+ . En plus de ces effets sécréteurs sur la médullo-surrénale, l'ANG II stimule la sécrétion d'aldostérone via les récepteurs AT_1 *in vitro* (Wang et al. 1998; Belloni et al. 1998; Breidert et al. 1996; Timmermans et al. 1993; Bottari et al. 1993; Aguilera 1992; Balla et al. 1991; Johnston 1990; Saltman et al. 1976; Fredlund et al. 1975) et *in vivo* (Bravo et al. 1975; Ganong et al. 1962).

Au cours des années 60 et 70, on ne parlait pas encore des récepteurs AT₁, mais on disait que l'ANG II exerçait un effet sur la corticosurrénale qui menait à la sécrétion d'aldostérone. On sait maintenant que cette sécrétion d'aldostérone a lieu lorsque les récepteurs AT₁ sont stimulés par l'ANG II.

Interaction médullo-cortex:

Il existe plusieurs évidences à l'effet que la médullo-surrénale exerce un contrôle paracrine sur l'activité sécrétagogue du cortex en relâchant ses catécholamines (Vinson et al. 1994; Hinson 1990). La découverte de ce mécanisme paracrine est basée sur l'abondance d'entremêlements entre les tissus médullaires et corticales (Bornstein et al. 1992; Gallot-Payet et al. 1987). La colocalisation morphologique des cellules corticales et médullaires supportent l'hypothèse que la médullo-surrénale contrôle les sécrétions de la corticosurrénale (Hinson 1990). On a suggéré que plusieurs peptides tels que le VIP (Hinson 1990, Hinson et al. 1992, Mazzocchi et al. 1993), le NPY (Bernet et al. 1994) et le PACAP (Néri et al. 1996) stimulent la sécrétion d'aldostérone via la relâche des catécholamines agissant sur les récepteurs β -adrénergiques. De plus, plusieurs auteurs ont démontrés *in vitro* que l'interleukine-1 stimule la sécrétion des catécholamines, qui, en retour, produit une libération de corticostérone via les récepteurs α -adrénergiques (O'Connell et al. 1994; Gwosdow et al. 1992). Ces résultats suggèrent l'existence des récepteurs α - et β -adrénergiques dans la cortico-surrénale.

3.4- ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DES AUTRES ANGIOTENSINES

3.4.1- Angiotensine I

L'angiotensine I est relativement inactive. Sa puissance sur le muscle lisse, le coeur et le cortex surrénalien représente moins de 1% de la puissance de l'ANG II (Garrison et Peach 1990). Par contre,

dans les artères utéroplacentaires humain, l'angiotensine I à forte concentration (10 μ M) induit une vasoconstriction indépendamment de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Svane et al. 1995).

3.4.2- Angiotensine III

L'ANG III est un produit de dégradation de l'ANG II (Chansel et Ardaillou 1998; Yang et al. 1995). Lorsque l'ANG II est métabolisée en ANG III, elle conserve la plupart de son activité biologique. L'ANG III est presque aussi puissante que l'ANG II pour stimuler la sécrétion d'aldostérone et de l'appétit sodé (Garrison et Peach 1990). Par contre, son activité sur la médullo-surrénale est environ 10% de celle de l'ANG II. De plus, L'ANG III a environ 10-50% de l'activité pressive de l'ANG II lorsqu'elle est administrée de façon i.c.v. (Fink et Bruner 1985). Cet effet serait assuré par les récepteurs AT₁ (Radhakrishnan et Sim 1994; Chansel et Ardaillou 1998). Cette plus faible activité de l'ANG III est due à la fois à une plus faible affinité de ce peptide pour les sites de liaison de l'ANG II et à une dégradation plus rapide. Ce catabolisme accéléré résulte d'une très grande distribution de l'aminopeptidase N, qui est responsable du métabolisme de l'ANG III en ANG IV (Chansel et Ardaillou 1998).

L'ANG III exerce un effet chronotrope positif via la stimulation des récepteurs AT₁ (Li et al. 1996). Par contre, l'angiotensine III est 9 fois moins puissante que l'ANG II. L'ANG III a un effet contractile au niveau de l'aorte du rat et cette réponse est assurée par la stimulation des récepteurs AT₁ (Li et al. 1995). Enfin, l'ANG III participe, en partie, à l'équilibre des fluides, et influence les fonctions cardio-vasculaires (Yang et al. 1995).

3.4.3- Angiotensine (1-7)

L'ANG II (1-7) a été identifiée dans le plasma et dans de nombreux tissus de divers espèces. Chez l'homme, sa concentration est égale ou même supérieure à celle de l'ANG II. L'ANG II (1-7) est d'ailleurs considérée comme étant le produit principal du métabolisme de l'ANG I chez l'homme, le chien, et le porc (Kohara et al. 1991; Stephenson et Kenny 1987). De plus, sa concentration plasmatique augmente en présence d'un antagoniste AT₁ (Moriguchi et al. 1994) ou en présence d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Luque et al. 1996).

L'ANG II (1-7) est un peptide biologiquement actif, doué de propriétés distinctes de l'ANG II et souvent opposées. Ces effets sont contrôlés par un récepteur spécifique et différent des récepteurs AT₁ et AT₂ requérant la formation initiale de prostaglandines ou d'oxyde nitrique. En effet, les caractéristiques des récepteurs de l'ANG II (1-7) ont été décrites récemment à partir de cellules endothéliales aortiques bovines (Tallant et al. 1997). La liaison est de haute affinité (20 nM) et est inhibée par la D-Ala⁷-ANG II (1-7) et par la SAR¹-THR⁸-ANG II, mais elle n'est pas affectée par la présence d'antagonistes AT₁ ou AT₂. Ce fragment peptidique a plusieurs effets au niveau du cerveau, du rein et des vaisseaux.

Il se comporte, à l'inverse de l'ANG II, comme un vasodilatateur dans de nombreux lits vasculaires (Chansel et Ardaillou 1998; Pörsti et al. 1994). L'ANG II (1-7) s'oppose également aux effets prolifératifs de l'ANG II. En effet, il inhibe la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (Freeman et al. 1996).

L'ANG II (1-7) stimule la sécrétion de l'ADH. Une microinjection dans le cerveau cause une bradycardie et une hypotension (Schiavone et al. 1990). De plus, chez les rats transgéniques, pour le gène mRen-2, l'administration centrale d'anticorps anti-ANG II (1-7) provoque des effets hypertensifs, alors que les anticorps anti-ANG II sont hypotensifs (Moriguchi et al. 1995).

Dans le rein, ce peptide induit une diurèse et une natriurèse ainsi qu'une augmentation du taux de filtration glomérulaire, sans affecter la résistance vasculaire rénale (Handa et al. 1996a; Dellipizzi et al. 1994). Tous ces effets causés par l'angiotensine (1-7) vont à l'opposé de ceux de l'ANG II et de l'angiotensine III. De ce fait, l'angiotensine (1-7) semble être un antagoniste de l'angiotensine II (Santos 1994).

3.4.4- Angiotensine IV

L'ANG IV, connu depuis longtemps, est un métabolite de l'ANG II et de l'ANG III. Elle a été mesurée dans la circulation sanguine chez l'homme et chez le rat à des concentrations plus faibles que celles de l'ANG II (Cain et al. 1969). L'ANG IV (connu également sous le nom de l'ANG II [3-8]) a des effets au niveau central et périphérique (Moeller et al. 1996; Wright et al. 1993). L'ANG IV contrôle les fonctions cognitives incluant l'apprentissage, la mémoire, et le comportement exploratoire (Wright et al. 1993). De plus, l'ANG IV stimule la synthèse d'ADN et d'ARN dans les fibroblastes cardiaques (Wang et al. 1995), mobilise le Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules du muscle lisse vasculaire (Dostal et al. 1990) et cause une artériodilatation corticale chez le rat (Swanson et al. 1992).

L'ANG IV joue aussi un rôle dans la régulation de la croissance des cellules endothéliales des artères coronaires (Hall et al. 1995). De plus, dans les cellules endothéliales, l'ANG IV induit la production de l'activateur de l'inhibiteur de type 1 du plasminogène (PAI-1), un effet attribué auparavant à l'ANG II (Kerins et al. 1995).

Finalement, dans le rein, Handa et coll. (1996b) ont montré que l'ANG IV inhibe le transport du Na⁺ dans le tube proximal.

3.5- LES RÉCEPTEURS À L'ANGIOTENSINE

On a cru longtemps qu'il n'existait qu'un seul sous-type de récepteur à l'ANG II, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Récemment, de nouveaux agents pharmacologiques ont permis d'identifier différents types de récepteurs. Le DuP 753 (connu sous le nom de losartan) et le PD 123177 ont permis d'identifier, respectivement, deux récepteurs distincts à l'ANG II, soit les récepteurs AT₁ et AT₂ (Timmermans et al. 1993). La majorité des effets physiologiques connus de l'ANG II sont contrôlés par la stimulation des récepteurs AT₁, tandis que le rôle physiologique des récepteurs AT₂ demeure obscur. Il existe également d'autres types de récepteurs à l'angiotensine: les récepteurs AT₃ (Unger et al. 1996; Chaki et Inagami 1992) et AT₄ (Unger et al. 1996; Swanson et al. 1992).

3.5.1- Le récepteur AT₁

Les récepteurs AT₁ sont abondamment distribués (Timmermans et al. 1993; Bottari et al. 1993). Ces récepteurs ont été identifiés dans le foie, le poumon, le rein, l'aorte, le coeur, le cerveau et la glande surrénale. Les récepteurs AT₁ ont été clonés à partir de culture de cellules glomérulées de bovin (Sasaki et al. 1991) et de cellules musculaire lisse (Murphy et al. 1991). Ils appartiennent à la classe des récepteurs couplés aux protéines G ayant un domaine à 7 passages transmembranaire. Ils sont constitués de 359 acides aminés et possèdent un poids moléculaire approximatif de 41,000 daltons. Les récepteurs AT₁ chez l'homme (Takayanagi et al. 1992; Bergsma et al. 1992) ont environ 94% d'homologie avec ceux retrouvés chez le lapin, le rat, le cochon, et le chien. Jusqu'à maintenant, deux sous sous-types de récepteurs AT₁ ont été identifiés chez le rat, soit AT_{1A} et AT_{1B} (Inagami et al. 1994; Timmermans et al. 1993). La séquence d'acides aminés entre ces deux sous-types est identique à plus de 96%. Le récepteur AT_{1A} est présent dans les tissus vasculaires et rénaux du rat, tandis que le récepteur AT_{1B} est surtout concentré dans la glande surrénale et l'hypophyse.

Rôles physiologiques:

La majorité des effets physiologiques connus de l'ANG II sont contrôlés par les récepteurs AT₁. Parmi ces effets, on retrouve la vasoconstriction, la facilitation de la transmission sympathique, la rétention d'eau et de sel et enfin, les effets prolifératifs sur les cellules du muscle lisse vasculaire (Unger et al. 1996). Plusieurs études *in vitro* effectuées avec la glande surrénale isolée et perfusée, ainsi que sur des cellules en cultures du rat (Belloni et al. 1998; Wong et al. 1990), du chien (Robinson 1967), et du bovin (Cheek et al. 1993; Powis et O'Brien 1991; Stauderman et Pruss 1989; Bunn et Marley 1989), ont montré que l'ANG II augmente à la fois la sécrétion basale des

catécholamines et de l'aldostérone via la stimulation des récepteurs AT₁.

Voies de signalisations:

La liaison de l'ANG II à son récepteur AT₁ stimule plusieurs voies de signalisation. La voie la plus classique est celle où le récepteur AT₁, couplé à une protéine G_{q/11}, active la phospholipase C β qui hydrolyse le phosphatidyl-inositol diphosphate (PIP₂) en DAG et en IP₃. Le DAG active une PKC qui, de concert avec le Ca²⁺_i relâché à partir du réticulum endoplasmique (RE), mène, en outre, à la contraction du muscle lisse (Clauser 1998; Timmermans et al. 1993; Bottari et al. 1993). L'IP₃ stimule la relâche du Ca²⁺ contenu dans le RE. Ce Ca²⁺_i stimule à son tour un canal Cl⁻ à basse conductance pour permettre la sortie de ces ions à l'extérieur de la cellule et cause une dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation active le canal Ca²⁺ à voltage-dépendant (VDCC), causant ainsi une augmentation du Ca²⁺_i, pour enfin mener aux réponses physiologiques. De plus, l'activation du récepteur AT₁ active d'autres protéines G et effecteurs tels que l'adényl cyclase et les phospholipases A₂, C et D. L'autre voie de signalisation intracellulaire est l'ouverture du canal Ca²⁺ à voltage-dépendant, contrôlée via la stimulation du récepteur AT₁ par l'ANG II. Ce mécanisme est appelé canaux Ca²⁺ opérés par des récepteurs (ROCC) ou "*receptor-operated Ca²⁺ channel*" d'où la stimulation du récepteur AT₁ permet l'ouverture de ce canal (Fig. 14). Lorsque le récepteur AT₁ stimule l'ouverture du canal par un mécanisme encore mal compris (Hughes 1998; Timmermans et al. 1993), il y a une entrée de Ca²⁺ à l'intérieur de la cellule causant les réponses physiologiques. Les récepteurs AT₁ contrôlent également les canaux Cl⁻, K⁺, Na⁺ et Ca²⁺ (Lassègue et al. 1994).

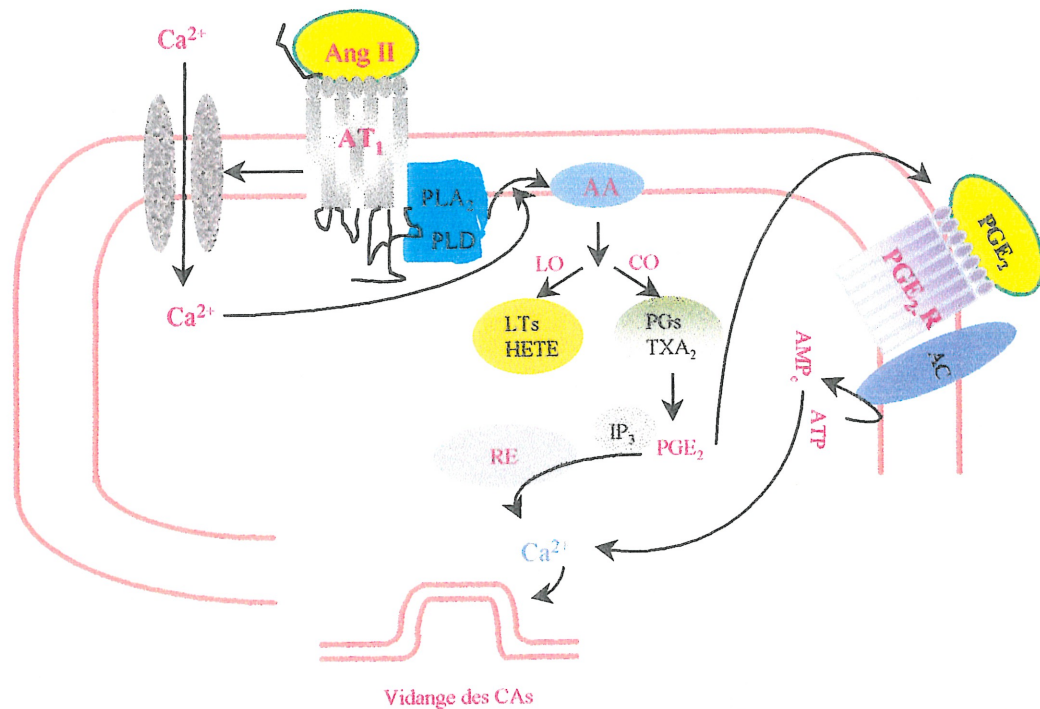
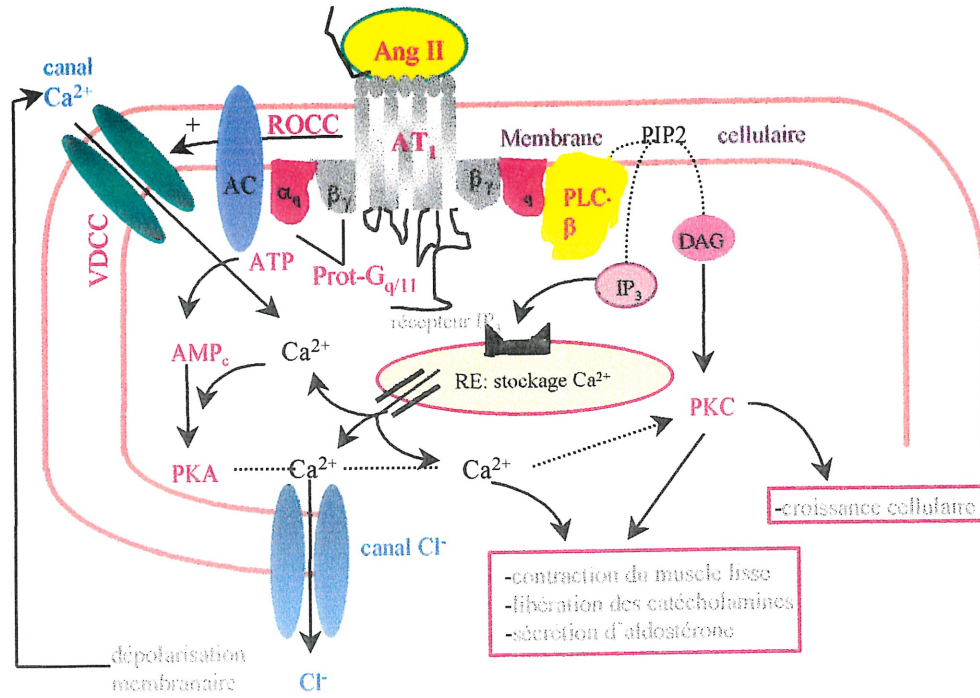


Fig. 14. Mécanisme du couplage récepteur AT_1 - effecteur. Ang II: angiotensine II; α_q et β représentent les sous-unités de la protéine $G_{q/11}$; AA: acide arachidonique; AC: adénylate cyclase; ATP: adénosine triphosphate; AMP_c : adénosine monophosphate cyclique; CAS: catécholamines; CO: Cyclooxygénase; DAG: 1,2-diacylglycérol; LO: lipooxygénase; LTs: leucotriènes; PGE_2 : prostaglandines E_2 ; PGs: prostaglandines; PIP_2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate; IP_3 : 1,4,5-inositol triphosphate; PKA, PKC: protéine kinase A, C; PLC- β , A_2 , D: phospholipase C- β , A_2 , D; RE: réticulum endoplasmique; ROCC: récepteur opéré par le canal Ca^{2+} ; TXA_2 : tromboxane A_2 ; VDCC: canal Ca^{2+} dépendant du voltage. Adapté de Timmermans et al. 1993.

3.5.2- Le récepteur AT₂

Les récepteurs AT₂ se retrouvent dans plusieurs tissus tels que l'aorte, le cerveau, le coeur, et la glande surrénale (Timmermans et al. 1993; Bottari et al. 1993). La distribution et le nombre de ces récepteurs varient grandement en fonction de l'espèce et de l'organe étudié. Les récepteurs AT₂ ont été clonés à partir de la cellule PC12W (Kambayashi et al. 1993) et cellules foetales du rat (Mukoyama et al. 1993). Chez le rat, les récepteurs AT₂ sont constitués de 363 acides aminés et d'un domaine à 7 passages transmembranaire. Ils possèdent 35% d'homologie avec les récepteurs AT₁. Les récepteurs AT₂ ont également été clonés chez l'homme à partir de cellules placentaires (Tsuzuki et al. 1994) et de leucocytes (Koike et al. 1994). Ces récepteurs sont constitués de 363 acides aminés et possèdent un fort degré d'homologie avec ceux retrouvés chez le rat. Il existe une hétérogénéité des récepteurs AT₂. En effet, Tsutsumi et coll. (1992) ont rapporté l'existence de deux sous-types de récepteurs AT₂: soit AT_{2A} stimulé par les guanines nucléotides ou la toxine pertussique et AT_{2B} qui ne répond pas à ces stimuli.

Rôles physiologiques:

Le rôle physiologique des récepteurs AT₂ est loin d'être bien compris. Les résultats de plusieurs travaux de recherche suggèrent un rôle de ce récepteur dans la transmission des effets antiprolifératifs et apoptotiques de l'ANG II (Li et al. 1998; Gallinat et al. 1997; Bedecs et al. 1997; Meffert et al. 1996; Yamada et al. 1996; Nakajima et al. 1995). L'ANG II augmente la sécrétion du cortisol par la stimulation des récepteurs AT₂ (Defaye et al. 1995). De plus, deux études plus récente suggèrent que le récepteur AT₂ serait également impliqué dans la sécrétion des catécholamines médullaires induite par l'ANG II (Belloni et al. 1998; Mazzocchi et al. 1998).

Voies de signalisations:

Bien que ces récepteurs aient été clônés, la voie de transduction du signal est loin d'être bien comprise. Les récepteurs AT_2 appartiennent à la famille des récepteurs à 7 passages transmembranaires (Mukoyama et al. 1993). Malgré qu'ils y aient plusieurs évidences supportant un couplage entre les récepteurs AT_2 et les protéines G (Inagami 1999; Zhan et Pratt 1996; Kang et al. 1994), il demeure encore controversé de parler de ce genre de couplage (Mukoyama et al. 1993). Une autre étude a proposé que le signal de ce type de récepteurs se fait via la stimulation d'une tyrosine phosphatase (Bottari et al. 1992). Mukoyama et coll. a montré que la stimulation du récepteur AT_2 assuré par l'ANG II ne modifie ni les niveaux cytosoliques du GMP_c ni ceux de l' AMP_c , tandis que d'autres ont montré que l'ANG II réduit le niveau basal du GMP_c (Brechler et al. 1993; Sumners et al. 1991). Il reste donc beaucoup à faire pour une meilleure compréhension des voies de transduction de ces récepteurs.

3.5.3- Le récepteur AT_3

Ce récepteur a été découvert à partir de neuroblastomes de souris par Chaki et Inagami en 1992. Selon ces derniers, les sites AT_3 semblent être clairement distincts des sites AT_1 , AT_2 , et AT_4 . Par contre, d'autres études ont montré que l'ANG III exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire des récepteurs de l'ANG II, soit les récepteurs AT_1 (Zini et al. 1996; Vatta et al. 1992).

Rôles et voies de signalisations:

Sur certains tissus, l'ANG III est aussi actif que l'ANG II. On peut citer le cas de l'activité stéroïdogénique de l'ANG III dans le cortex surrénalien, qui est égale à celle de l'ANG II (Goodfriend et Peach 1975). Les récepteurs AT_3 contrôlent la formation du GMP_c par l'activation d'une guanyl cyclase (Chaki et Inagami 1993). Très peu d'études ont été faites afin d'élucider les voies de signalisation ainsi que le rôle physiologique de ce récepteur.

3.5.4- Le récepteur AT_4

Ces nouveaux sites de liaison, nommés "récepteurs AT_4 " (Wright et Harding 1994), sont spécifiques à l'angiotensine IV (qui est un produit naturel de dégradation de l'ANG II) et ont été découverts par Swanson et coll. en 1992. Ces sites ont très peu d'affinité envers l'ANG I, l'ANG II et l'ANG III, ainsi qu'avec les ligands spécifiques aux récepteurs AT_1 et AT_2 . On retrouve les récepteurs AT_4 chez une variété d'espèces incluant, entre autres, le cochon, le cheval, le chat, le lièvre, le cochon-dinde, le bovin et le chien (Wright et al. 1995; Swanson et al. 1992). Ils sont abondamment distribués dans tout le corps et sont localisés notamment dans le cerveau, l'intestin, le coeur, l'aorte, le rein, le foie, le poumon et la glande surrénale.

Rôles physiologiques:

Dans le cerveau du cochon-dinde, ces sites de liaison sont concentrés dans les régions associées à la mémoire ainsi qu'aux fonctions motrices et sensorielles. Ces régions incluent l'hippocampe et le cortex cérébral (Moeller et al. 1996; Miller-Wing et al. 1993). Ces récepteurs sont également présents dans le muscle lisse vasculaire et dans les cellules endothéliales. L'ANG IV induit une vasodilatation de la

microcirculation cérébrale (Kramar et al. 1997; Riva et Galzin 1996; Swanson et al. 1992).

Voies de signalisations:

La liaison de radioligands au récepteur AT₄ n'est pas affectée par des analogues guanyl nucléotide ce qui suggère que ce récepteur n'est pas couplé aux protéines G (Bernier et Guillemette 1996; Miller-Wing et al. 1993; Hall et al. 1993). De plus, les concentrations du Ca²⁺_i, d'inositolphosphates, d'AMP_c et de l'acide arachidonique (AA) ne sont pas modifiées par l'activation des récepteurs AT₄ (Briand et al. 1998). La structure moléculaire de ce récepteur et son système de transduction (comme les seconds messagers intracellulaires impliqués lors de son activation) demeurent inconnus. A ce jour, ce récepteur n'a pas été cloné.

3.6- TACHYPHYLAXIE À L'ANGIOTENSINE

La tachyphylaxie signifie une diminution de la réponse physiologique à un agent pharmacologique, suite à l'administration répétée et rapprochée dans le temps ou à fortes doses de cet agent. La tachyphylaxie à l'ANG II peut se résumer par l'occupation prolongée des récepteurs à l'ANG II (particulièrement les récepteurs AT₁) par l'ANG II (Vicaut et al. 1988; Chiba et Tsukada 1986). Ce phénomène entraîne soit à une diminution du nombre de récepteurs (*down-régulation*) (Penhoat et al. 1991), soit à une diminution de l'affinité des récepteurs (désensibilisation) (Kuttan et Sim 1993) pour l'ANG II.

De plus, lorsque l'ANG I ($10 \mu\text{M}$) est administrée dans les artères utéroplacentaires chez la femme, la réponse contractile à l'ANG I diminue rapidement (Svane et al. 1995). Les auteurs ont suggéré un effet direct de l'ANG I sur les récepteurs AT_1 , causant ainsi une contraction des artères sans toutefois expliquer la nature de la tachyphylaxie. Cet effet direct de l'ANG I sur les récepteurs AT_1 a été proposé puisque le captopril, un inhibiteur de l'ECA, n'a aucunement affectée la réponse vasoconstrictrice de l'ANG I et que la saralazine (un antagoniste sélectif des récepteurs AT_1) a complètement inhibée l'artériokonstriction causée par l'ANG I.

3.7- HYPOTHÈSE ET OBJECTIF GÉNÉRAL

3.7.1- Connaissances théoriques dans la médullo-surrénale

Rôle des récepteurs AT_1

L'avènement de la biologie moléculaire, tels le clonage et l'expression des récepteurs à l'ANG II a permis d'étudier la localisation et la fonction des récepteurs AT_1 dans la médullo-surrénale (Inagami et Harris 1993). À l'aide d'agents pharmacologiques, on a pu identifier au moins deux types de récepteurs à l'ANG II, soit les récepteurs AT_1 et AT_2 . La présence de ces récepteurs a été démontrée dans la médullo-surrénale chez le rat (Marchand et al. 1993; Sechi et al. 1992; Balla et al. 1991) et le bovin (Balla et al. 1991). Leurs rôles ont été étudiés dans une variété de tissus (Timmermans et al. 1993), incluant la glande surrénale isolée et perfusée du rat (Hano et al. 1994; Wong et al. 1990), et du bovin (Powis et O'Brien 1991). Dans ces études, l'ANG II augmente la sécrétion basale des catécholamines via la stimulation des récepteurs AT_1 , localisés à la surface membranaire de la cellule

chromaffine.

Rôle des récepteurs AT₂

La distribution des récepteurs AT₂ prédomine sur celle des récepteurs AT₁ dans la médullo-surrénale (Marchand et al. 1993; Sechi et al. 1992; Balla et al. 1991). Cependant, le rôle des récepteurs AT₂ dans la glande surrénale demeure mal compris (Timmermans et al. 1993). Des études *in vitro* (Belloni et al. 1998; Powis et O'Brien 1991; Bunn et Marley 1989) et *in vivo* (Wong et al. 1990) ont montré que la libération des catécholamines par les médullo-surrénales en réponse à l'ANG II n'est inhibée que partiellement par des antagonistes des récepteurs AT₁, (e.g. la saralazine et le losartan) suggérant l'implication d'une autre voie de signalisation dans la réponse médullaire à l'ANG II. Cette observation nous permet de croire que les récepteurs AT₂ soient également impliqués dans la libération des catécholamines. Deux études *in vitro* ont démontré que la stimulation des récepteurs AT₂ par l'ANG II augmente la libération des catécholamines (Belloni et al. 1998; Mazzocchi et al. 1998).

Implication fonctionnelle des canaux calciques

La plupart des observations *in vitro* faites à ce sujet ont été obtenues à partir des cellules chromaffines bovines. Ces dernières études indiquent que l'ANG II stimule la relâche des catécholamines en augmentant l'entrée du Ca²⁺ dans la cellule via le canal Ca²⁺ de type-L, localisé à la surface externe de la membrane cellulaire (Cheek et al. 1993; McMillian et al. 1992; Bunn et Marley 1989; Stauderman et Pruss 1989). Cet influx de Ca²⁺ dans la cellule est responsable de la relâche des catécholamines. Des études *in vitro* (Fasolato et al. 1994; Hajnoczky et al. 1992; Montiel et al. 1984) ont montré l'implication fonctionnelle du canal Ca²⁺ dans la réponse médullaire causée par l'ANG II

et le mécanisme en cause s'appelle le canal Ca^{2+} opéré par un récepteur (voir Fig. 14).

3.7.2- Problématiques

Selon les connaissances actuelles, il semble que l'ANG II participe à la libération des catécholamines par la glande surrénale via la stimulation des récepteurs AT_1 et AT_2 . L'importance relative de ces récepteurs (AT_1 et AT_2) dans la médullo-surrénale *in vivo* demeure indéterminée. De plus, le rôle des canaux Ca^{2+} de type-L et N sur la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales demeure controversé (Gaspo et al. 1997, Geng et al. 1997; Gaspo et al. 1993, Takeuchi et al. 1993; McMillian et al. 1992). Ainsi, les démonstrations fonctionnelles des canaux Ca^{2+} sont très limitées chez le chien *in vivo*. Il est important de savoir si les mécanismes régulateurs *in vitro* de la libération des catécholamines par les médullo-surrénales induite par l'ANG II sont également opérants dans les conditions *in vivo*. Car le SRA et le système sympatho-surrénalien sont étroitement inter-reliés et fonctionnellement impliqués dans plusieurs situations pathophysiologiques telles que l'hypertension artérielle.

3.7.3- Hypothèse et objectifs généraux

À partir des études présentées ci-haut, nous proposons l'hypothèse que les récepteurs AT_1 , AT_2 ainsi que les canaux Ca^{2+} de type-L sont fonctionnellement impliqués dans la libération des catécholamines par les médullo-surrénales.

Par conséquent, nos objectifs sont de mettre en évidence le rôle fonctionnel:

1- des récepteurs AT_1 dans la sécrétion des catécholamines médullaires en réponse à l'ANG II.

2- des récepteurs AT_2 dans la réponse médullaire induite par l'ANG II.

3- des canaux Ca^{2+} de type-L dans la relâche des catécholamines par les médullo-surrénales.

DEUXIÈME PARTIE

MÉTHODOLOGIE

CHAPITRE 4

CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES

4.1- MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Nos travaux de recherche ont été réalisés chez le chien anesthésié étant donné qu'il existe plusieurs avantages à utiliser ce modèle animal. Celui-ci nous permet de prélever de grandes quantités de sang sans affecter de façon significative la volémie. Cette quantité très importante de sang prélevée aurait tôt fait de réduire le volume sanguin d'un lapin ou d'un rat, voir même de provoquer la mort de l'animal, lorsqu'on prend en considération que le volume sanguin corporel total du rat est très faible (environ 20 ml). Par contre, chez le chien, une telle quantité de sang prélevée n'a aucunement affecté la condition hémodynamique basale dans nos études.

En tenant compte de l'emplacement de la glande surrénale du chien avec ses artères, et de l'espacement qui existe chez cet animal, il nous est possible d'administrer les médicaments directement dans la glande surrénale, tout en contrôlant le mieux possible la diffusion indésirable du médicament (Yamaguchi 1993a).

Egalement, de préserver la glande surrénale dans son milieu biologique naturel, contrairement aux modèles *in vitro*, permet de prélever les catécholamines à la sortie des surrénales.

De plus, ce modèle animal *in vivo*, contrairement aux autres espèces animales, nous permet de localiser avec plus de facilité une des artères (l'artère lombo-surrénale gauche) qui irrigue la glande surrénale gauche (Yamaguchi 1993a), laquelle permet l'administration locale des agents pharmacologiques.

En général, deux approches expérimentales sont utilisées pour étudier les mécanismes régulateurs de la sécrétion des catécholamines par les glandes surrénales: 1) les cellules chromaffines en culture (Artalejo et al. 1994); et 2) la glande surrénale isolée et perfusée (Wakade et al. 1991). Ces deux approches expérimentales peuvent avoir certains avantages substantiels, en ce sens qu'elles peuvent éliminer complètement l'influence d'un changement compensateur du système nerveux autonome. Cependant, ces deux approches sont loin des conditions physiologiques, puisque le tissu doit être tout d'abord extirpé de son milieu biologique naturel et, ensuite, placé dans un milieu externe adéquat. Avec la technique de cellules en culture, il existe un risque élevé de contamination provenant de d'autres lignées cellulaires (Miller 1995), ce qui pourrait mener à une mauvaise interprétation des résultats. Tandis que dans le cas de la glande surrénale isolée, cette dernière doit être perfusée de façon rétrograde avec une solution physiologique. Donc, pour répondre à nos besoins, i.e. avoir un modèle le plus physiologique possible, le chien anesthésié a été utilisé pour nos expériences *in vivo*.

4.2- ANESTHÉSIE ET PROCÉDURE CHIRURGICALE

Dans nos études, nous avons utilisé comme agent anesthésique le pentobarbital sodique i.v. 30 mg/kg additionné au besoin de 4 mg/kg, i.v. Il a été démontré que le pentobarbital n'interfère pas de façon importante avec la relâche des catécholamines par les médullo-surrénales (Halliwill et Billman 1992; Watkins et Maixner 1991; Havel et al. 1987; Taborsky et al. 1984).

La respiration des chiens a été maintenue artificiellement à l'aide d'un tube placé dans la trachée et connecté à une pompe. La température rectale a été contrôlée à $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Une laparotomie médiane et une incision au flanc gauche ont été effectuées afin de localiser l'emplacement de la glande surrénale gauche avec ses alimentations artérielles et veineuses. Pour de plus amples informations, se référer à la section méthodologie des trois études présentées dans cette thèse.

4.3- PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les résultats de la première étude ont démontré que l'administration répétée de l'ANG II induit une tachyphylaxie. Afin de conserver la totalité de l'effet de l'ANG II sur la libération des catécholamines sans provoquer de tachyphylaxie à l'ANG II, une seule dose d'ANG II a été administrée au cours de différents protocoles expérimentaux dans les trois études présentées ici.

Dans la première étude, trois groupes expérimentaux différents ont permis d'étudier le rôle physiologique des récepteurs AT_1 sur la fonction médullaire. La seconde étude comporte quatre groupes d'études pour montrer le rôle fonctionnel des récepteurs AT_2 . Et la troisième étude a été réalisée à l'aide de trois différents groupes d'expériences pour mettre l'emphase sur l'implication fonctionnelle des canaux Ca^{2+} de type-L. De façon générale, tous les agents pharmacologiques tels que le BMS 186295, le PD 123319, le CGP 42112, la nifédipine et la ω -conotoxine utilisés dans les trois études ont été administrés environ 5 min avant l'ANG II. Afin d'étudier l'effet de l'ANG II en présence ou non (véhicule) de ces agents sur la fonction médullaire, plusieurs prélèvements ont été

effectués, i.e., à ~1, 2, 3, 5 et 10 min après l'administration de l'ANG II (voir les sections protocoles expérimentaux de chaque étude inclus dans la section résultats).

TROISIÈME PARTIE

RÉSULTATS

**CHAPITRE 5 INHIBITION BY BMS 186295, A SELECTIVE NONPEPTIDE
AT₁ ANTAGONIST, OF ADRENAL CATECHOLAMINE
RELEASE INDUCED BY ANGIOTENSIN II IN THE DOG IN
VIVO**

Martineau, D., Yamaguchi, N., et Briand, R.

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

73: 459 - 464, 1995.

5.1 Abstract

The aim of the present study was to investigate whether a novel nonpeptide AT₁ selective antagonist, BMS 186295 (BMS), can antagonize adrenal catecholamine release induced by local administration of angiotensin II (A-II) in anesthetized dogs. Plasma catecholamine concentrations in adrenal venous and aortic blood were determined by an HPLC-electrochemical method. A-II was locally administered to the left adrenal gland in absence and presence of BMS. In the first group (n = 7), local infusion (0.5 ml/min, 1 min) of A-II (0.001-1.0 µg/mL) resulted in a significant dose-dependent increase in the basal secretion of adrenal catecholamines. Aortic catecholamine levels and mean aortic pressure remained unchanged at any dose tested. In the second group (control, n= 10), four repeated infusions (at an intervals of 15 min) of A-II at 0.1 µg/mL resulted in significant increases of adrenal catecholamines secretion compared to baseline. In the third group receiving BMS given locally to the gland (n = 8), the basal adrenal catecholamine secretion was not significantly altered by BMS itself at any dose tested. However, the net catecholamine response to A-II (0.1 µg/mL) was significantly and dose-dependently attenuated by approximately 40, 60, and 80% in the presence of BMS at the doses of 0.1, 1.0, and 10 µg/mL, respectively, when compared to the control group. The study indicates that BMS dose-dependently blocks A-II-induced catecholamine secretion in the dog adrenal *in vivo*.

Key words: adrenal gland, angiotensin II, AT₁ antagonist, BMS 186295, catecholamine, dog, *in vivo*

5.2 Introduction

It has long been known that the renin-angiotensin system plays an important role in the regulation of arterial pressure and salt and water balance. More recently, new pharmacological approaches, such as cloning and expression of angiotensin II (A-II) receptors, have allowed investigation of localization and function of A-II receptor subtypes (Inagami and Harris 1993). The availability of nonpeptide, specific receptor antagonists, such as losartan and PD 123177, has permitted successful identification of at least two distinct subtypes (AT_1 and AT_2) of A-II receptors, and their functional implication has been extensively studied in various tissues (Timmermans et al. 1991, 1993). In isolated, perfused rat (Wong et al. 1990), dog (Robinson 1967), and bovine (Powis and O'Brien 1991) adrenal glands, A-II has been shown to increase basal catecholamine secretion. These previous *in vitro* studies have indicated that the direct secretory effect of A-II on basal catecholamine release is mainly mediated by AT_1 receptor localized on chromaffin cell membrane (Wong et al. 1990, Powis and O'Brien 1991), although the distribution of AT_2 subtype predominates in adrenal medulla (Sasaki et al. 1991). Recently, pharmacological characteristics of a novel nonpeptide AT_1 selective antagonist, BMS 186295 (also known as SR 47436), have been well documented in various *in vitro* and *in vivo* preparations (Cazaubon et al. 1993). However, the potential interaction of BMS 186295 with A-II receptors in the adrenal medulla remains to be investigated. In addition, *in vivo* studies regarding local effects of A-II and its receptor functions in the adrenal gland have been limited in number due, probably, to the potent systemic effects of A-II when administered intravenously. Recently, we have developed an *in vivo* model, in which local effects on the adrenal gland of any given substances can be assessed without being affected by potential systemic effects (Yamaguchi 1993). The aims of the present study were to determine if A-II

locally administered to the left adrenal gland can induce its medullary secretory effect in this particular model, and to evaluate whether the adrenal catecholamine response to local A-II can effectively be blocked by a highly selective, nonpeptide AT₁ receptor antagonist, BMS 186295.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Preparation of animal

Adult male mongrel dogs (27.8 ± 1.2 kg, $n = 25$), fasted overnight but allowed free access to water, were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg iv, followed by 4 mg/kg as needed). After dogs were intubated endotracheally, artificial respiration was performed by a Harvard respiration pump (model 607, Harvard, South Natick, MA). The rectal temperature of each dog was monitored and kept constant at $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ by means of a thermoregulator (model 74; Yellow Spring Instruments, Yellow Spring, OH) connected to a heating pad. Both femoral arteries were cannulated and the catheters were advanced so that the tip of each catheter can be placed in the abdominal aorta; the right femoral artery was used to measure aortic pressure, and the left femoral artery was used to obtain aortic blood samples.

Our model that allows local arterial administration of a given drug into the left adrenal gland has been reported in full detail elsewhere (Yamaguchi 1993). Briefly, following a median laparotomy, a catheter (PE-190) was inserted into the left adrenolumbar artery from the peripheral end toward the gland and then advanced, so that the tip of catheter reached underneath the gland or to a level close to the adrenolumbar arterial-aortic junction. All visible branches arising from the adrenolumbar artery toward outside of the gland were ligated to prevent undesired drug diffusion into the systemic

circulation. The volume of this catheter was fixed to be 0.5 mL and the catheter was connected to an infusion pump (model 1140-001, Harvard, South Natick, MA).

To collect adrenal venous samples, a polyethylene catheter (PE-240) was inserted into the left adrenolumbar vein through the left femoral vein (Yamaguchi 1993). The catheter was tied at the adreno-abdominal vena caval junction. The left adrenolumbar vein distal to the gland was ligated to obtain actual adrenal venous blood. The volume of this catheter was fixed to be 1.5 mL. Venous blood from the gland was continuously drained into a small blood reservoir to facilitate blood sampling. Venous blood in the reservoir was returned to the dog by a perfusion pump (Masterflex model 7016-52; Cole-Parmer Instrument, Chicago, IL) through a catheter inserted into the right femoral vein at a perfusion rate adjusted to a stabilized initial venous flow. After all surgical procedures were completed, sodium heparin (200 U/kg iv) was administered, followed by 100 U/kg every hour thereafter. The dog was then allowed a stabilization period of about 45 min.

5.3.2 *Measured parameters*

Mean aortic pressure and heart rate were recorded with a polygraph system (model RM-6000, Nihon-Kohden, Tokyo, Japan). For catecholamine determinations, aortic and left adrenal venous blood were sampled simultaneously. At each sampling time point, adrenal venous blood flow was determined by collecting the venous blood for 1 min into a graded tube placed in crushed ice. An aliquot of 1.5 mL of aortic and adrenal venous blood was transferred to a chilled centrifuge tube containing 30 μ l of preservative solution (pH 6.5) consisted of EGTA (95 mg/mL) and glutathione (60 mg/mL). After centrifugation at 4°C for 5 min at 14,000 revolutions/min with a refrigerated

centrifuge (model 5402, Eppendorf, Hamburg, Germany), the plasma was stored at -80°C until assay. Plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine were quantified by means of an isocratic high performance liquid chromatographic system (Gilson, Villiers-le-Bel, France) coupled with an electrochemical detector "Coulchem II" (model 5200; ESA, Bedford, MA) (Yamaguchi 1993). Hematocrit was measured in all adrenal venous blood samples. At the end of each experiment, the left adrenal gland was removed and weighed. Catecholamine data was expressed as net output (ng/min/g of wet weight of the gland) as previously reported (Yamaguchi 1993).

5.3.3 *Experimental protocol*

The study was carried out in three separate groups: the first one received four different doses of A-II (0.001, 0.01, 0.1 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$, $n = 7$) and served to identify the optimal dose to use for the purpose of the study. The second, received four repetitive doses of A-II with a fixed dose of 0.1 $\mu\text{g/mL}$ with an interval of 15 min. The vehicle was given 5 min prior to each administration of A-II, serving as the vehicle control group ($n=10$) for the reproducibility of adrenal catecholamine response to local A-II. Finally, the third group was treated with three different doses of BMS 186295 (0.1, 1.0 and 10 $\mu\text{g/mL}$, $n = 8$) following the same procedure described above for the second group. Each dose of BMS 186295 was given, instead of vehicle, 5 min prior to the A-II infusions.

In the first group, immediately after the initial control sample was taken, saline was infused into the left adrenolumbar artery for about 3 min at a rate of 0.5 ml/min. The dead volume of the adrenal arterial (0.5 ml) and venous (1.5 ml) catheters was taken into account in relation to the infusion rate and adrenal venous blood flow, respectively. Therefore, adrenal venous sample was

obtained during the second and third min of infusion, but precisely for 1 min (net infusion). Saline infusion was discontinued immediately after sample collection for the first min was completed. Samples were then continuously but separately obtained for the second and third min after the net infusion followed by sample collections 5 and 10 min after the net infusion. Fifteen minutes after saline infusion, the second control sample was obtained. Then, the first dose of A-II (0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was infused into the left adrenolumbar artery followed by sample collections in the same way as described for saline infusion. This procedure was repeated for three additional doses of A-II. The dose range of A-II tested in this study was determined by some dose-finding pilot studies.

In the second group, immediately after taking the initial control sample, vehicle (6% ethanol prepared with saline) was infused into the left adrenolumbar artery as described for the first group, but no sample was obtained during and immediately after the infusion. Then, the second control sample was taken 5 min after the vehicle administration. Immediately after the second sample, A-II (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was administered followed by sample collections during the net infusion and 2, and 3 min after A-II infusion. Seven minutes later (i.e. 10 min after the first A-II infusion), the procedures for the first vehicle and A-II administrations followed by sample collections (first bloc) were repeated for the additional second, third, and fourth blocs. The fixed dose of A-II (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was selected according to the results obtained from the first group.

In the third group, the three different doses of BMS 186295 were administered following exactly the same procedures of the second, third, and fourth vehicle administrations described for the second group. Aortic blood samples were simultaneously obtained at every adrenal venous sampling

time point. The doses of BMS 186295 (0.1, 1.0, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tested in this study were selected by several dose-finding pilot experiments. The animals used in this study have been cared for and used in accordance with the principles of "The Guide to the Care and Use of Experimental Animals" published by the Canadian Council of Animal Care.

5.3.4 *Statistical analyses*

The statistical evaluation was made by an analysis of variance using a statistical software package (SigmaStat for Windows, Version 1.0, Jandel Scientific, San Rafael, CA). Differences over a given experimental period were assessed by analysis of variance for repeated measures followed the Dunnett's t-test for multiple comparisons. Comparisons between groups were conducted by the use of one way analysis of variance. A preliminary logarithmic transformation was used, when necessary, to satisfy the assumption of a normal distribution of variances (Wallenstein et al. 1980). All results are expressed as means \pm SE, and a p value less than 0.05 was considered statistically significant.

5.4 **Results**

5.4.1. *Effect of angiotensin II on basal output of adrenal catecholamines*

The initial basal values obtained from three separate groups for mean arterial pressure, heart rate, adrenal venous blood flow, and hematocrit were not statistically different between groups. These basal values remained relatively stable during a given experimental period. Neither mean arterial pressure nor heart rate significantly changed following A-II infusion at any dose tested. The basal adrenal catecholamine output did not change significantly following administration of saline and the lowest dose of A-II (0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$). With the dose of 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, adrenal catecholamine output

increased significantly (Fig. 15). The increase in catecholamine output was dose-dependent within a dose-range tested (0.001-1.0 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 15). The onset of catecholamine response to A-II was rapid and the increased catecholamine output returned to the corresponding control levels by 2 min after the cessation of A-II infusion (Fig. 15).

5.4.2 *Effect of BMS 186295 on angiotensin II-induced catecholamine release*

In the control group, the first administration of A-II with the dose of 0.1 $\mu\text{g/mL}$ significantly increased the basal output of adrenal catecholamines, both epinephrine and norepinephrine. When the second A-II with the same dose was administered 15 min later, the catecholamine response was reduced by approximately 60%, but the response was still significantly greater than the basal value (Fig. 16). The third and fourth catecholamine responses to the repetitive infusion of A-II were comparable to the second one, indicating the stabilized responses upon the repetition of A-II administrations (Fig. 16).

In the group receiving BMS 186295, the basal adrenal catecholamine output was not significantly affected by BMS 186295 itself. The control catecholamine response to the first infusion of A-II in presence of the vehicle alone was slightly larger in amplitude (545.99 ± 88.65 ng/min/ml, $n=8$) than that observed in the control group (377.26 ± 18.48 ng/min/ml, $n=10$), but the difference was not statistically significant ($p=0.2780$). However, the subsequent responses to repetitive administrations of A-II were significantly inhibited by BMS 186295 (Fig. 16 and 17). When compared between groups with the net responses, A-II-induced increases in catecholamine output were significantly attenuated in the presence of BMS 186295 following a dose-dependent manner (Fig. 18).

5.5 Discussion

It has long been known that A-II releases adrenal catecholamines (Braun-Menendez et al. 1940), and this effect has been shown in all mammalian species so far studied, including rats, cats, dogs, and rabbit (Livett and Marley 1993). It has previously been suggested that the catecholamine releasing action of A-II is mediated by its direct action on adrenal chromaffin cells, because close arterial injections of A-II into the celiac artery in a retrograde manner elicited catecholamine secretion in eviscerated cats *in vivo*. This effect was not blocked by surgical or pharmacological adrenal denervation (Feldberg and Lewis 1964, 1965). Further, the increase in circulating catecholamines induced by intravenous A-II lasted for about 6 min, and this catecholamine response was associated with significant increase in aortic pressure (Peach et al. 1966, Peach 1971). More recently, an A-II-induced dose-dependent increase in catecholamine release has been shown both in isolated, perfused cat adrenal glands (Peach 1971) and cultured bovine adrenomedullary chromaffin cells (Zimlichman et al. 1987). In accordance with those earlier observations, the present study clearly demonstrates that local infusion of A-II into the left adrenolumbar artery increased the basal output of adrenomedullary catecholamines in a dose-dependent manner without any significant effects on mean aortic pressure and heart rate. In addition, the action of A-II was short lasting; the maximum response occurring 1 min after the start of infusion rapidly returned to the control level by 2 min after the cessation of infusion. These findings are compatible with the view that the increase in adrenal catecholamine output in response to local administration of A-II resulted from its direct action on the adrenal medulla and not from any secondary systemic effects. Therefore, the inhibitory effects of certain anesthetics frequently reported on autonomic reflex responses (Havel et al. 1987; Watkins and Maixner 1991; Halliwill and Billman 1992) may not interfere with the adrenal catecholamine release

observed in the present study, although a potential direct inhibitory action of the anesthetic on adrenal catecholamine secretion can not completely be ruled out in the present experiments.

In the present study, a fixed dose of A-II (0.1 $\mu\text{g/mL}$) was repetitively infused for 1 min with an interval of 15 min into the left adrenolumbar artery to assess the inhibitory effect of various doses of BMS 186295 on adrenal catecholamine secretion. In response to the first infusion, adrenal catecholamine output increased markedly. However, the response to the second infusion was only about 60% of the first one in the control group, indicating a rapid development of tachyphylaxis as previously shown in the dog and cat adrenal medullae (Staszewska-Barczak and Vane 1967), cat superior cervical ganglion cells (Lewis and Reit 1965, Reit 1972) and smooth muscle cells of the dog mesenteric artery (Sato et al. 1987). *In vivo* studies on A-II-induced tachyphylaxis are difficult to perform and the existence of the phenomenon in intact preparations has not been fully established (Bock and Gross 1961, Sim and Kuttan 1992). Because tachyphylaxis is due to the prolonged duration of A-II receptor occupancy by the agonist (Vicaut et al, 1988), a possible explanation of our present findings could result from a down-regulation of A-II receptors. This possibility is compatible with a more recent observations that A-II induces down-regulation of its receptors in cultured bovine adrenocortical cells (Penthoat et al 1991). Another possibility is that the observed tachyphylaxis may result from the diminished affinity of A-II for its receptor as recently demonstrated in rat aortic ring preparations (Kuttan and Sim 1993).

The subsequent responses to the third and fourth infusions were relatively stable, being close in amplitude to the second response. When compared with the net responses, the present results

clearly demonstrate that BMS 186295 significantly inhibited, in a dose-dependent manner, the increases in adrenal catecholamine output induced by repetitive A-II infusions. Because BMS 186295 has recently been shown to be a highly selective AT₁ receptor antagonist in various tissues and organs so far studied (Cazaubon et al. 1993), its inhibitory effect observed in the present study may also result from the specific blockade of AT₁ receptors subtype. The functional role of these receptors has been shown in the rat and bovine adrenal gland under in vitro conditions (Wong et al. 1990, Powis and O'Brien 1991). Yet, the possibility that BMS 186295 may directly interfere with L-type Ca²⁺ channels at the level of chromaffin cells can not completely be ruled out in the present study, because the mechanism of A-II-induced cellular activation has been shown to involve the increased of Ca²⁺ influx due to opening of membrane Ca²⁺ channels (Zimlichman et al. 1987). This possibility, however, is less probable to occur, because BMS 186295 did not show the affinity for Ca²⁺ channels to any significant extent as assessed by a binding assay with nitrendipine, a L-type Ca²⁺ channel blocker (Cazaubon et al. 1993). It may be of further interest that the catecholamine response to A-II was not abolished in the presence of BMS 186295, although markedly inhibited by approximately 80% at the highest dose tested. The remaining response to A-II may result from some factors other than AT₁-mediated mechanisms, suggesting a partially functional implication of AT₂ receptor in the adrenal medulla when AT₁ receptor is blocked. Although this interpretation is compatible with the fact that the distribution of AT₂ receptor predominates over that of AT₁ subtype in the adrenal medulla (Sasaki et al. 1991), further studies are needed to fully elucidate the functional role of AT₂ receptor subtype.

In conclusion, the present results indicate that locally administered A-II dose-dependently increased adrenomedullary catecholamine secretion without any significant systemic effect in the dog

adrenal *in vivo*. The results also show that a novel nonpeptidic AT₁ selective antagonist, BMS186295, significantly blocked, in a dose-dependent manner, adrenal catecholamine secretion induced by local administration of A-II. The study indicates that, under *in vivo* conditions, A-II increases the basal catecholamine secretion by directly stimulating AT₁ receptors presumably localized on the adrenal medullary chromaffin cells.

5.6 Acknowledgements

This work was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Canada (Québec) and, in part, from the Canadian Diabetes Association and Bristol-Myers Squibb (Canada) Inc. The authors thank Ms. Sanaë Yamaguchi and Mr. Richard Lalande for their skilled and devoted technical assistance.

5.7 References

- Bock, K. D., and Gross, F. 1961. Renin and angiotensin tachyphylaxis. *Circ. Res.* **9**: 1044-1050.
- Braun-Menendez, E., Fascicolo, J. C., Leloir, L. F., Munoz, J. M. 1940. Farmacologia de la hipertensina. *Revista de la Sociedad Argentina de Biologia (Buenos Aires)* **16**: 398-410.
- Cazaubon, C., Gougat, J., Bousquet, F., Guiraudou, P., Gayraud, R., Lacour, C., Roccon, A., Galindo, G., Barthelemy, G., Gautret, B., Bernhart, C., Perreault, P., Breliere, J. C., Le Fur, G., and Nisato, D. 1993. Pharmacological characterization of SR 47436, a new nonpeptide AT-1 subtype angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**: 826-834.
- Feldberg, W., and Lewis, G. P. 1964. The action of peptides on the adrenal medulla. Release of adrenaline by bradikinin and angiotensin. *J. Physiol. (London)* **171**: 98-118.
- Feldberg, W., and Lewis, G. P. 1965. Further studies on the effects of peptides on the suprarenal medulla of cats. *J. Physiol. (London)* **178**: 239-251.
- Halliwill, J. R., and Bellman, G. E. 1992. Effect of general anesthesia on cardiac vagal tone. *Am. J. Physiol.* **262**: H1719-H1724.
- Havel, P. J., Flatness, D. E., Halter, J. B., Best, J. D., and Taborsky, G. J. J. 1987. Halothane anesthesia does not suppress sympathetic activation produced by neuroglucopenia. *Am. J. Physiol.* **252**: E667-E672.
- Inagami, T., and Harris, R. C. 1993. Molecular insights into angiotensin II receptor subtypes. *News Physiol. Sci.* **8**: 215-218.
- Kimura, T., Suzuki, Y., Yoneda, H., Suzukikusaba, M., and Satoh, S. 1992. Facilitatory role of the renin angiotensin system in controlling adrenal catecholamine release in hemorrhaged dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **19**: 975-981.

- Kuttan, S. C., and Sim, M. K. 1993. Angiotensin II-induced tachyphylaxis in aortas of normo- and hypertensive rats: changes in receptor affinity. *Eur. J. Pharmacol.* **232**: 173-180.
- Lewis, G. P., and Reit, E. 1965. The action of angiotensin and bradykinin on the superior cervical ganglion of the cat. *J. Physiol. (London)* **179**: 538-553.
- Livett, B. G., and Marley, P. D. 1993. Noncholinergic control of adrenal catecholamine secretion. *J. Anat.* **183**: 2777-289.
- Peach, M. J. 1971. Adrenal medullary stimulation induced by angiotensin I, angiotensin II, and analogues. *Circ. Res.* **28** and **29** (Suppl. II): II-107-II-116.
- Peach, M. J., Cline, W. H. Jr., Watts, D. T. 1966. Release of adrenal catecholamines by angiotensin II. *Circ. Res.* **14**: 571-575.
- Penhoat, A., Ouali, R., Jaillard, C., Langlois, D., Begeot, M., and Saez, J. M. 1991. Characterization and regulation of angiotensin and corticotropin receptors on cultured bovine adrenal cells. *Endocrin. Res.* **17** (1-2): 1-18.
- Powis, D.A., and O'Brien, K. J. 1991. Angiotensin II increases catecholamine release from bovine adrenal medulla but does not enhance that evoked by K⁺ depolarization or by carbacol. *J. Neurochem.* **57**: 1461-1469.
- Reit, E. 1972. Actions of angiotensin on the adrenal medulla and autonomic ganglia. *Fed. Proc.* **31**: 1338-1343.
- Robinson, R.L. 1967. Stimulation of the catecholamine output of the isolated, perfused adrenal gland of the dog by angiotensin and bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **156**: 252-257.
- Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y., and Inagami, T. 1991. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine

- adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature*. **351**: 230-232.
- Satoh, S., Itoh, T., and Kuriyama, H. 1987. Actions of angiotensin II and noradrenaline on smooth muscle cells of the canine mesenteric artery. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **410**: 132-138.
- Sim, M. K., and Kuttan, S. C. 1992. Effects of noradrenaline and prostanglandin F_{2α} on angiotensin-induced contraction and tachyphylaxis in rat aortic rings. *Pharmacol. Toxicol.* **70**: 60-64.
- Staszewska-Barczak, J., and Vane, J. R. 1967. The release of catecholamines from the adrenal medulla by peptides. *Br. J. Pharmac. Chemother.* **30**: 655-667.
- Timmermans, P. B. M. W. M., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A. M., and Smith, R. D. 1993. Angiotensin II receptors and Angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* **45**: 205-251.
- Timmermans, P. B. M. W. M., Wong, P. C., Chiu, A. T., and Herblin, W. F. 1991. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 55-62.
- Vicaut, E., Montalescot, G., Hou, X, Stucker, O., and Teisseire, B. Arteriolar vasoconstriction and tachyphylaxis with intraarteriolar angiotensin II. *Microvasc. Res.* **37**: 28-41.
- Wallenstein, S., Zucker, C. L., and Fleiss, J. 1980. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ. Res.* **47**: 1-9.
- Watkins, L., and Maixner, W. 1991. The effect of pentobarbital anesthesia on the autonomic nervous system control of heart rate during baroreceptor activation. *J. Auton. Nerv. Syst.* **36**: 107-114.
- Wong, P. C., S. D. Hart, A. Zaspel, et al. Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype specific ligands: DuP 753 (AII-1) and PD 123177 (AII-2). *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **255**: 584-592, 1990.

- Yamaguchi, N. 1993. *In vivo* evidence for adrenal catecholamine release mediated by non-nicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. *Am. J. Physiol.* **265**: R766-R771.
- Zimlichman, R., Goldstein, D. S., Zimlichman, S., Stull, R., and Keiser, H. R. 1987. Angiotensin II increases cytosolic calcium and stimulates catecholamine release in cultured bovine adrenomedullary cells. *Cell Calcium* **8**: 315-325.

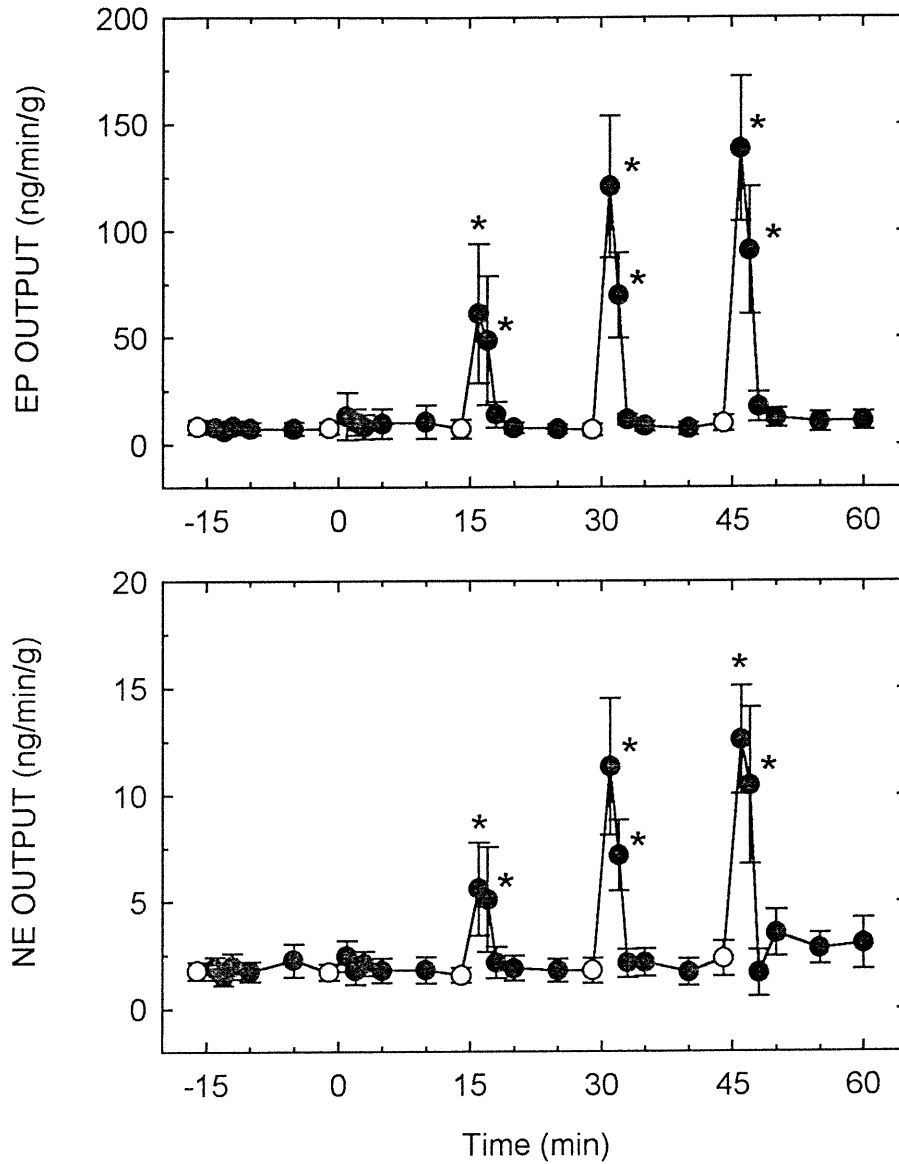


Fig. 15. Effects of various doses of A-II locally infused into the left adrenolumbar artery on the basal output of adrenal epinephrine (EP) and norepinephrine (NE). Saline was administered at -15 min and A-II with the dose of 0.001, 0.01, 0.1, and 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 0, 15, 30, and 45 min, respectively. $n=7$. *, $p < 0.05$ versus control values (open circles) observed immediately before the administration.

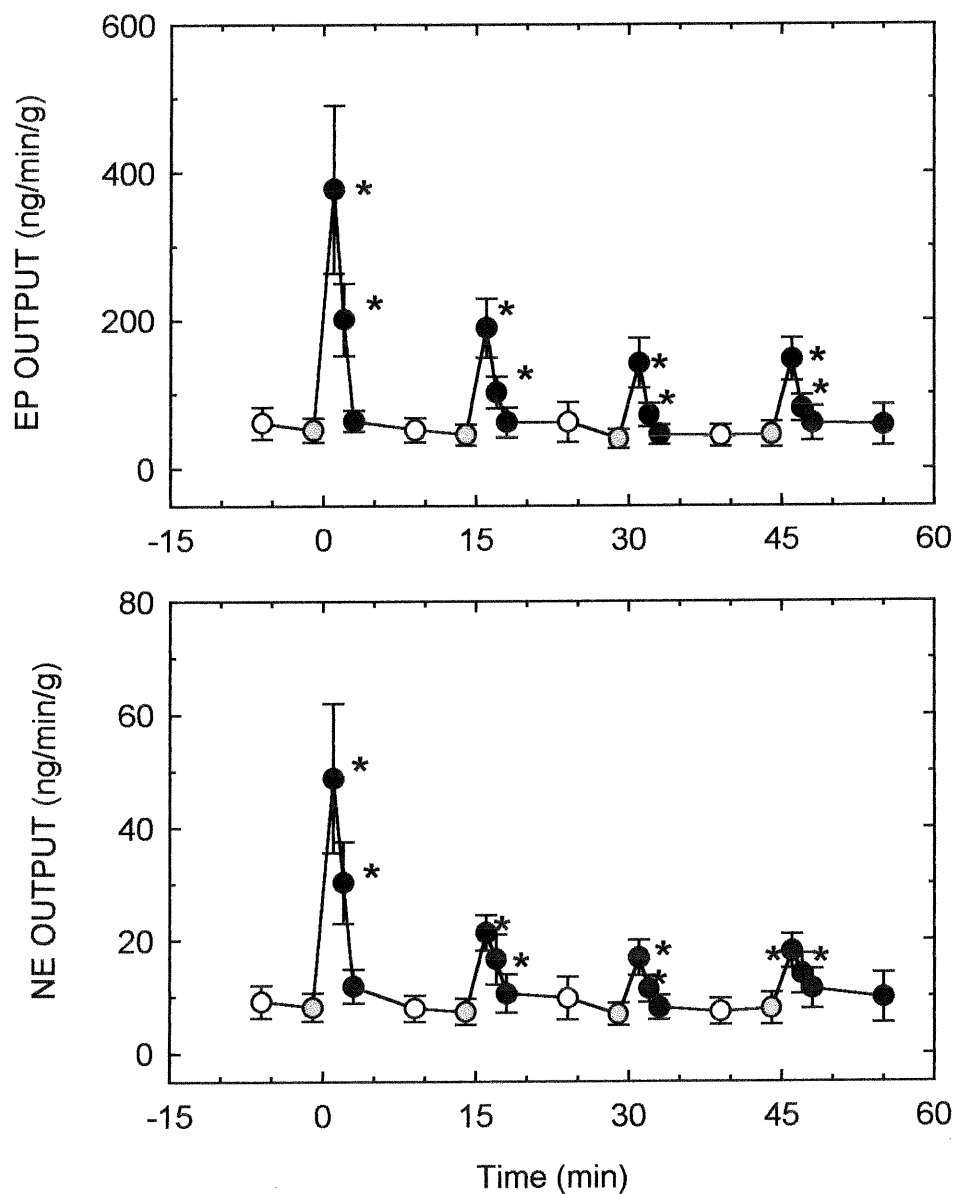


Fig. 16. Effects on the basal output of adrenal epinephrine (EP) and norepinephrine (NE) of repetitive administrations of A-II ($0.1 \mu\text{g/mL}$) into the left adrenolumbar artery in control dogs receiving the vehicle. The vehicle was administered at -5, 10, 25, and 40 min, and A-II at 0, 15, 30, and 45 min. $n = 10$. *, $p < 0.05$ versus control values (partially filled circles) observed immediately before the administration of A-II.

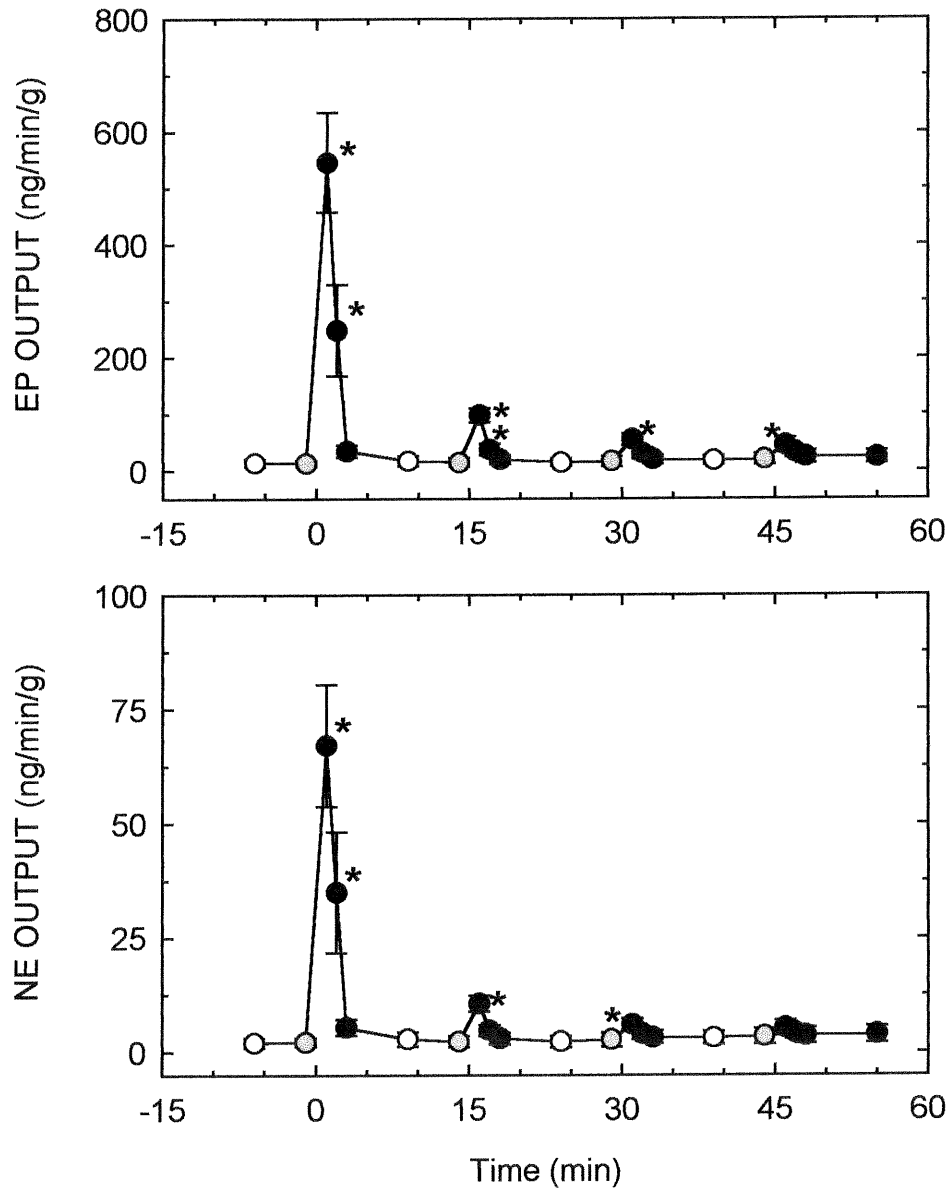


Fig. 17. Effects of various doses of BMS 186295 on adrenal epinephrine (EP) and norepinephrine (NE) release induced by repetitive administrations of A-II ($0.1 \mu\text{g/mL}$) into the left adrenolumbar artery. The vehicle was administered at -5, BMS 186295 at 10, 25, and 40 min, and A-II at 0, 15, 30, and 45 min. $n = 8$. *, $p < 0.05$ versus control values (partially filled circles) observed immediately before the administration of A-II.

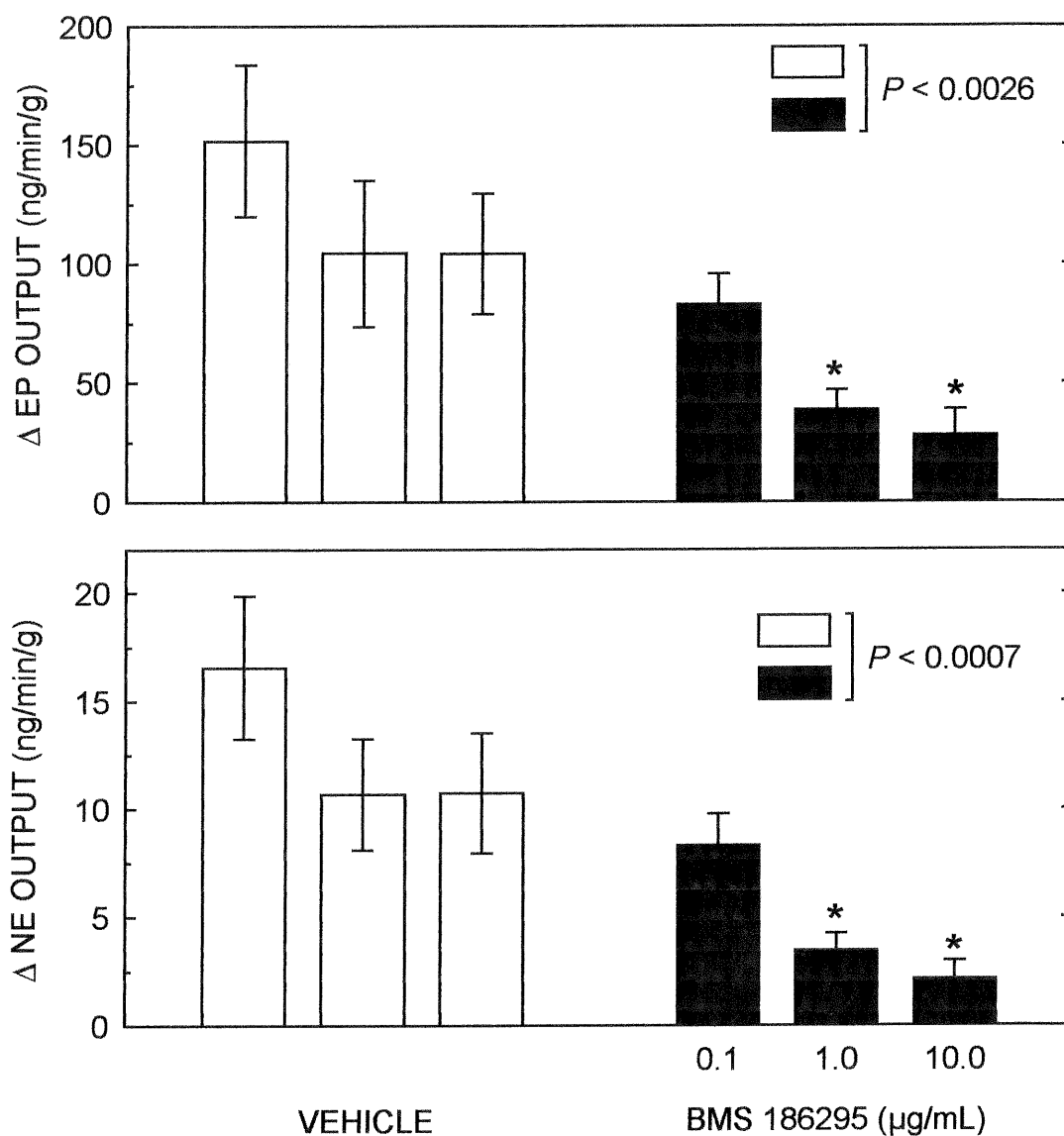


Fig. 18. Effects of BMS 186295 on the net increases in epinephrine (EP) and norepinephrine (NE) output induced by repetitive administrations of A-II (0.1 μg/mL). The calculations for the net responses were made with the data shown in Fig. 16 and 17. $n = 10$ and 8 for the vehicle control (open columns) and BMS 186295 treated (filled columns) group, respectively. *, $p < 0.05$ versus the value obtained with BMS 186295 at the dose of 0.1 μg/mL.

**CHAPITRE 6 FUNCTIONAL INVOLVEMENT OF ANGIOTENSIN AT₂
RECEPTOR IN ADRENAL CATECHOLAMINE SECRETION IN
VIVO**

Martineau, D., Lamouche, S., Briand, R., et Yamaguchi, N

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

77: 367 - 374, 1999.

6.1 Abstract

The aim of the present study was to analyse modulations of adrenal catecholamine secretion from the adrenal gland of anesthetized dogs in response to locally administered angiotensin II (Ang II) in the presence of either PD 123319 or CGP 42112, both of which are highly specific and selective ligands to angiotensin AT₂ receptor. Plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine in adrenal venous and aortic blood were quantified by an HPLC-EC method. Adrenal venous blood flow was measured by gravimetry. Local administration of Ang II (0.05 µg, 0.1 µM) to the left adrenal gland increased adrenal gland catecholamine output more than 30 times that found in non-stimulated states. Administration of either PD 123319 (0.085 µg (0.23 µM) to 8.5 µg (23 µM)) or CGP 42112 (0.005 µg (0.01 µM) to 5 µg 10 µM)) did not affect the basal catecholamine output significantly. The increase in adrenal catecholamine output in response to Ang II was inhibited by ~ 80% following the largest dose of PD123319. CGP 42112 significantly attenuated the catecholamine response to Ang II by ~ 70%. PD 123319 and CGP 42112 were devoid of any agonist actions with respect to catecholamine output by the adrenal gland *in vivo*. Furthermore, both PD 123319 and CGP 42112 inhibited the increase in adrenal catecholamine secretion induced by local administration of Ang II. The present study suggests that AT₂ receptors play a role in mediating catecholamine secretion by the adrenal medulla in response to Ang II receptor agonist administration *in vivo*.

Key words: AT₁ and AT₂ subtypes, PD 123319, CGP 42112, AT₂ antagonist, anesthetized dog

6.2 Introduction

Angiotensin-II (Ang II) is the principal effector hormone of the renin-angiotensin system, a system which plays a major role in the control of peripheral vascular resistance, blood pressure, and fluid and electrolyte homeostasis. Ang II acts through at least two major subtypes of specific angiotensin receptors, designated AT₁ and AT₂, localized on the surface of plasma membrane of various tissues throughout the body (Unger et al. 1996, Ardaillou 1999). While the AT₁ receptor has been clearly implicated in various effects such as vasoconstriction, renal salt and water retention, central osmo-control and stimulation of cell growth, the AT₂ receptor appears to be important in fetal development, cell differentiation, apoptosis, and regeneration of various tissues (Chung et al. 1998, Csikos et al. 1998).

In the adrenal medulla, Ang II increases the basal secretion of catecholamines through the activation of AT₁ receptors either *in vitro* (Balla et al. 1991, Timmermans et al. 1993, Hano et al. 1994) or *in vivo* (Martineau et al. 1995). However, a number of previous studies have indicated that the selective blockade of AT₁ receptors failed to abolish the increase in adrenal catecholamine secretion induced by Ang II (Bunn and Marley 1989, Powis and O'Brien 1991, Wong et al. 1990, Martineau et al. 1995). These latter observations suggest the existence of additional mechanisms other than those mediated through AT₁ receptors. Despite the abundance of AT₂ receptors associated with the adrenal medulla (Balla et al. 1991, Israel et al. 1995, Lu et al. 1995), their functional role in the adrenal medulla still remains uncertain (de Gasparo and Whitebread 1995, Timmermans et al. 1992a,b, Hano et al. 1994). Recent studies have demonstrated that catecholamine releasing effect of Ang II is mediated primarily via the activation of AT₂ receptors in adrenal medullary fragments

obtained from the rat adrenal gland (Belloni et al. 1998, Mazzocchi et al. 1998). Nevertheless, such a functional implication of AT₂ receptors in the adrenal medulla has yet to be confirmed in other species and, in particular, under *in vivo* conditions. Therefore, the present study was designed to evaluate whether AT₂ receptors are functionally involved in Ang II-induced catecholamine secretion in the canine adrenal medulla *in vivo*. The specific aim of this study was to analyse modulations of adrenal catecholamine secretion from the adrenal gland of anesthetized dogs in response to locally administered Ang II in the presence of either PD 123319 or CGP 42112, both of which are highly specific and selective ligands to angiotensin AT₂ receptor in various tissues (Nahmias and Stroberg 1995).

6.3 Materials and methods

6.3.1 Preparation of animal

The animals used in this study were cared for and used in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care (see Guide to the Care and Use of Experimental Animals, Vol. 1 (2nd ed., 1993) and Vol. 2 (1984); this guide is available from the Canadian Council on Animal Care, Constitution Square, Tower 2, Suite 315, 350 Albert Street, Ottawa, ON K1R 1B1, Canada).

Adult male mongrel dogs, fasted overnight but allowed free access to water, were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg iv, followed by 4 mg/kg as needed). Artificial respiration was maintained through an endotracheal tube with Harvard respiration pump (model 607, Harvard, South Natick, MA). The rectal temperature was monitored and kept constant at $37.5 \pm$

0.5°C by means of a thermoregulator (model 74; Yellow Spring Instruments, Yellow Spring, OH) connected to a heating pad. Both femoral arteries were cannulated; the right femoral artery was used to measure aortic pressure and the left femoral artery to obtain aortic blood samples.

The experimental model used in this study, that allows local intra-arterial administration of a given drug to the left adrenal gland, has previously been reported in full detail elsewhere (Yamaguchi 1993). Briefly, following a median laparotomy, a catheter (PE-90) was inserted into the left adrenolumbar artery from the peripheral end toward the adrenal gland and then advanced, so that the tip of catheter reached underneath the gland or to a level close to the adrenolumbar arterial-aortic junction. All visible branches arising from the adrenolumbar artery outside of the gland were ligated to prevent undesired drug diffusion into the systemic circulation. The volume of this catheter was 0.5 mL. The catheter was connected to a constant infusion apparatus (model 1140-001, Harvard, South Natick, MA). All drugs tested in the present study were administered through this catheter at an infusion rate of 0.5 mL/min.

To collect adrenal venous blood samples, a polyethylene catheter (PE-260) was inserted into the left adrenolumbar vein through the left femoral vein (Yamaguchi 1993). The catheter was tied in place at the adreno-abdominal vena caval junction. The left adrenolumbar vein distal to the gland was ligated to obtain actual adrenal venous blood. The volume of this catheter was 1.5 mL. Venous blood from the adrenal gland was continuously drained into a small blood reservoir to facilitate blood sampling. Venous blood in the reservoir was returned to the dog by a perfusion pump (Masterflex model 7016-52; Cole-Parmer Instrument, Chicago, IL) through a catheter inserted into the right

femoral vein at a perfusion rate adjusted to a stabilized initial venous flow. After all surgical procedures were completed, sodium heparin (200 U/kg i.v.) was administered, followed by 100 U/kg every hour thereafter. The dog was then allowed a stabilization period of about 45 min.

6.3.2 Measured parameters

Mean aortic pressure and heart rate were measured and recorded with a polygraph system (model RM-6000, Nihon-Kohden, Tokyo, Japan). For catecholamine determinations, aortic and left adrenal venous blood was sampled simultaneously. At each sampling time point, adrenal venous blood flow was determined by collecting the venous blood for 1 min into a graded tube placed in crushed ice. An aliquot of 1.5 mL of aortic and adrenal venous blood was transferred to a chilled centrifuge tube containing 30 μ L of preservative solution (pH 6.5) consisted of EGTA (95 mg/mL) and glutathione (60 mg/mL). After centrifugation at 4°C for 5 min at 14,000 revolutions/min with a refrigerated centrifuge (model 5402, Eppendorf, Hamburg, Germany), the plasma samples were stored at -80°C until assay. Plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine were quantified by means of an isocratic high performance liquid chromatographic system (Gilson, Villiers-le-Bel, France) coupled with an electrochemical detector Coulochem II (model 5200; ESA, Bedford, MA) (Yamaguchi 1993). Hematocrit was measured in all adrenal venous blood samples. At the end of each experiment, the left adrenal gland was removed and weighed. Catecholamine data was expressed in its output (ng/min/g of wet weight of the gland) as previously reported elsewhere (Yamaguchi 1993).

6.3.3 Experimental protocol

The study was carried out in two series of experiments. The first series consisted of four groups

which served to evaluate the effects of PD 123319 ((s)-1-{[4-(dimethylamino)-3-methylphenyl]-methyl}-5-(diphenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-imidazo(4,5-*c*)pyridine-6-carboxylic acid ditrifluoroacetate monohydrate, a non-peptidic selective AT₂ receptor antagonist, Research Biochemicals International, Natick, MA) on catecholamine release in response to Ang II (Sigma Chemical, St-Louis, MO). The second series involved three groups of animals which served to investigate effects of CGP 42112 (nicotinic acid-Tyr-(*N*-benzyloxycarbonylArg)-Lys-His-Pro-Ile-OH; a peptidic selective ligand for AT₂ receptor, Research Biochemicals International, Natick, MA) on basal catecholamine secretion as well as on the release of catecholamines induced by Ang II. The doses of drugs used in this study were selected based on our previous study for Ang II (Martineau et al. 1995) and on data obtained from several dose-finding pilot experiments for PD 123319 and CGP 42112.

In the first series, the first group of dogs (25.8 ± 5.2 kg, $n = 6$) received a single dose of Ang II (0.05 μ g with a solution of 0.1 μ M) in the presence of vehicle (6% ethanol prepared with saline) and served as the control group for the both series of experiments. Immediately after the initial control sample was taken, vehicle was infused into the left adrenolumbar artery for 1 min at a rate of 0.5 mL/min. Precisely 1 min after the onset of net infusion, the infusion was discontinued. The second control sample was taken 5 min after the administration of vehicle. Then, Ang II was infused following the same procedure for the vehicle administration. Adrenal venous samples were obtained during the net infusion (0-1 min) of Ang II, and 2, 3, 5 and 10 min after the onset of net infusion. The dead volume of the adrenal arterial (0.5 mL) and venous catheters (1.5 mL) were taken into account in relation to the infusion rate and venous blood flow, respectively. Aortic blood samples were simultaneously obtained at every adrenal venous sampling time point.

The second (21.4 ± 1.7 kg, $n = 5$), the third (24.3 ± 5.4 kg, $n = 5$) and the fourth group (28.7 ± 2.6 kg, $n = 6$) of dogs in the first series received the same dose of Ang II ($0.05 \mu\text{g}$, $0.1 \mu\text{M}$) after the administration of PD 123319 with a dose of $0.085 \mu\text{g}$ ($0.23 \mu\text{M}$), $0.85 \mu\text{g}$ ($2.3 \mu\text{M}$) and $8.5 \mu\text{g}$ ($23 \mu\text{M}$), respectively. The timing of drug administrations and sample collections were made following exactly the same procedures described for the vehicle control group.

In the second series, the first group of dogs (29.5 ± 2.0 kg, $n = 5$) received four different doses of CGP 42112 (0.005 , 0.05 , 0.5 , and $5.0 \mu\text{g}$ with solutions of 0.01 , 0.1 , 1.0 , and $10.0 \mu\text{M}$, respectively). This group served to test if CGP 42112 exerts any agonistic effect in the dog model. Immediately after taking the initial control sample, the first dose of CGP 42112 was infused into the left adrenolumbar artery followed by sample collections in the same way as described for Ang II in the first series. The sample obtained 10 min after the infusion of CGP 42112 served as control for the next dose of CGP 42112. This procedure was repeated for the three consecutive doses of CGP 42112.

In the second (31.1 ± 5.7 kg, $n = 5$) and third (25.7 ± 4.0 kg, $n = 5$) group of animals in the second series, the same doses of Ang II ($0.05 \mu\text{g}$, $0.1 \mu\text{M}$) were administered as in the first series after the administration of CGP 42112 with a dose of $0.5 \mu\text{g}$ ($1.0 \mu\text{M}$) and $5 \mu\text{g}$ ($10 \mu\text{M}$), respectively. Each single dose of CGP 42112 was given 5 min prior to the administration of Ang II. The protocols for the timing of drug administrations and sample collections were exactly the same as those described for the first series.

6.3.4 Statistical analyses

The statistical evaluation was made by an analysis of variance using a statistical software package (SigmaStat for Windows, Version 2.03, SPSS, Chicago, IL). Differences over a given experimental period were assessed by analysis of variance for repeated measures followed by the Dunnett's t-test for multiple comparisons with one control. Comparisons between groups were conducted by the use of one-way-analysis of variance followed by multiple comparisons with the Student-Newman-Keuls method. All results are expressed as means \pm SE, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

6.4 Results

6.4.1 Effects of Ang-II and CGP 42112 on the basal catecholamine secretion

The initial control values obtained from the first and second series of present experiments are summarized in Table 6 and 7, respectively. These values demonstrated no statistical difference between groups. In the vehicle control group, local administration of Ang II resulted in significant increases in the basal output of both epinephrine and norepinephrine (Fig. 19A). Adrenal venous catecholamine concentrations increased similarly, but adrenal gland venous blood flow remained unchanged. The onset of catecholamine response to Ang II was rapid, reaching a maximum value during the infusion. The catecholamine output from the adrenal gland had returned to control values by two minutes after administration of Ang II ceased (Fig. 19A).

In the group receiving CGP 42112 alone, the basal output of epinephrine and norepinephrine did not significantly change either during or after an infusion of any of the doses tested ranging from 0.005 μ g (0.01 μ M) to 5 μ g (10 μ M) (Fig. 19B). This held true with respect to adrenal venous blood

plasma catecholamine concentrations. Neither adrenal venous blood flow nor hematocrit changed significantly during and after local administration of CGP 42112.

6.4.2 Effect of PD 123319 on Ang-II-induced catecholamine release

PD 123319, by itself, did not significantly affect either adrenal venous catecholamine concentrations, adrenal venous blood flow or venous blood hematocrit. Adrenal catecholamine output remained stable as measured 5 min after the administration of PD 123319 with any dose tested (Fig. 20 A, B, and C). In the presence of the low dose (0.085 μg , 0.23 μM) of PD 123319, catecholamine output significantly increased in response to Ang II (Fig. 20A). The net catecholamine response was not significantly affected by the low dose of PD 123319 as compared with that observed in the vehicle control group. However, in dogs receiving the intermediate (0.85 μg , 2.3 μM) and high dose (8.5 μg , 23 μM) of PD 123319, the Ang II-induced epinephrine response was significantly attenuated following a dose-dependent manner by about 50% ($p < 0.05$) and 80% ($p < 0.001$), respectively (Fig. 21). Norepinephrine response was similarly inhibited, but the significant inhibition was observed at the highest dose tested (Fig. 21). Nevertheless, the catecholamine output still significantly increased above the baseline control in response to Ang II in the presence of PD 123319 (Fig. 20 B and C).

6.4.3 Effect of CGP 42112 on Ang-II-induced catecholamine release

As observed in the group receiving various doses of CGP 42112 alone (see above), CGP 42112, by itself, did not significantly change the basal catecholamine output in dogs receiving the dose of 0.5 μg (1.0 μM) and 5 μg (10 μM) as measured 5 min after the administration (Fig. 19 A and B). The output of both epinephrine and norepinephrine increased significantly above basal levels in response

to AII in the presence of CGP 42112 (Fig. 22 A and B), although the amplitude of the response was apparently reduced in a dose-dependent manner. Thus, the net response of catecholamine output was significantly inhibited by about 70% ($p < 0.02$) with CGP 42112 at the highest dose tested when compared to that obtained from the vehicle control group (Fig. 23).

6.5 Discussion

The present study showed that local administration of Ang II to the arterial blood supply of the left adrenal gland resulted in a significant increase in the secretion of adrenal catecholamines, while CGP 42112 did not affect the basal catecholamine secretion to any significant extent. The results of the present study also indicate that Ang II-induced adrenal catecholamine release was reduced significantly in a dose-dependent manner by selective antagonists to angiotensin AT₂ receptors in canine adrenal gland *in vivo*.

It has been well established that PD 123319 expresses highly selective and specific affinity to AT₂ receptors in various tissues, including the adrenal medulla (Bumpus et al. 1991, Timmermans et al. 1993). Furthermore, PD 123319 is widely accepted to be a selective nonpeptide AT₂ receptor antagonist (de Gasparo et al. 1998). For example, in the rat portal vein, which contains both AT₁ and AT₂ receptors, Ang II-induced contractions were partially inhibited by selective AT₂ receptor blockade with PD 123319 (Pelet et al. 1995). In the adrenal gland, AT₂ receptors have been implicated in cortisol secretion in response to Ang II in bovine adrenal fasciculata cells *in vitro* as PD 123319 significantly diminished the secretion of cortisol induced by Ang II (Defaye et al. 1995). It is conceivable that the inhibition of the release of catecholamines by the adrenal gland induced by PD

123319 was due to AT₂ receptor blockade. This present observation *in vivo* is compatible to *in vitro* work demonstrating that PD 123319 blocks Ang II-induced catecholamine release from rat adrenal medullary fragments (Belloni et al. 1998, Mazzocchi et al. 1998). These *in vitro* and *in vivo* observations are consistent with the hypothesis that the catecholamine secretagogue effect of Ang II involves, at least in part, activation of AT₂ receptors localized on adrenal medullary chromaffin cells.

CGP 42112 affects AT₂ receptors in tissues with a highly heterogenous distribution of receptor subtypes by virtue of its high affinity, high selectivity, low non-specific binding and high stability (Whitebread et al. 1991, Heemskerk and Saavedra 1995). CGP 42112 is considered to be a selective AT₂ agonist (de Gasparo et al. 1998). However, unlike PD 123319, the pharmacological activity of CGP 42112 is likely to vary depending on tissues and species studied. For example, CGP 42112 has been claimed to act as a full AT₂ agonist in intact PC12W cells (Brechler et al. 1993) and in the rat adrenal medullary fragments *in vitro* (Belloni et al. 1998). By contrast, CGP 42112 was found to behave as a selective AT₂ antagonist in cultured rat cardiac myocytes (Lokuta et al. 1994) as well as in the duck adrenal gland and subfornical organ *in vitro* (Schäfer et al. 1996).

In the present study, CGP 42112, by itself, did not significantly affect basal catecholamine secretion at any of doses tested (0.005 µg, 0.01 µM to 5 µg, 10 µM). We have previously shown that Ang II markedly increased the basal catecholamine secretion in a dose-dependent manner within the dose range similar to that used for CGP 42112 (Martineau et al. 1995). Moreover, it has been shown that the binding potency of CGP 42112 at AT₂ receptors is significantly greater than that of Ang II

(Heemskerk and Saavedra 1995). Therefore, the lack of any positive effect of CGP 42112 on the basal catecholamine secretion is compatible with the view that CGP 42112 is devoid of any agonist activity in the canine adrenal medulla *in vivo*. However, the lack of any agonist activity on AT₂ receptors is sharply contrasted with the recent observation in rat adrenal medullary fragments in which basal catecholamine release increased significantly in response to CGP 42112 in a concentration-dependent manner within the range from 0.001 μ M to 1.0 μ M (Belloni et al. 1998). The reason for this discrepancy is at present unclear. It may be accounted for by the different experimental conditions (*in vivo* versus *in vitro*) or the different animal species (dog versus rat) employed in those studies. Indeed, chromaffin cells in adrenal medullary fragments *in vitro* may differ from those in adrenal medulla *in vivo* in their reactivity in response to Ang II. For example, chromaffin cells *in vitro* had to be incubated with Ang II for 90 min to obtain an appropriate catecholamine response (Belloni et al. 1998), while adrenal medulla tissues studied *in vivo* are affected when exposed to Ang II for only 1 min at an infusion rate of 0.5 mL/min (Martineau et al. 1995). Furthermore, the distinctive reactivity of such tissues may differ among species.

The results of present experiments indicate that Ang II-induced adrenal catecholamine release is attenuated in the presence of CGP 42112. Because CGP 42112 is highly selective to AT₂ receptors with low non-specific binding (Whitebread et al. 1991, Heemskerk and Saavedra 1995), it is plausible that the observed inhibition by CGP 42112 of the catecholamine release is primarily attributable to specific blockade of AT₂ receptors in the adrenal medulla. Taken together with the results obtained when studying the nonpeptidic AT₂ antagonist PD 123319, the present data support the hypothesis that AT₂ receptors are functionally involved in local regulation of catecholamine secretion by canine

adrenal medulla *in vivo*.

In addition to various signal transduction pathways mediated via AT₂ receptors such as stimulation of potassium currents, decrease in cyclic GMP levels, decrease in tyrosine phosphatase, and inhibition of mitogen-activated protein kinases (Csikos et al. 1998, Ardaillou 1999), AT₂ receptors have also been implicated in arachidonic acid formation through the activation of phospholipase A₂ in response to Ang II in cultured rat cardiac myocytes (Lokuta et al. 1994, Nahmias and Strosberg 1995). It is conceivable that, in the canine adrenal medulla, stimulation of AT₂ receptors may also result in the production of arachidonic acid, which, in turn, evokes catecholamine release. Arachidonic acid, which is generated by phospholipase A₂ in response to prostaglandin E₂, has been implicated in mechanisms controlling catecholamine release in cultured bovine adrenal chromaffin cells (Negishi and Ito 1992). Taken together, these observations are compatible with the hypothesis that, in the canine adrenal medulla, AT₂ receptors play a role in activating phospholipase A₂, resulting in the production of arachidonic acid, which, in turn, provokes catecholamine release.

It may be of particular importance that Ang II-induced catecholamine release was only partially blocked by AT₂ antagonists even in the presence of their largest doses tested in the present study. The remaining catecholamine response to Ang II may result from other factors such as direct activation of L-type Ca²⁺ channel in the adrenal medulla. In support of this possibility, we have previously shown that the maximum catecholamine response to Ang II is partially inhibited in the presence of nifedipine. This occurred at a dose that abolished catecholamine release induced by a selective L-type Ca²⁺ channel activator BAY K 8644 in the model similar to that used in the present

study (Martineau et al. 1996). In addition, the contribution of AT₁ receptor activation cannot be ruled out under the present experimental conditions. Employing a similar dog model, we have observed that a selective nonpeptidic AT₁ antagonist BMS 186295, which is tenfold more potent than DuP 753 (Cazaubon et al. 1993, Herbert et al. 1994, Johnston et al. 1997), diminishes catecholamine responses induced by Ang II (Martineau et al. 1995). However, Ang II-induced catecholamine response cannot completely be abolished even in the presence of the largest dose tested of BMS 186295 (Martineau et al. 1995). Taken together, AT₁ and AT₂ receptors as well as L-type Ca²⁺ channel appear to be involved in a redundant manner in the local regulation of adrenal catecholamine secretion induced by Ang II *in vivo*. It is, therefore, most likely that all three factors are needed for the adrenal medulla to fully respond to Ang II. In this context, AT₁ receptors have been implicated, although to a lesser extent as compared with AT₂ receptors, in Ang II-induced catecholamine release, even in the rat adrenal medulla (Belloni et al. 1998) in which the distribution of AT₂ receptors predominates over AT₁ receptors (Balla et al. 1991, Sechi et al. 1992, Marchand et al. 1993, Belloni et al. 1998).

In conclusion, PD 123319 and CGP 42112 did not increase basal catecholamine secretion to any significant extent when administered during control conditions, indicating the lack of agonist activity in canine adrenal medullae *in vivo*. Furthermore, the present study showed that peptidic and nonpeptidic AT₂ antagonists can inhibit Ang II-induced release of catecholamines by adrenal gland in a dose-dependent manner. These observations suggest that AT₂ receptors may be involved in Ang II-induced catecholamine secretion by canine adrenal glands *in vivo*.

6.6 Acknowledgements

The present study was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Canada (Quebec) and from Medical Research Council of Canada (MT-10605). During this study, D. Martineau and S. Lamouche was a holder of a studentship granted by the Société québécoise d'hypertension artérielle for 1995-1996 and 1997-1998, respectively. The authors thank Sanae Yamaguchi and Richard Lalande for their skilled and devoted technical assistance.

6.7 References

- Ardailou, R. 1999. Angiotensin II receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: S30-S39.
- Balla, T., Baukal, A. J., Eng, S., and Catt, K. J. 1991. Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol. Pharmacol.* **40**: 401-406.
- Belloni, A. S., Andreis, P. G., Macchi, V., Gottardo, G., Malendowicz, L. K., and Nussdorfer, G. G. 1998. Distribution and functional significance of angiotensin-II AT₁- and AT₂-receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Endocrine Res.* **24**: 1-15.
- Brechler, V., Jones, P. W., Levens, N. R., De Gasparo, M., and Bottari, S. P. 1993. Agonistic and antagonistic properties of angiotensin analogs at the AT₂ receptor in PC12W cells. *Reg. Peptides.* **44**: 207-213.
- Bumpus, F. M., Catt, K. J., Chiu, A. T., De Gasparo, M., Goodfriend, T., Husain, A. Peach, M. J., Taylor, D. G., and Timmermans, P. B. M. W. M. 1991. Nomenclature for angiotensin receptors. *Hypertension* **17**: 720-721.
- Bunn, S. J., and Marley, P. D. 1989. Effects of angiotensin II on cultured, bovine adrenal medullary cells. *Neuropeptides.* **13**: 121-132.
- Cazaubon, C., Gougat, J., Bousquet, F., Guiraudou, P., Gayraud, R., Lacour, C., Roccon, A., Galindo, A., Barthelemy, G., Gautret, B., Bernhart, C., Perreault, P., Breliere, J. C., Lefur, G., and Nisato, D. 1993. Pharmacological characterization of SR 47436, a new nonpeptide AT₁ subtype angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**: 826-834.
- Chung, O., Kühl, H., Stoll, M., and Unger, T. 1998. Physiological and pharmacological implications of AT₁ versus AT₂ receptors. *Kidney Int.* **54** (Suppl. 67): S95-S99.
- Csikos, T., Chung, O., and Unger, T. 1998. Receptors and their classification: focus on angiotensin

- II and the AT₂ receptor. *J. Hum. Hypertens.* **12**: 311-318.
- Defaye, G., Lecompte, S., Chambaz, E. M., and Bottari, S. P. 1995. Stimulation of cortisol production through angiotensin AT₂ receptors in bovine fasciculata cells. *Endocrine Res.* **21**: 183-187.
- de Gasparo, M., and Whitebread, S. 1995. Binding of valsartan to mammalian angiotensin AT₁ receptors. *Reg. Peptides.* **59**: 303-311.
- de Gasparo, M., Catt, K. J., and Inagami, T. 1998. Angiotensin receptors. In: *The IUPHAR Receptor Compendium*. IUPHAR Media Ltd., The Burlington Press, Foxton, Cambridge, U.K. pp. 80-86.
- Hano, T., Mizukoshi, M., Baba, A., Nakamura, N., and Nishio, I. 1994. Angiotensin II subtype 1 receptor modulates epinephrine release from isolated rat adrenal gland. *Blood Pressure Suppl.* **5**: 105-108.
- Heemskerk, F. M., and Saavedra, J. M. 1995. Quantitative autoradiography of angiotensin II AT₂ receptors with [¹²⁵I]CGP 42112. *Brain Res.* **677**: 29-38.
- Herbert, J. M., Delisee, C., Dol, F., Schaeffer, P., Cazaubon, C., Nisato, D., and Chatelain P. 1994. Effect of SR 47436, a novel angiotensin II AT₁ receptor antagonist, on human vascular smooth muscle cells in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **251**: 143-150.
- Israel, A., Stromberg, C., Tsutsumi, K., Garrido, M. D., Torres, M., and Saavedra, J. M. 1995. Angiotensin II receptor subtypes and phosphoinositide hydrolysis in rat adrenal medulla. *Brain Res. Bull.* **38**: 441-446.
- Johnston, C. I., Naitoh, M., and Burrell, L. M. 1997. Rationale and pharmacology of antiotensin II receptor antagonists: current status and future issues. *J. Hypertens.* **15**: S3-S6.

- Lokuta, A. J., Cooper, C., Gaa, S. T., Wang, H. E., and Rogers, T. B. 1994. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 4832-4838.
- Lu, X. Y., Grove, K. L., Zhan, W., and Speth, R. C. 1995. Pharmacological characterization of angiotensin II AT₂ receptor subtype heterogeneity in the rat adrenal cortex and medulla. *Endocrine J.* **3**: 255-261.
- Marchand, C., Brown, L., and Sernia, C. 1993. Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22**: 449-455.
- Martineau, D., Briand, R., and Yamaguchi, N. 1996. Functional evidence for L-type Ca²⁺ channels controlling adrenal catecholamine release induced by angiotensin II in vivo. *Am. J. Physiol.* **271**: R1713-R1719.
- Martineau, D., Yamaguchi, N., Briand, R. 1995. Inhibition by BMS 186295, a selective nonpeptide AT₁ antagonist, of adrenal catecholamine release induced by angiotensin II in the dog in vivo. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**: 459-464.
- Mazzocchi, G., Gottardo, G., Macchi, V., Andreis, P. G., Malendowicz, L. K., and Nussdorfer, G. G. 1998. The AT₂ receptor-mediated stimulation of adrenal catecholamine release may potentiate the AT₁ receptor-mediated aldosterone secretagogue action of angiotensin-II in rats. *Endocrine Res.* **24**: 17-28.
- Nahmias, C., and Strosberg, A. D. 1995. The angiotensin AT₂ receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**: 217-252.
- Negishi, M., and Ito, S. 1992. Prostaglandin E₂-induced arachidonic acid release and catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 2315-2321.

- Pelet, C., Mironneau, C., Rakotoarisoa, L., and Neuilly, G. 1995. Angiotensin II receptor subtypes and contractile responses in portal vein smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **279**: 15-24.
- Powis, D. A., and O'Brien, K. J. 1991. Angiotensin II increases catecholamine release from bovine adrenal medulla but does not enhance that evoked by K⁺ depolarization or by carbachol. *J. Neurochem.* **57**: 1461-1469.
- Schafer, F., Muller, A. R., Schmid, H. A., Gerstberger, R., and Simon, E. 1996. Angiotensin II receptor subtypes in the duck subfornical organ: an electrophysiological and receptor autoradiographic investigation. *Brain Res.* **711**: 118-124.
- Sechi, L. A., Griffin, C.A., Grady, E.F., Kalinyak, J.E., and Schambelan, M. 1992. Cardiac angiotensin receptors in experimental hyperthyroidism in dogs. *Cir. Res.* **71**: 1482-1489.
- Timmermans, P. B. M. W. M., Benfield, D., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Wong, P. C., and Smith, R. D. 1992a. Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am. J. Hypertens.* **5**: 221S-235S.
- Timmermans, P. B. M. W. M., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Wong, P. C., and Smith, R. D. 1992b. Angiotensin II receptor subtypes. *Am. J. Hypertens.* **5**: 406-410.
- Timmermans, P. B. M. W. M., Wong, P.C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A. M., and Smith, R. D. 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* **45**:205-251.
- Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., Hohle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U., and Zhu, Y. Z. 1996. Angiotensin receptors. *J. Hypertens.* **14**: S95-S103.
- Whitebread, S. E., Tayler, V., Bottari, S. P., Kamber, B., and de Gasparo, M. 1991. Radioiodinated CGP 42112A: A novel high affinity and highly selective ligand for the characterization of

angiotensin AT₂ receptors. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* **181**: 1365-1371.

Wong, P. C., Hart, S. D., Zaspei, A., Chiu, A. T., Smith, R. D., and Timmermans, P. B. M. W. M.

1990. Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DuP

753 (AII-1) and PD 123177 (AII-2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**: 584-592.

Yamaguchi, N. 1993. In vivo evidence for adrenal catecholamine release mediated by nonnicotinic

mechanism: local medullary effect of VIP. *Am. J. Physiol.* **265**: R766-R771.

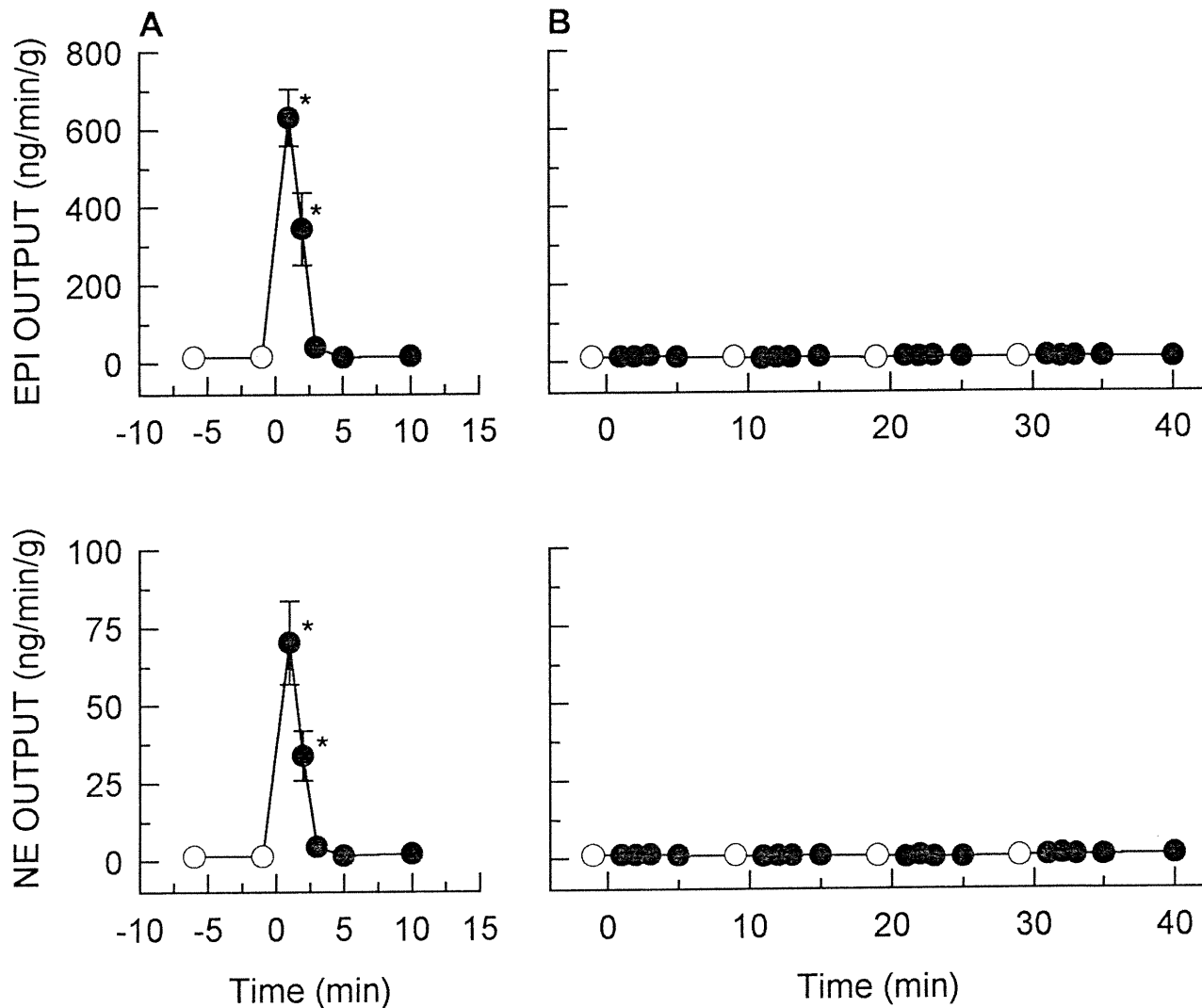


Fig. 19. A) Effects on epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of Ang II ($0.05 \mu\text{g}$, $0.1 \mu\text{M}$) locally administered to the left adrenal gland in dogs receiving the vehicle. The vehicle was administered at -5 min, and Ang II at 0 min. Open circles indicate control values taken immediately before the administration of vehicle. Stippled circles represent values obtained 5 min after vehicle and immediately before the administration of Ang II. *, $p < 0.05$ ($n = 6$) versus corresponding basal control values (stippled circles).

B) Effects of various doses of CGP 42112 locally administered to the left adrenal gland on the basal output of adrenal epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE). CGP 42112 was administered at 0 , 10 , 20 , and 30 min with the dose of $0.005 \mu\text{g}$ ($0.01 \mu\text{M}$), $0.05 \mu\text{g}$ ($0.1 \mu\text{M}$), $0.5 \mu\text{g}$ ($1.0 \mu\text{M}$), and $5 \mu\text{g}$ ($10 \mu\text{M}$), respectively. Open circles indicate control values taken immediately before each administration of CGP 42112. The scale of Y-axis is the same as that shown in column A. The data were obtained in a single group of dogs ($n = 5$), which was different from that shown in column A.

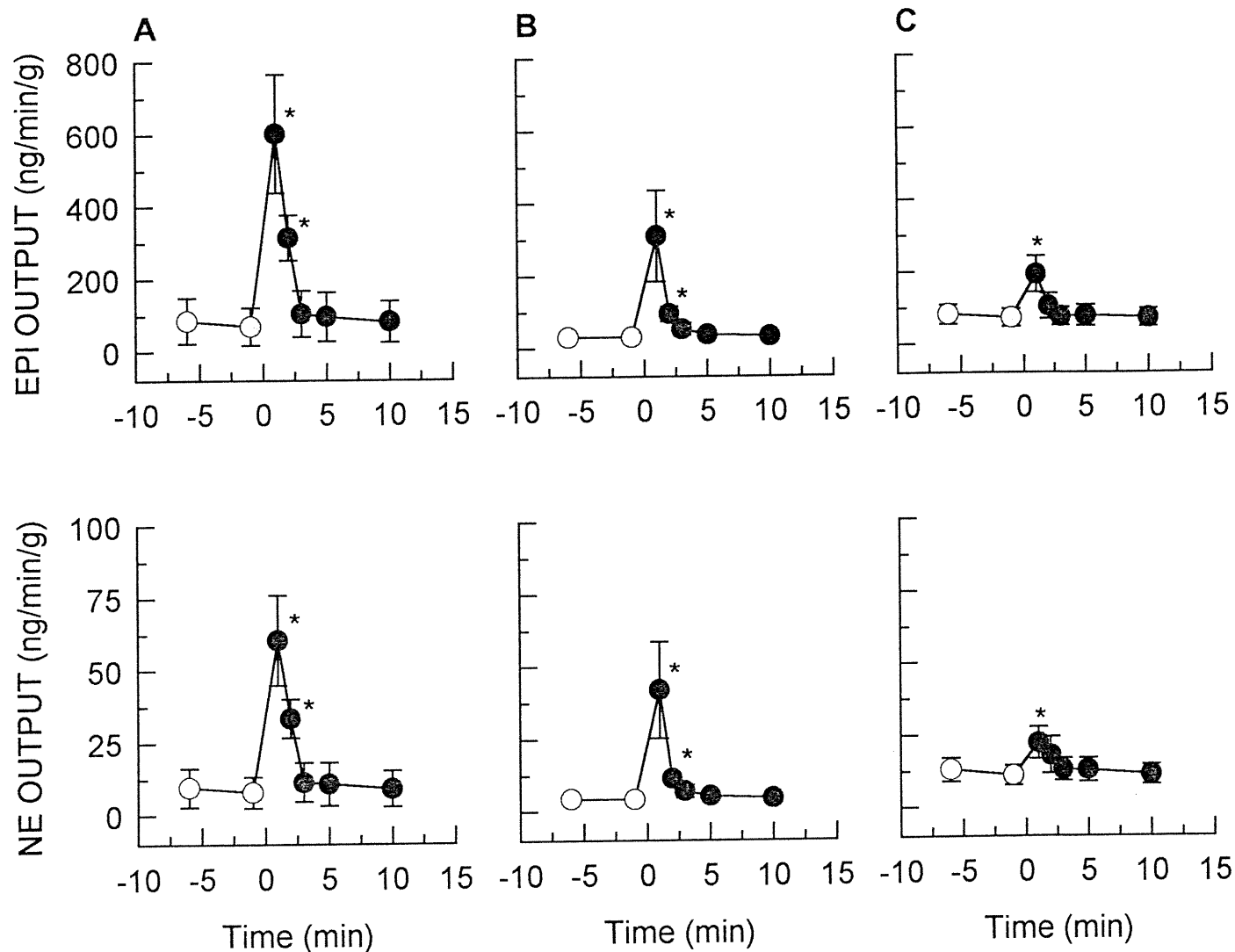


Fig. 20. Effects on epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of Ang II (0.05 μ g, 0.1 μ M) in three separate groups of dogs receiving A) 0.085 μ g (0.23 μ M, n = 5), B) 0.85 μ g (2.3 μ M, n = 5) and C) 8.5 μ g (23 μ M, n = 6) of PD 123319. PD 123319 was administered at -5 min, and Ang II at 0 min. Open circles indicate control values taken immediately before the administration of PD 123319. Stippled circles represent values obtained 5 min after PD 123319 and immediately before the administration of Ang II. The scale of Y-axes in columns B and C is the same as that shown in column A. *, $p < 0.05$ versus corresponding control values (stippled circles).

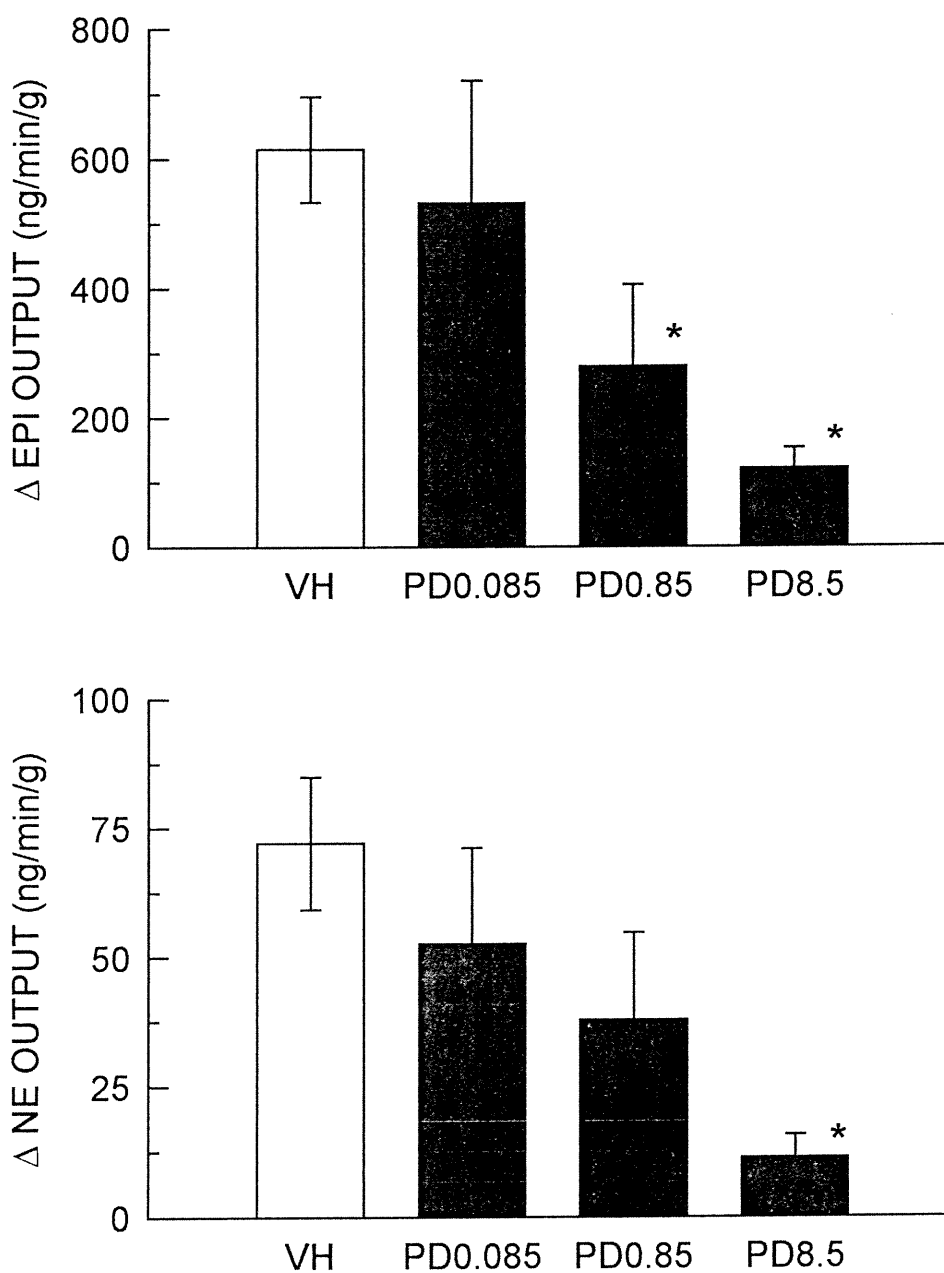


Fig. 21. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output induced by Ang II ($0.05 \mu\text{g}$, $0.1 \mu\text{M}$) in four separate groups of dogs receiving the vehicle (VH, $n = 6$), $0.085 \mu\text{g}$ ($0.23 \mu\text{M}$, PD0.085, $n = 5$), $0.85 \mu\text{g}$ ($2.3 \mu\text{M}$, PD0.85, $n = 5$) and $8.5 \mu\text{g}$ ($23 \mu\text{M}$, PD8.5, $n = 6$) of PD 123319. The figures indicated immediately after "PD" represent different doses (μg) of PD 123319. *, $p < 0.05$ versus VH. The original data are shown in Fig. 20A and Fig. 21.

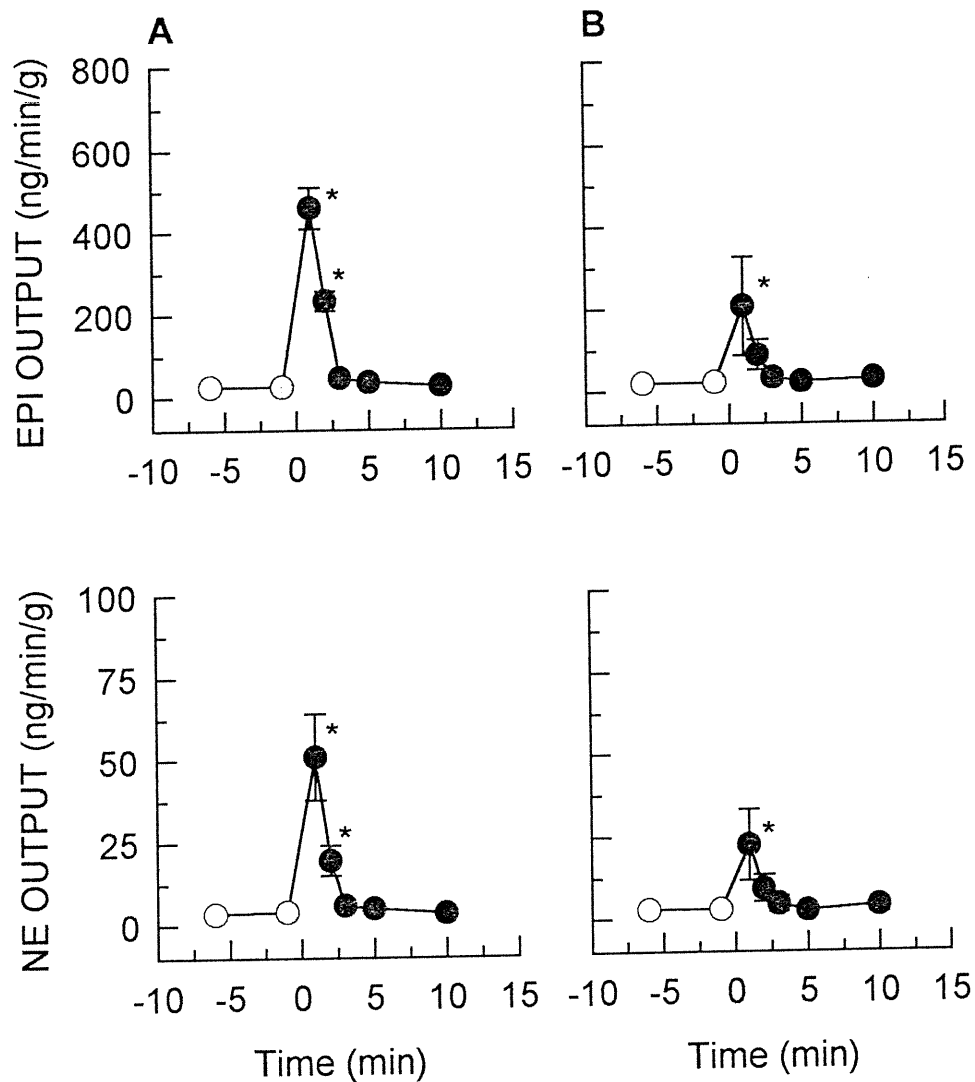


Fig. 22. Effects on epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of Ang II (0.05 μ g, 0.1 μ M) in two separate groups of dogs receiving A) 0.5 μ g (1.0 μ M, n = 5) and B) 5 μ g (10 μ M, n = 5) of CGP 42112. CGP 42112 was administered at -5 min, and Ang II at 0 min. Open circles indicate control values taken immediately before the administration of CGP 42112. Stippled circles represent values obtained 5 min after CGP 42112 and immediately before the administration of Ang II. The scale of Y-axis in column B is the same as that shown in column A. *, $p < 0.05$ versus corresponding control values (stippled circles).

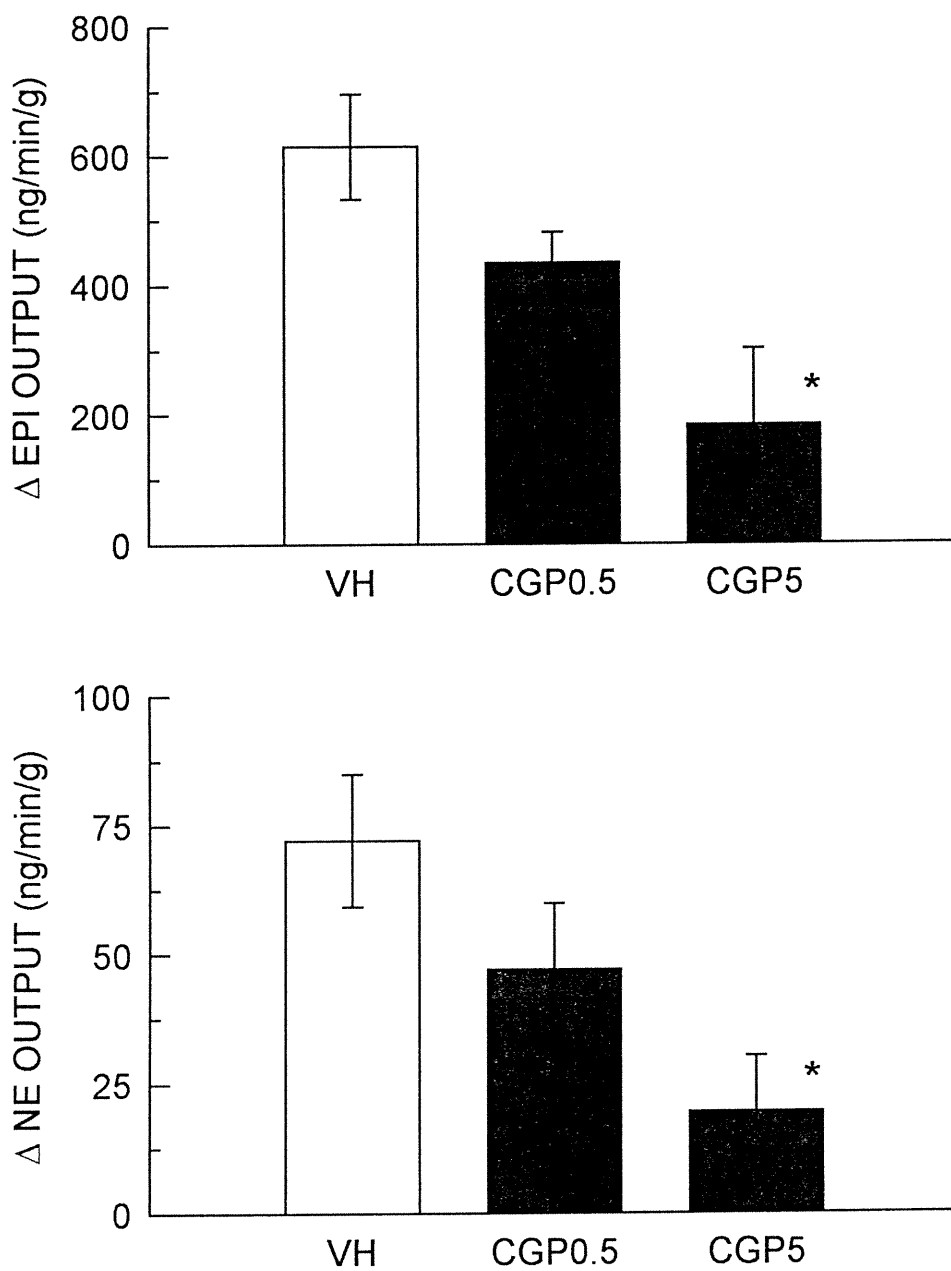


Fig. 23. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output induced by Ang II (0.05 μ g, 0.1 μ M) in three separate groups of dogs receiving the vehicle (VH, $n = 6$), 0.5 μ g (1.0 μ M, CGP0.5, $n = 5$) and 5 μ g (10 μ M, CGP5, $n = 5$) of CGP 42112. The figures indicated immediately after "CGP" represent different doses (μ g) of CGP 42112. *, $p < 0.05$ versus VH. The original data are shown in Fig. 20A and Fig. 22.

Table 6. Basal values for plasma catecholamine concentrations and cardiovascular parameters observed in the first series of experiments.

| Parameters | Group 1 | Group 2 | Group 3 | Group 4 |
|------------------------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| [EPI] _{ADV} , ng/mL | 8.56±5.80 | 29.86±20.80 | 17.41±5.43 | 26.52±7.94 |
| [NE] _{ADV} , ng/mL | 1.47±0.57 | 3.51±2.22 | 2.58±0.83 | 4.26±1.09 |
| [EPI] _{AO} , ng/mL | 0.10±0.03 | 0.18±0.06 | 0.17±0.07 | 0.26±0.06 |
| [NE] _{AO} , ng/mL | 0.17±0.03 | 0.15±0.03 | 0.20±0.07 | 0.26±0.03 |
| BF _{ADV} , mL/min | 3.1±0.3 | 3.3±0.2 | 4.1±0.5 | 5.1±0.5 |
| HCT _{ADV} , % | 47.2±2.4 | 43.9±2.8 | 48.4±1.4 | 46.7±1.7 |
| HR, beats/min | 147.8±8.3 | 140.6±5.1 | 154.6±13.00 | 164.2±8.4 |
| MAP, mmHg | 119.2±2.9 | 107.3±8.1 | 118.8±10.7 | 133.7±3.9 |
| LAG, g | 1.10±0.11 | 0.73±0.10 | 1.04±0.13 | 0.89±0.10 |

Note: Values are means ± SE (n = 6 for groups 1 and 4, and n = 5 for groups 2 and 3). ADV, adrenal venous; AO, aortic; EPI, epinephrine; NE, norepinephrine; BF, blood flow; HCT, hematocrit; HR, heart rate; MAP, mean aortic pressure; LAG, post-mortem wet weight of left adrenal gland. Group 1, 2, 3 and 4 received Ang II (0.05 µg, 0.1 µM) in the presence of vehicle, 0.085 µg (0.23 µM), 0.85 µg (2.3 µM) and 8.5 µg (23 µM) of PD 123319, respectively.

Table 7. Basal values for plasma catecholamine concentrations and cardiovascular parameters observed in the second series of experiments.

| Parameters | Group 1 | Group 2 | Group 3 |
|------------------------------|------------|------------|-----------|
| [EPI] _{ADV} , ng/mL | 6.78±1.05 | 11.63±2.27 | 9.41±3.16 |
| [NE] _{ADV} , ng/mL | 0.81±0.08 | 1.68±0.31 | 1.49±0.48 |
| [EPI] _{AO} , ng/mL | 0.11±0.04 | 0.08±0.02 | 0.10±0.01 |
| [NE] _{AO} , ng/mL | 0.15±0.04 | 0.19±0.05 | 0.18±0.05 |
| BF _{ADV} , mL/min | 4.4±0.2 | 4.3±0.2 | 4.3±0.7 |
| HCT _{ADV} , % | 51.4±1.0 | 47.3±2.5 | 44.2±2.5 |
| HR, beats/min | 159.0±8.4 | 152.6±7.2 | 161.2±6.8 |
| MAP, mmHg | 122.0±10.6 | 132.8±5.5 | 128.0±9.8 |
| LAG, g | 1.24±0.06 | 1.13±0.13 | 0.99±0.08 |

Note: Values are means ± SE (n = 5). ADV, adrenal venous; AO, aortic; EPI, epinephrine; NE, norepinephrine; BF, blood flow; HCT, hematocrit; HR, heart rate; MAP, mean aortic pressure; LAG, post-mortem wet weight of left adrenal gland. Group 1, 2 and 3 received four different doses of CGP 42112 alone, Ang II (0.05 µg, 0.1 µM) in the presence of 0.5 µg (1.0 µM) and 5 µg (10 µM) of CGP 42112, respectively.

CHAPITRE 7 FUNCTIONAL EVIDENCE FOR L-TYPE Ca^{2+} CHANNELS
CONTROLLING ANG-INDUCED ADRENAL
CATECHOLAMINE RELEASE IN VIVO

Martineau, D., Briand, R., et Yamaguchi, N.

American Journal of Physiology

271: R1713 - R1719, 1996.

7.1 SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the functional involvement of L- and/or N-type Ca^{2+} channels in adrenal catecholamine secretion in response to exogenous angiotensin II in anesthetized dogs. Plasma catecholamine concentrations in adrenal venous and aortic blood were determined by an HPLC-electrochemical method. In the first series of experiments, repeated infusions of BAY-K 8644 locally administered into the left adrenal gland with an interval of 15 min resulted in significant and reproducible increases in adrenal catecholamine secretion. Nifedipine, similarly administered 5 min prior to BAY-K 8644, diminished BAY-K 8644-induced catecholamine secretion in a dose-dependent manner and completely blocked the catecholamine response with the highest dose tested. In the second series, locally infused angiotensin II resulted in a significant increase in adrenal catecholamine secretion. The maximum catecholamine response to angiotensin II was attenuated by approximately 65% in the presence of nifedipine with the dose that abolished the BAY-K 8644-induced catecholamine release. This inhibition by nifedipine remained unchanged in the presence of additional ω -conotoxin. The present study shows that dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channels are operative in the adrenal medulla of the dog in vivo. The results indicate that the L-type Ca^{2+} channels are only partially implicated in the local regulation of angiotensin II-induced adrenal catecholamine secretion, suggesting the existence of another mechanism. However, ω -conotoxin-sensitive N-type Ca^{2+} channels are unlikely to be functionally involved in postsynaptic mechanisms mediating adrenal catecholamine secretion in response to exogenous angiotensin II under in vivo conditions.

Key words: adrenal medulla, anesthetized dog, BAY K-8644, ω -conotoxin, nifedipine

7.2 INTRODUCTION

The local renin-angiotensin system has been extensively studied in various tissues, particularly in the cardiovascular system (6, 23, 28). In the adrenal gland, many previous *in vitro* observations, derived mostly from cultured bovine adrenal chromaffin cells, indicate that exogenous angiotensin II appears to stimulate the catecholamine release by increasing Ca^{2+} entry via L-type Ca^{2+} channels localized on the outer surface of chromaffin cell membrane (3, 5, 26). Moreover, it has been reported that, in bovine adrenal medullary cells, Ca^{2+} influx and the consequent catecholamine release in response to angiotensin II are blocked in the presence of ω -conotoxin, a selective N-type Ca^{2+} channel blocker (21). However, the functional involvement of Ca^{2+} channels in locally controlling stimulation-induced catecholamine secretion still remains controversial in the dog adrenal gland under *in vivo* conditions (9, 27). On the other hand, angiotensin II receptor-mediated postsynaptic mechanisms have also been significantly implicated in adrenal catecholamine response to angiotensin II both *in vitro* (31) and *in vivo* studies (20). In this context, however, we have recently observed that a selective AT_1 antagonist, BMS 186295, failed to completely block the adrenal catecholamine response to angiotensin II in anesthetized dogs (20), suggesting the existence of additional mechanisms implicated in the adrenomedullary action of angiotensin II. According to numerous *in vitro* studies (7, 10, 22), a possible candidate for such mechanisms of action of angiotensin II is the Ca^{2+} channel, which might be directly or indirectly activated by angiotensin II (36). This consideration prompted us to further investigate whether L- and/or N-type Ca^{2+} channels are actually operative in angiotensin II-induced adrenal catecholamine secretion under *in vivo* conditions. Therefore, the specific aims of the present study were twofold; 1) to demonstrate the functional existence of dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channels and 2) to determine whether L- and/or N-type Ca^{2+}

channels are functionally involved in catecholamine secretion in response to locally administered angiotensin II in the dog adrenal medulla of an in vivo model.

7.3 METHODS

7.3.1 *Surgical preparation*

Adult male mongrel dogs (27.3 ± 1.0 kg, $n = 37$), fasted overnight but allowed free access to water, were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg iv, followed by ~ 4 mg/kg as needed). Artificial respiration was maintained through an endotracheal tube with Harvard respiration pump (model 607, Harvard, South Natick, MA). The rectal temperature was monitored and kept constant at $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ by means of a thermoregulator (model 74; Yellow Spring Instruments, Yellow Spring, OH) connected to a heating pad. Both femoral arteries were cannulated; the right femoral artery was used to measure aortic pressure and the left femoral artery to obtain aortic blood samples.

Our model that allows local arterial administration of a given drug into the left adrenal gland has been reported in full detail elsewhere (33). Briefly, following a median laparotomy, a catheter (PE-90) was inserted into the left adrenolumbar artery from the peripheral end toward the gland and then advanced, so that the tip of catheter reached underneath the gland or to a level close to the adrenolumbar arterial-aortic junction. All visible branches arising from the adrenolumbar artery toward outside of the gland were ligated to prevent undesired drug diffusion into the systemic circulation. The volume of this catheter was fixed to be 0.5 ml and the catheter was connected to an infusion pump (model 1140-001, Harvard, South Natick, MA).

To collect adrenal venous samples, a polyethylene catheter (PE-260) was inserted into the left adrenolumbar vein through the left femoral vein (33). The catheter was tied at the adreno-abdominal vena cava junction. The left adrenolumbar vein distal to the gland was ligated to obtain actual adrenal venous blood. The volume of this catheter was fixed to be 1.5 ml. Venous blood from the gland was continuously drained into a small blood reservoir to facilitate blood sampling. Venous blood in the reservoir was returned to the dog by a perfusion pump (Masterflex model 7016-52; Cole-Parmer Instrument, Chicago, IL) through a catheter inserted into the right femoral vein at a perfusion rate adjusted to a stabilized initial venous flow. After all surgical procedures were completed, sodium heparin (200 U/kg iv) was administered, followed by 100 U/kg every hour thereafter. The dog was then allowed a stabilization period of about 45 min.

7.3.2 *Measured parameters*

Mean aortic pressure and heart rate were measured and recorded with a polygraph system (model RM-6000, Nihon-Kohden, Tokyo, Japan). For catecholamine determinations, aortic and left adrenal venous blood were sampled simultaneously. At each sampling time point, adrenal venous blood flow was determined by collecting the venous blood for 1 min into a graded tube placed in crushed ice. An aliquot of 1.5 ml of aortic and adrenal venous blood was transferred to a chilled centrifuge tube containing 30 μ l of preservative solution (pH 6.5) consisting of EGTA (95 mg/ml) and glutathione (60 mg/ml). After centrifugation at 4°C for 5 min at 14,000 revolutions/min with a refrigerated centrifuge (model 5402, Eppendorf, Hamburg, Germany), the plasma was stored at -80°C until assay. Plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine were quantified by means of an isocratic high performance liquid chromatographic system (Gilson, Villiers-le-Bel, France)

coupled with an electrochemical detector "Coulchem II " (model 5200; ESA, Bedford, MA) (26). Hematocrit was measured in all adrenal venous blood samples. At the end of each experiment, the left adrenal gland was removed and weighed. Catecholamine data was expressed as net output ($\text{ng}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of wet weight of the gland) as previously reported (33).

7.3.3 *Experimental protocol*

Two series of experiments were carried out. First, two groups of dogs ($n= 8/\text{group}$) received three repetitive doses of BAY-K 8644 ($0.5\ \mu\text{g}$ with a solution of $1.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$; Calbiochem La Jolla, CA) with an interval of 15 min. In the first group, the vehicle was given 5 min prior to each administration of BAY-K 8644, serving as the vehicle control group for the reproducibility of adrenal catecholamine response to local BAY-K 8644. The second group received three different doses of nifedipine (0.5 , 5 , and $50\ \mu\text{g}$ with a solution of 1 , 10 , and $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$, respectively; Sigma Chemical) following the same procedure described above for the control group. Each dose of nifedipine was given, instead of vehicle, 5 min prior to the BAY-K 8644 infusion. In the second series of experiments, three groups of dogs were used. The first two groups received a single dose of angiotensin II ($0.05\ \mu\text{g}$ with a solution of $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma Chemical) in the absence ($n = 8$) and the presence ($n = 8$) of a single dose of nifedipine ($50\ \mu\text{g}$ with a solution of $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$), serving as the control and nifedipine-treated group, respectively. The third group ($n = 5$) received the single dose of angiotensin II ($0.05\ \mu\text{g}$) in the presence of both nifedipine ($50\ \mu\text{g}$) and ω -conotoxin ($25\ \mu\text{g}$ with a solution of $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$; ω -conotoxin GVIA, Sigma Chemical). Either vehicle, nifedipine, or nifedipine plus ω -conotoxin was given 5 min prior to the infusion of angiotensin II.

In the control group of the first series of experiments, immediately after the initial control sample was taken, vehicle (6% ethanol prepared with saline) was infused into the left adrenolumbar artery for 2 min at a rate of 0.5 ml/min. The dead volume of the adrenal arterial catheter (0.5 ml) was taken into account in relation to the infusion rate. Precisely 1 min after the net infusion (i.e. 2 min after the onset of infusion), the vehicle infusion was discontinued. The second control sample was taken 5 min after the vehicle administration. Then, the first dose of BAY-K 8644 was infused following the same procedure for the vehicle administration. Adrenal venous samples were obtained precisely for 1 min during the net infusion of the drug, and 1, 2, and 4 min after the onset of net infusion. A sample taken 15 min after the vehicle administration served as another control. This procedure was repeated for the second and third block of vehicle or drug administration. In the nifedipine-treated group, the three different doses of nifedipine were administered following exactly the same procedures of the vehicle administrations described for the first group.

In the first group of the second series, immediately after taking the initial control sample, vehicle (6% ethanol prepared with saline) was infused into the left adrenolumbar artery as described for the first series. Then, the second control sample was taken 5 min after the vehicle administration. Immediately after the second control sample, the single dose of angiotensin II was administered followed by sample collections in the same way as described for the BAY-K 8644 administration. In the second group, the maximum dose of nifedipine used in the first series was administered following the same procedure as described for the vehicle control group. In the third group, after taking the initial control, nifedipine was first administered 5 min prior to the administration of ω -conotoxin, and then further 5 min after ω -conotoxin, angiotensin II was given followed by sample collections in the

same manner as described above. In all dogs used in both series of experiments, aortic blood samples (~ 1.5 ml each) were simultaneously obtained at every adrenal venous sampling time point. The dose of BAY-K 8644 used in this study was selected by several dose-finding pilot experiments. The dose of angiotensin II and the dose range of nifedipine were selected based on our previous data obtained under similar experimental conditions (20, 32, 34). The dose of ω -conotoxin was chosen according to the previous observation reported by others (17).

7.3.4 *Statistical analyses*

The statistical evaluation was made by an analysis of variance using a statistical software package (SigmaStat for Windows, Version 1.0, Jandel Scientific, San Rafael, CA). Differences over a given experimental period were assessed by analysis of variance for repeated measures followed by the Dunnett's t-test for multiple comparisons with one control. Comparisons between groups were conducted by the use of one way analysis of variance. All results are expressed as means \pm SE, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

7.4 RESULTS

7.4.1 *Effect of BAY-K 8644 on adrenal catecholamine secretion*

In the two series of experiments, the initial basal values for mean aortic pressure, heart rate, and hematocrit remained statistically unchanged during the whole experimental period either in the absence or presence of the drugs used in the present study. The repetitive administration of BAY-K 8644 significantly increased the output of adrenal epinephrine and norepinephrine (Fig. 24). The three catecholamine responses were comparable, and there was no statistical difference among them,

indicating the reproducibility of the catecholamine response to BAY-K 8644 (Fig. 24). The maximum value of catecholamine output was observed 2 min following the net infusion of BAY-K 8644 and returned to the corresponding control levels by 4 min after the cessation of the drug administration (Fig. 24). Nifedipine, by itself, did not significantly affect adrenal catecholamine output during the resting control period. The catecholamine response to BAY-K 8644 was significantly inhibited in the presence of nifedipine by approximately 60% with the intermediate dose and abolished with the highest dose tested (Fig. 25).

7.4.2. Effect of nifedipine and ω -conotoxin on Ang-II-induced catecholamine secretion

In the control group, the administration of angiotensin II significantly increased the output of adrenal epinephrine and norepinephrine (Fig. 26). The maximum catecholamine response to angiotensin II was observed 1 min following its net infusion and returned to the corresponding control levels by 2 min after the cessation of angiotensin II administration (Fig. 26). In the presence of nifedipine at the highest dose used in the first series, both epinephrine and norepinephrine output significantly increased in response to angiotensin II, although the amplitudes of the responses were considerably attenuated (Fig. 26). In dogs receiving nifedipine followed by ω -conotoxin, the adrenal catecholamine response to angiotensin II still increased significantly and even to a slightly higher extent than that observed in dogs treated with nifedipine alone (Fig. 26).

The adrenal catecholamine response to BAY-K 8644 was completely blocked by the highest dose (50 μ g) of nifedipine (Fig. 25). However, the same dose of nifedipine inhibited only partially the maximum net increase in catecholamine output induced by angiotensin II (Fig. 27). The combined

administration of nifedipine with ω -conotoxin did not bring about a greater suppression of the catecholamine response, being inhibited still partially only by ~55%, as compared to the inhibition (~65%) obtained with nifedipine alone (Fig. 27).

7.5 DISCUSSION

The present study clearly demonstrates that local infusion of BAY-K 8644, a specific L-type Ca^{2+} channel activator, into the left adrenolumbar artery significantly resulted in a significant increase in adrenal catecholamine secretion in anesthetized dogs. This increase in catecholamine secretion, which was highly reproducible upon repeated administration of BAY-K 8644, was blocked by nifedipine in a dose-dependent manner and abolished at the highest dose tested. The local infusion of angiotensin II also significantly increased the secretion of adrenal catecholamines. However, this angiotensin II-induced catecholamine release was only partially inhibited by nifedipine with the dose that completely blocked the catecholamine response to BAY-K 8644. The remaining angiotensin II-induced catecholamine release was not affected by the additional blockade of N-type Ca^{2+} channels with ω -conotoxin.

We have previously shown that adrenal catecholamine secretion in response to splanchnic nerve stimulation was enhanced and inhibited in the presence of BAY-K 8644 and nifedipine, respectively (9). These observations are, however, inconsistent with a similar study reported by others (27), due probably to different doses and stimulation frequencies used in two different laboratories. In those studies, both BAY-K 8644 and nifedipine were given intravenously, so that the potential influence of drug-induced systemic effects on adrenal catecholamine response to splanchnic nerve

stimulation could not be completely ruled out. In the present study, however, local administration of BAY-K 8644 into the left adrenal gland resulted in a significant increase in adrenal catecholamine output, which was specifically blocked by nifedipine in a dose-dependent manner, without any significant systemic effects. These observations, together with our previous study (9), are consistent with the view that the dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channels are present in the adrenal medulla *in vivo* and functionally implicated in the local regulation of adrenal catecholamine secretion.

Under the present experimental conditions, it is plausible that the catecholamine release during the resting control period may be due to a low level of basal tonic input from the splanchnic nerve, because the basal catecholamine output from the gland was significantly attenuated after surgical denervation of the splanchnic nerve in a model similar to that used in the present study (35). Thus, the neurally evoked basal catecholamine release is likely to be affected by both BAY-K 8644 and nifedipine, as they work on the common site of action (13). In the present study, however, BAY-K 8644 enhanced, while nifedipine did not significantly affect the basal catecholamine secretion. This difference may be best accounted for by the distinct gating modes operating within the dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channel (12). In one gating mode (long opening and brief closing mode), the channel is particularly sensitive to BAY-K 8644, which enhances Ca^{2+} inward current by promoting this mode; while nifedipine inhibits the Ca^{2+} current by favouring another distinct gating mode (no opening mode), which seems less likely to occur under conditions of a low level of neural input to the adrenal gland. The latter interpretation is compatible with the finding that nifedipine did not inhibit the nerve stimulation-induced adrenal catecholamine secretion at frequencies of physiological range (1-3 Hz) (17).

In the present study, the local repetitive administration of BAY-K 8644 with an interval of 15 min resulted in significant and highly reproducible increases in the secretion of adrenal catecholamines. With angiotensin II, however, we have recently observed a rapid development of tachyphylaxis in adrenal catecholamine release following its repetitive administration in a similar experimental setup (20). The angiotensin II-induced tachyphylaxis could be explained either by the downregulation of angiotensin II receptors (25) due to the prolonged duration of agonist receptor occupancy (29) or by the diminished affinity of angiotensin II for its receptors (2, 19). On the other hand, the absence of tachyphylaxis with BAY-K 8644 might be accounted for by the rapid dissociation of the drug from its binding site, which is located in a hydrophobic region in the Ca^{2+} channel near the outer surface of the membrane (4, 15).

It is of interest that, in the present study, the maximum catecholamine response to the local administration of BAY-K 8644 was obtained 2 min after the onset of the net drug infusion, i.e. 1 min after the cessation of drug administration, while the response to angiotensin II reached the maximum level 1 min after the onset of the net infusion, i.e. during angiotensin II infusion. The rapid increase in angiotensin II-induced catecholamine secretion may be due, most probably, to the release of Ca^{2+} from the intracellular Ca^{2+} stores, as indicated in bovine adrenal chromaffin cells (26), in addition to the increase in Ca^{2+} influx through dihydropyridine-sensitive voltage-gated Ca^{2+} channels as observed in guinea-pig adrenal chromaffin cells (30). The additional intracellular Ca^{2+} mobilization may thus accelerate the increase of intracellular Ca^{2+} concentration resulting in a rapid exocytotic response, as suggested by a close relationship between intracellular Ca^{2+} concentration and catecholamine release from permeabilized chromaffin cells (1,18). Alternatively, the difference in time reaching the

maximum response may also be due to the different morphological accessibilities for the drugs to their binding sites. The dihydropyridine receptor site is likely to be localized on the inner surface of the Ca^{2+} channel (4) and thus being less accessible to blood-born substances, while the angiotensin II binding site is generally believed to be localized on the outer surface of the cell membrane (28), being more accessible to the drug.

Angiotensin II has been shown to increase Ca^{2+} influx resulting from the opening of membrane Ca^{2+} channels localized on the outer surface of adrenal chromaffin cells (26, 30, 36), and also to increase inositol 1,4,5-trisphosphate, which, in turn, releases stored Ca^{2+} resulting in an increase in intracellular Ca^{2+} concentration in adrenal cells (10, 26). In the present study, adrenal catecholamine response to angiotensin II was blocked by approximately 65 % in the presence of nifedipine with the dose that completely inhibited the BAY-K 8644-induced catecholamine response. Because BAY-K 8644 and nifedipine are known to be a specific L-type Ca^{2+} channel activator and blocker in the adrenal chromaffin cells, respectively (22), the present observation indicates that angiotensin II-induced adrenal catecholamine release resulted, at least in part, from the activation of dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channels, in agreement with a recent study in the isolated perfused guinea-pig adrenal gland (30).

The maximum dose of nifedipine used in the present study was sufficient to abolish the BAY-K 8644-induced catecholamine response. Therefore, the remaining angiotensin II-induced response observed in the presence of nifedipine resulted from a mechanism other than Ca^{2+} influx through dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channels. Because nifedipine has been shown to have no effect

on basal or angiotensin II-induced inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation (3), which is specifically mediated by AT₁ receptor stimulation (10), it is plausible that another mechanism responsible for the remaining catecholamine response may be a rapid intracellular Ca²⁺ mobilization from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores, although the functional implication of inositol 1,4,5-trisphosphate still remains controversial (3, 5, 26, 30).

Alternatively, an increase in Ca²⁺ influx through a receptor-operated Ca²⁺ channels (7), which might be insensitive to nifedipine, cannot completely be ruled out in the present study. In this context, it has been shown that, in bovine chromaffin cells, angiotensin II-induced increases in Ca²⁺ influx and catecholamine release were both blocked by ω -conotoxin, a selective N-type Ca²⁺ channel blocker (21). Furthermore, voltage-dependent Ca²⁺ current has also been reported to be blocked by ω -conotoxin in bovine adrenal gland (11). More recently, N-type Ca²⁺ channels have been localized on the plasma membrane in bovine chromaffin cells (8). In addition, certain *in vivo* studies have shown that, in anesthetized dogs, local administration of exogenous acetylcholine resulted in an increase in adrenal catecholamine release which was blocked either by ω -conotoxin or nifedipine (17). These observations are compatible with the view that both L- and N-type Ca²⁺ channels concurrently contribute to the stimulation-secretion coupling process with similar efficiency in chromaffin cells (16). In the present study, however, the simultaneous blockade of L- and N-type Ca²⁺ channels by nifedipine and ω -conotoxin did not further suppress the catecholamine response, when compared to the inhibition obtained with nifedipine alone. This observation suggests that the remaining catecholamine response to angiotensin II in the presence of nifedipine is not related to the potential activation of N-type Ca²⁺ channels. However, the failure of ω -conotoxin to inhibit angiotensin II-

induced catecholamine release may be due to the dose used in the present study, which might be insufficient to fully block the N-type Ca^{2+} channels. This is, however, less likely, because the total quantity of the reported effective dose of ω -conotoxin in a similar dog model was 6 μg (17), whereas it was 25 μg in the present experiment. Yet, the infusion of ω -conotoxin was only for 1 min and it was given 5 min prior to angiotensin II in the present study. Therefore, this might result in a loss of biological action of ω -conotoxin by the time of angiotensin II administration. Nevertheless, the functional implication of N-type Ca^{2+} channels in postsynaptic effector cells in the adrenal gland still remains debatable, as either pre- or postsynaptically induced catecholamine release is not consistently blocked by ω -conotoxin (14, 24).

In conclusion, the present study demonstrates the functional existence of dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channels in the dog adrenal gland under *in vivo* conditions. The study also indicates that angiotensin II-induced adrenal catecholamine secretion is partially mediated by the activation of L-type Ca^{2+} channels in the anesthetized dog model. However, ω -conotoxin-sensitive N-type Ca^{2+} channels are unlikely to be operative in angiotensin II-induced adrenal catecholamine release *in vivo*.

7.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, Canadian Diabetes Association, and Heart and Stroke Foundation of Canada (Québec). The author thanks Ms. Sanae Yamaguchi and Mr. Richard Lalande for skilled and devoted technical assistance. During this study, Daniel Martineau was a holder of a studentship granted by the Groupe de recherche sur le système nerveux autonome (Université de Montréal), and is now a holder of the Studentship from the Société Québécoise d'Hypertension Artérielle.

7.7 REFERENCES

- 1 **Augustine, G. J., and E. Neher.** Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (London)* 450: 247-271, 1992.
- 2 **Boulay, G., L. Chretien, D. E. Richard, and G. Guillemette.** Short-term desensitization of the angiotensin II receptor of bovine adrenal glomerulosa cells correspond to a shift from a high to a low affinity state. *Endocr.* 135 (5): 2130-2136, 1994.
- 3 **Bunn, S. J., and P. D. Marley.** Effects of angiotensin II on cultured, bovine adrenal medullary cells. *Neuropeptides.* 13: 121-132, 1989.
- 4 **Catterall, W.A., and J. Striessnig.** Receptor sites for Ca²⁺ channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:256-262, 1992.
- 5 **Cheek, T. R., A. Morgan, A. J. O'Sullivan, R. B. Moreton, M. J. Berridge, and R. D. Burgoyne.** Spatial localization of agonist-induced Ca²⁺ entry in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Cell. Science.* 105: 913-921, 1993.
- 6 **Falkenhahn, M., P. Gohlke, M. Paul, M. Stoll, and T. Unger.** The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: New therapeutic aspects. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 24 Suppl 2: S6-S13, 1994.
- 7 **Fasolato, C., B. Innocenti, and T. Pozzan.** Receptor-activated Ca²⁺ influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 77-83, 1994.
- 8 **Fernandez, J. M., R. Granja, V. Izaguirre, C. Gonzalez-Garcia, V. Cena.** ω -Conotoxin GVIA blocks nicotine-induced catecholamine secretion by blocking the nicotinic receptor-activated inward currents in bovine chromaffin cells. *Neurosc. Lett.* 191: 59-62, 1995.

- 9 **Gaspo, R., N. Yamaguchi, and J. de Champlain.** Effects of nifedipine and BAY K 8644 on stimulation-induced adrenal catecholamine secretion in the dog. *Am. J. physiol.* 265: R28-R34, 1993.
- 10 **Hajnoczky, G., G. Csordas, A. Bago, A. T. Chiu, and A. Spatt.** Angiotensin II exerts its effect on aldosterone production and potassium permeability through receptor subtype AT₁ in rat adrenal glomerulosa cells. *Biochem. Pharmacol.* 43 (5):1009-1012, 1992.
- 11 **Hans, M., P. Illes, and K. Takeda.** The blocking effects of ω -conotoxin on Ca current in bovine chromaffin cells. *Neurosc. Lett.* 114: 63-68, 1990.
- 12 **Hess, P., J. B. Lansman, and R. W. Tsien.** Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature.* 311: 538-544, 1984.
- 13 **Janis, R., A. J. G. Sarmiento, S. C. Maurer, G. T. Bolger, and D. J. Triggle.** Characteristics of the binding of [3H] nitrendipine to rabbit ventricular membranes: modification by other Ca⁺⁺ channel antagonists and by the Ca⁺⁺ channel agonist Bay K 8644. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231(1): 8-15, 1984.
- 14 **Jimenez, R. R., M. G. Lopez, C. Sancho, R. Maroto, and A. G. Garcia.** A component of the catecholamine secretory response in the bovine adrenal gland is resistant to dihydropyridines and ω -conotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 1278, 1993.
- 15 **Kass, R. S., and J. P. Arena.** Influence of pH on calcium channel block by amlodipine, a charged dihydropyridine compound. *J. Gen. Physiol.* 93:1109-1127, 1989.
- 16 **Kim, S. J. W. Lim, and J. Kim.** Contribution of L- and N-type calcium currents to exocytosis in rat adrenal medullary chromaffin cells. *Brain Res.* 675: 289-296, 1995.

- 17 **Kimura, T., A. Takeuchi, and S. Satoh.** Inhibition by ω -conotoxin GVIA of adrenal catecholamine release in response to endogenous and exogenous acetylcholine. *Eur. J. Pharmacol.* 264: 169-175, 1994.
- 18 **Knight, D. E., and P. F. Baker.** Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J. Membrane. Biol.* 68:107-140, 1982.
- 19 **Kuttan, S. C., and M. K. Sim.** Angiotensin II induced tachyphylaxis in aortas of normo- and hypertensive rats: changes in receptor affinity. *Eur. J. Pharmacol.* 232: 173-180, 1993.
- 20 **Martineau, D., R. Briand, and N. Yamaguchi.** Inhibition by BMS 186295, a selective nonpeptide AT₁ antagonist, of adrenal catecholamine release induced by angiotensin II in the dog in vivo. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 459-464, 1994.
- 21 **McMillian, M. K., R. K. Tuominen, P. M. Hudson, H. H. Suh, and J. S. Hong.** Angiotensin II receptors are coupled to ω -conotoxin-sensitive calcium influx in bovine adrenal medullary chromaffin cells. *J. Neurochem.* 58 (4): 1285-1291, 1992.
- 22 **Montiel, C., A. R. Artajelo, and A. G. Garcia.** Effects of the novel dihydropyridine bay K 8644 on adrenomedullary catecholamine release evoked by calcium reintroduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 851-857, 1984
- 23 **Oliver, J. A., and R. R. Sciacca.** Local generation of angiotensin II as a mechanism of regulation of peripheral vascular tone in the rat. *J. Clin. Invest.* 74: 1247-1251, 1984.
- 24 **Owen, P. J., D. B. Marriott, and M. R. Boarder.** Evidence for a dihydropyridine-sensitive and conotoxin-insensitive release of noradrenaline and uptake of calcium in adrenal chromaffin cells. *Br. J. Physiol.* 97: 133, 1989.

- 25 **Penhoat, A., R. Ouali, C. Jaillard, D. Langlois, M. Begeot, and J. Saez.** Characterization and regulation of angiotensin and corticotropin receptors on cultured bovine adrenal cells. *Endocr. Res.* 17 (1 and 2):1-18, 1991.
- 26 **Stauderman, K. A., and R. M. Pruss.** Dissociation of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} mobilization responses to angiotensin II in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 264: 18349-18355, 1989.
- 27 **Takeuchi, A., T. Kimura, and S. Satoh.** Effects of nifedipine and BAY-K- 8644 on the release of catecholamines from the dog adrenal gland in response to splanchnic nerve stimulation. *Clin. Exp. Physiol. Pharmacol.* 20:35-39, 1993.
- 28 **Timmermans, P. B. M. W. M., P. C. Wong, A. T. Chiu, W. F. Herblin, P. Benfield, D. J. Carini, R. J. Lee, R. R. Wexler, J. A. M. Saye, and R.D. Smith.** Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45:205-251, 1993.
- 29 **Vicaut, E., G. Montalescot, X. Hou, O. Stucker, and B. Teisseire.** Arteriolar vasoconstriction and tachyphylaxis with intraarteriolar angiotensin II. *Microvasc. Res.* 37: 28-41, 1989.
- 30 **Warashina, A., Y. Habara, K. Yamaguchi, and T. Kanno.** $[Ca^{2+}]_i$ changes arising in individual guinea-pig chromaffin cells in response to various receptor agonists and their relation to catecholamine secretion in the perfused adrenal gland. *Biomed. Res.* 15:271-280, 1994.
- 31 **Wong, P. C., S. D. Hart, A. Zaspei, A. T. Chiu, R. D. Smith, and P. B. M. W. M. Timmermans.** Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific

- ligands: DuP 753 (AII-1) and PD 123177 (AII-2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 584-592, 1990.
- 32 **Yamaguchi, N.** Implication of L-type Ca^{2+} channels in noncholinergic adrenal catecholamine secretion by endothelin-1 in vivo. *Am. J. Physiol.* 269 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 38): R287-R293, 1995.
- 33 **Yamaguchi, N.** In vivo evidence for adrenal catecholamine release mediated by nonnicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. *Am. J. Physiol.* 265 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 34): R766-R771, 1993.
- 34 **Yamaguchi, N.** Inhibition by nifedipine of endothelin-induced adrenal catecholamine secretion in anesthetized dogs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 301-305, 1993.
- 35 **Yamaguchi, N., L. Lamarche, and R. Briand.** Simultaneous evaluation of medullary secretory functions of normal and acutely denervated adrenals. *Am. J. Physiol.* 260 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 29): R306-R313, 1991.
- 36 **Zimlichman, R., D. S. Goldstein, S. Zimlichman, R. Stull, and H. R. Keiser.** Angiotensin II increases cytosolic calcium and stimulates catecholamine release in cultured bovine adrenomedullary cells. *Cell Calcium.* 8: 315-325, 1987.

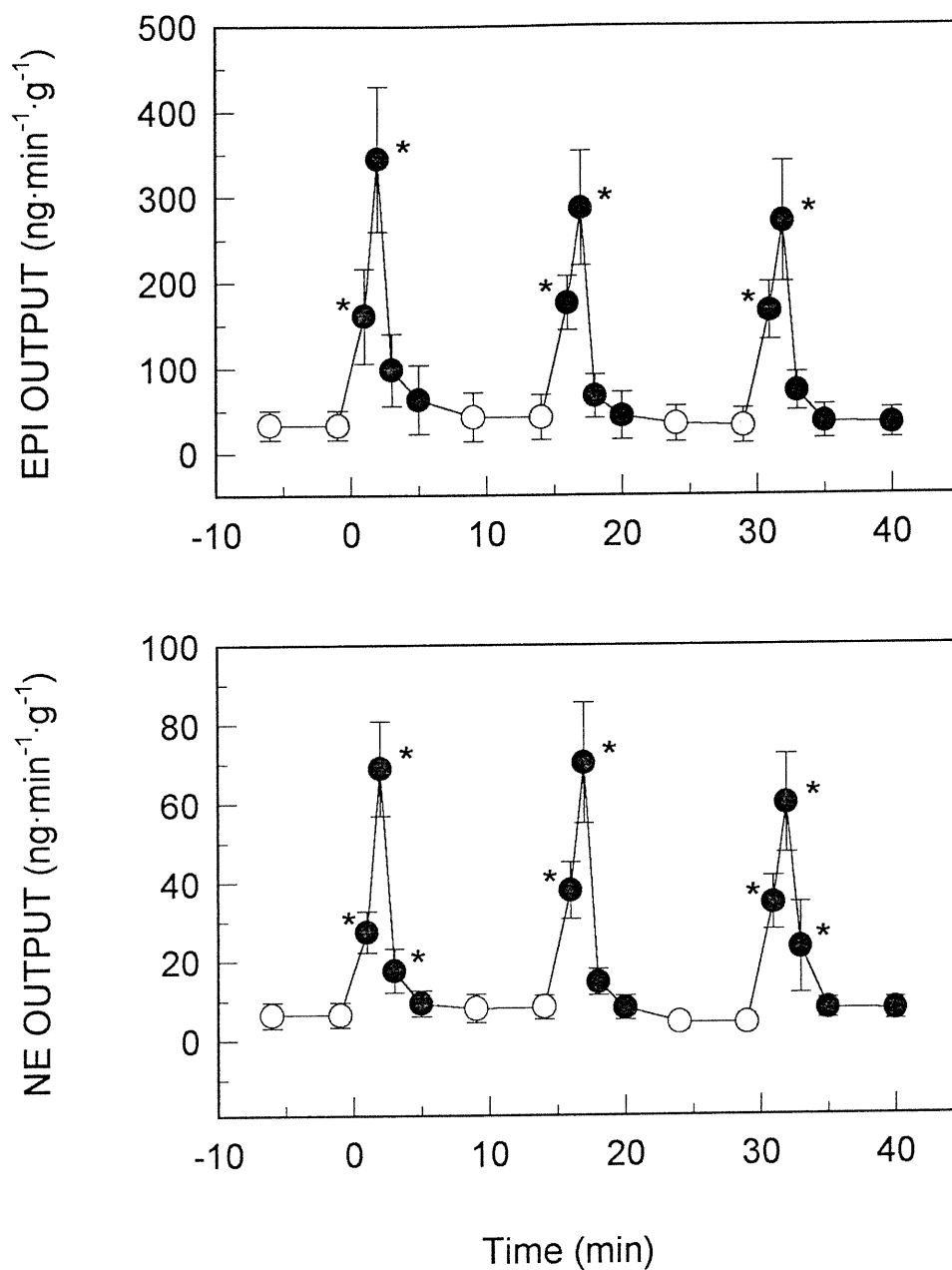


Fig. 24. Effects on epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of repetitive administrations of BAY-K 8644 ($0.5\mu\text{g}$) locally infused into the left adrenolumbar artery with an interval of 15 min. The vehicle was administered at -5, 10, and 25 min, and BAY-K 8644 at 0, 15, and 30 min. $n = 8$. *, $P < 0.05$ versus the corresponding control value (partially filled circle) observed immediately before each administration of BAY-K 8644.

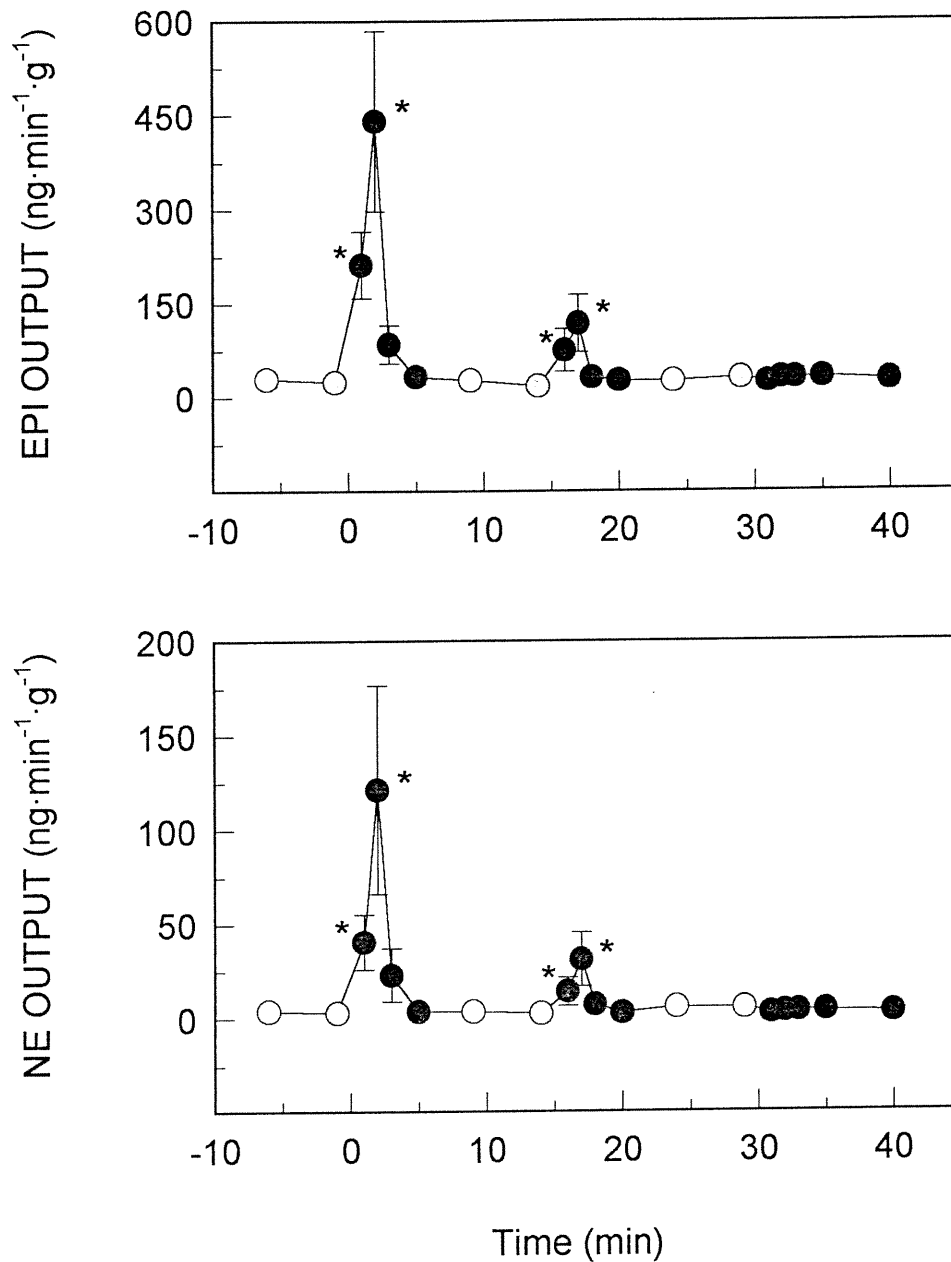


Fig. 25. Effects of various doses of nifedipine on the increases in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output induced by repetitive administrations of BAY-K 8644 (0.5 μg) into the left adrenolumbar artery. 0.5, 5.0, and 50 μg of nifedipine was administered at -5, 10, and 25, respectively, and BAY-K 8644 at 0, 15, and 30 min. $n = 8$. *, $P < 0.05$ versus the corresponding control value (partially filled circle) observed immediately before each administration of BAY-K 8644.

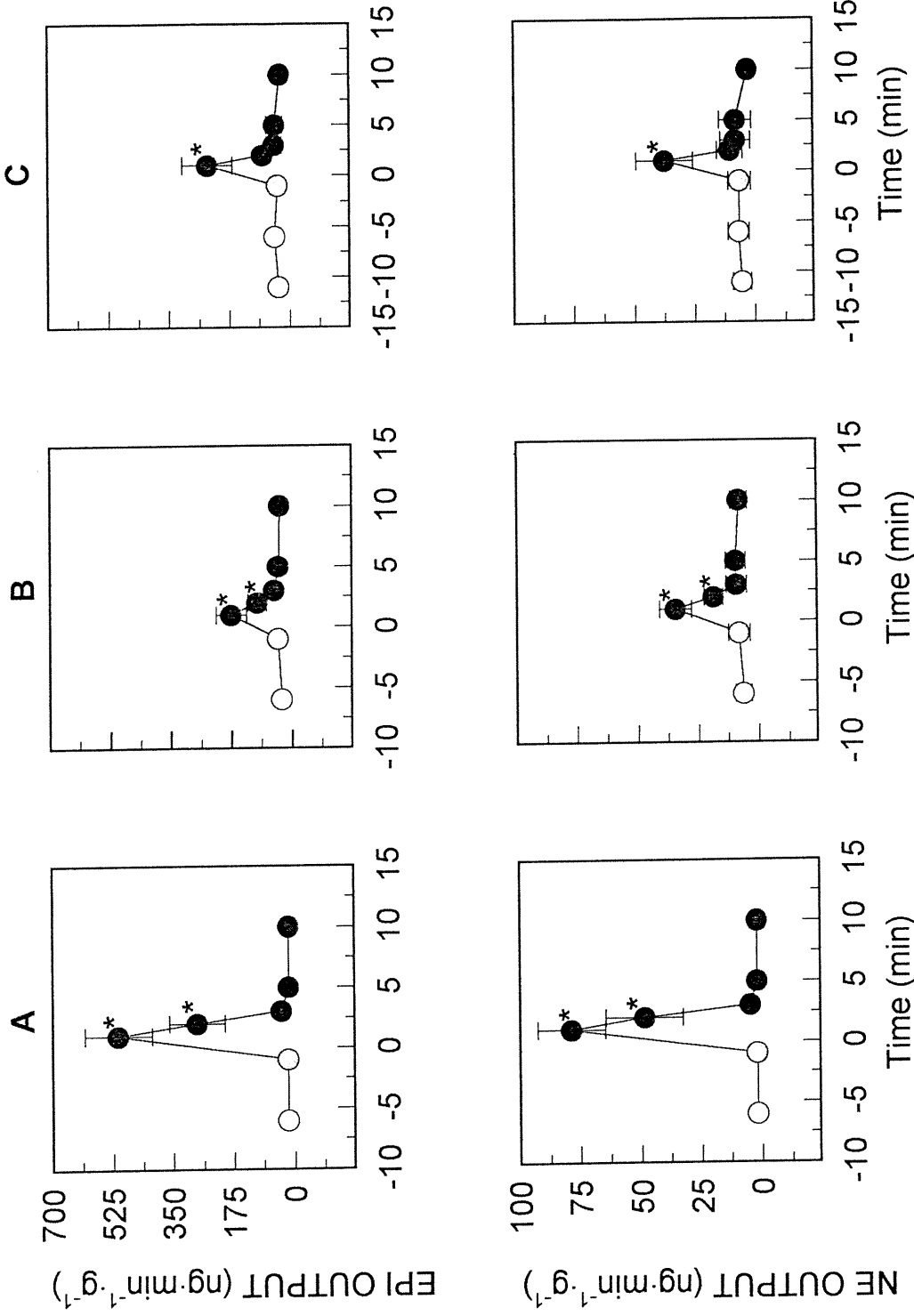


Fig. 26. Effects on adrenal epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output of angiotensin II (0.05 μg) locally administered into the left adrenolumbar artery in dogs receiving the vehicle (n = 8, column A), nifedipine (50 μg, n = 8, column B), and nifedipine combined with ω-conotoxin (25 μg, n = 5, column C). In columns A and B, the vehicle or nifedipine was administered at -5 min. In column C, nifedipine and ω-conotoxin was administered at -10 and -5 min, respectively. In all columns, angiotensin II was administered at 0 min. *, $P < 0.05$ versus the corresponding control value (partially filled circle) observed immediately before the administration of angiotensin II.

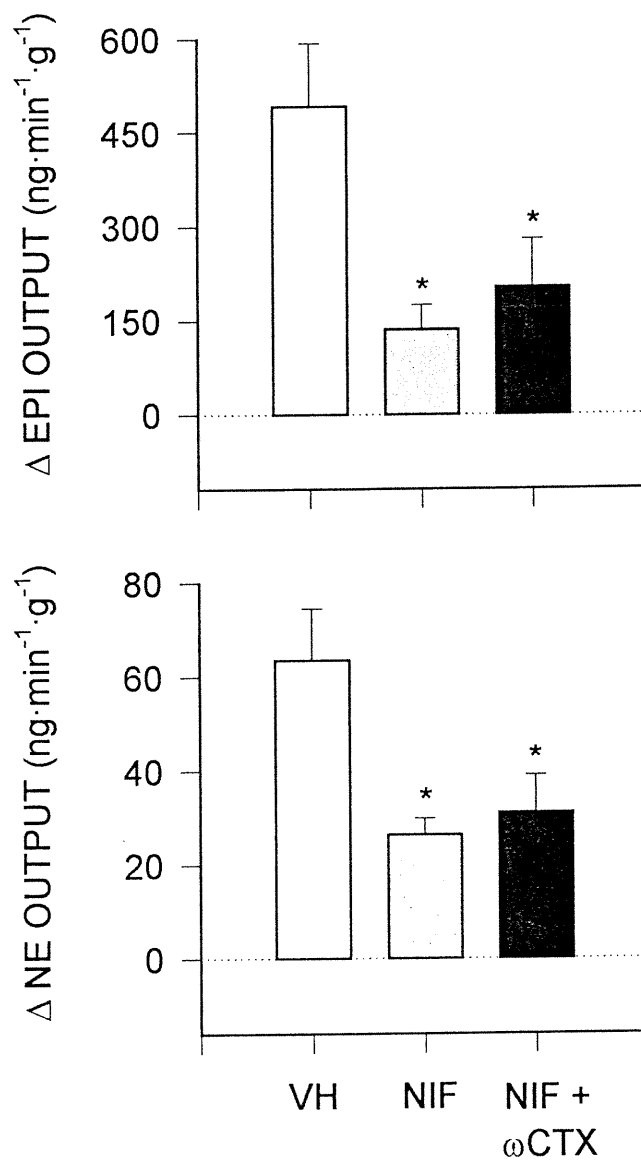


Fig. 27. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output induced by angiotensin II in the presence of vehicle (VH), nifedipine (NIF), and nifedipine combined with ω -conotoxin (NIF + ω CTX). The original data are shown in Fig. 3. *, $P < 0.05$ versus the corresponding vehicle control.

QUATRIÈME PARTIE

DISCUSSION GÉNÉRALE

CHAPITRE 8

**MÉCANISMES RÉGULATEURS DE LA SÉCRÉTION DES
CATÉCHOLAMINES DANS LA GLANDE SURRÉNALE:
RÔLE DE L'ANG II**

Les résultats obtenus au cours de ces travaux suggèrent que l'activation du SRA stimule la sécrétion des catécholamines par la médullo-surrénale via les récepteurs AT_1 et AT_2 postsynaptiques. En effet, aucune stimulation nerveuse n'a été apportée au nerf splanchnique et nous avons mimé l'activation du SRA en administrant de l'ANG II directement dans la glande surrénale via l'artère lombosurrénale. Ainsi, l'ANG II pouvait agir directement sur les cellules chromaffines entraînant la libération des catécholamines par les médullo-surrénales.

Afin de mieux comprendre l'importance relative des récepteurs AT_1 et AT_2 dans la libération des catécholamines, nous avons employé différents agents pharmacologiques connus. Dans la première partie de nos travaux, nous avons utilisé un antagoniste sélectif du récepteur AT_1 , soit le BMS 186295, pour étudier le rôle de ce récepteur dans la libération des catécholamines par la glande surrénale. Dans la deuxième partie, nous avons étudié le rôle du récepteur AT_2 en utilisant deux antagonistes spécifiques, soit le PD 123319 et le CGP 42112. Enfin, dans la dernière partie de nos travaux, nous avons tenté de mieux comprendre l'implication des canaux Ca^{2+} de type-L, en utilisant le BAY K 8644 comme agoniste et la nifédipine comme agent antagoniste de ce canal Ca^{2+} .

Au cours des dernières années, l'industrie pharmaceutique a développé plusieurs antagonistes sélectifs des récepteurs AT_1 . C'est ainsi que ces récepteurs ont été la cible de plusieurs groupes de recherche. Plusieurs études réalisées sur la glande surrénale ont démontré que l'ANG II accroît la libération des catécholamines via la stimulation des récepteurs AT_1 (Belloni et al. 1998; Hano et al. 1994; Timmermans et al. 1993). Cependant, il existe peu d'information quant à l'implication des récepteurs AT_2 dans la sécrétion des catécholamines par la glande surrénale (de Gasparo et Whitebread 1995,

Hano et al. 1994). Une des difficultés rencontrée est attribuable aux propriétés pharmacologiques des antagonistes des récepteurs AT₂ présentement disponibles. Par exemple, l'activité pharmacologique du CGP42112, un ligand sélectif pour le récepteur AT₂, varie d'une espèce et d'un tissu à l'autre. Il agit comme un agoniste sur des échantillons de tissus provenant de médullo-surrénales de rats (Belloni et al. 1998) et comme un antagoniste dans la glande surrénale chez le canard (Schäfer et al. 1996). Dans notre modèle animal, nous sommes convaincus que le CGP 42112 se comporte comme un antagoniste, puisque ce dernier, administré à des doses croissantes, n'a d'aucune façon augmenté la libération des catécholamines.

Dans notre modèle expérimental, nous avons observé que l'administration de BMS 186295 bloque environ 80% de la libération des catécholamines induite par l'administration d'ANG II, suggérant une contribution importante des récepteurs AT₁. Cette première observation nous porte à croire que la réponse résiduelle est attribuable à la stimulation des récepteurs AT₂. En effet, nous avons vu qu'en présence d'un antagoniste des récepteurs AT₂ (soit le PD 123319 ou le CGP 42112), la sécrétion des catécholamines induite par l'ANG II est inhibée approximativement à 70%. Ces résultats supposent également une participation importante des récepteurs AT₂ dans la libération des catécholamines par la glande surrénale. En accord avec ces résultats, de récentes études réalisées *in vitro* ont également montré que la libération des catécholamines induite par l'administration d'ANG II est aussi contrôlée par la stimulation des récepteurs AT₂ localisés à la surface des cellules chromaffines (Belloni et al. 1998; Mazzocchi et al. 1998). Par conséquent, les récepteurs AT₂ semblent aussi importants que les récepteurs AT₁ dans la sécrétion des catécholamines induite par l'administration d'ANG II.

Dès lors, nous avons pensé que si l'on bloquait à la fois le récepteur AT₁ et le récepteur AT₂, la sécrétion des catécholamines serait complètement abolie. Toutefois, nos résultats ont indiqué que la combinaison du BMS 186295 et du PD 123319 n'a pas davantage inhibé cette sécrétion lorsque comparé aux réponses obtenues avec le BMS 186295 ou le PD 123319 administré en monothérapie (Fig. 28: données non publiées). Par conséquent, cette dernière observation nous incite à croire qu'il existe au minimum une autre voie d'activation qui serait stimulée par l'ANG II.

C'est alors que nous avons tenté d'évaluer le rôle du canal Ca²⁺ de type-L dans la réponse des catécholamines. Certains auteurs ont montré à partir de modèles *in vitro*, que ce canal Ca²⁺ (sensible aux dihydropyridines) est opéré par le récepteur AT₁ et est impliqué dans le processus de libération des catécholamines induit par l'ANG II (Warashina et al. 1994; Cheek et al. 1993). Les travaux de Peach et Dostal (1990) indiquent que l'ANG II peut agir directement sur le canal Ca²⁺ afin de permettre l'entrée de Ca²⁺ à l'intérieur de la cellule chromaffine. Dans notre modèle, nous avons observé que la libération des catécholamines induite par l'ANG II a été inhibée à 65% par l'administration de nifédipine seule (un bloqueur du canal Ca²⁺ de type-L). Cette observation confirme donc la participation du canal Ca²⁺ de type-L dans la sécrétion des catécholamines médullaires suite à l'administration d'ANG II *in vivo*. Il est intéressant de mentionner ici que le canal Ca²⁺ de type-N ne semble pas contribuer à cette réponse résiduelle puisque la combinaison de la nifédipine et de la ω -conotoxine (un bloqueur du canal Ca²⁺ de type-N) n'a pas inhibé davantage la sécrétion des catécholamines comparé à l'inhibition obtenue avec la nifédipine seule. Ainsi, la réponse résiduelle que l'on observe peut-être attribuable à la stimulation des récepteurs à l'ANG II.

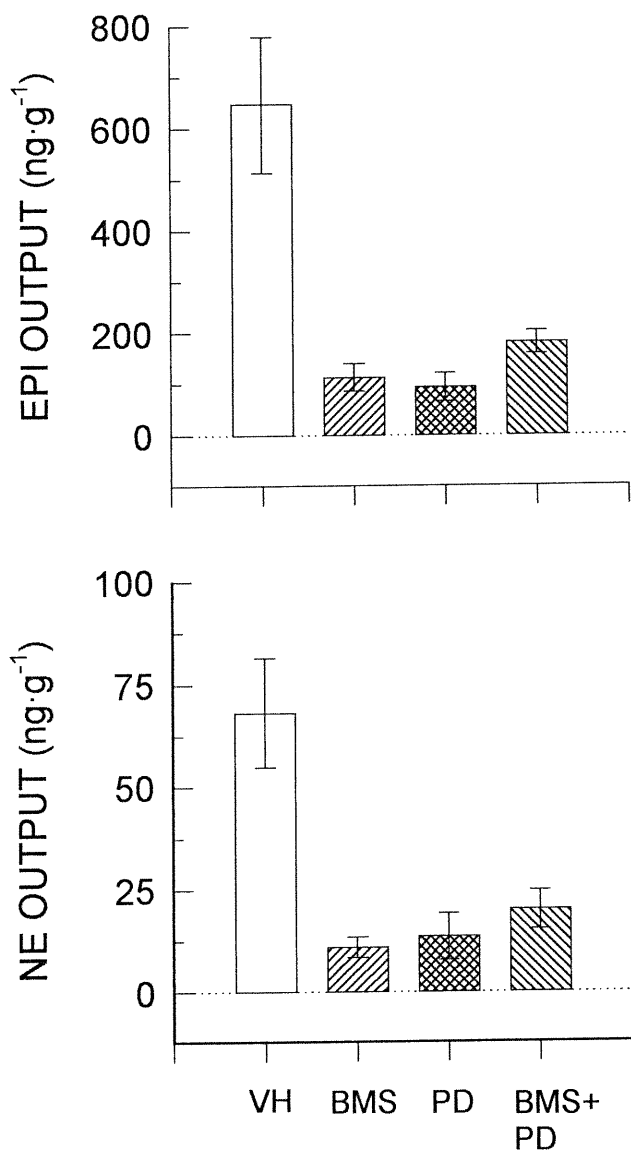


Fig. 28. La sécrétion d'épinéphrine (EPI) et de la norépinéphrine (NE) est induite par l'ANG II en présence du véhicule (VH), du BMS 186295 (BMS: 23 μ M, n = 6), du PD 123319 (PD: 23 μ M, n = 6), et de la combinaison du BMS et du PD (BMS + PD: 23 μ M, n = 6). Les données sont exprimé en quantité nette (ng·g⁻¹, obtenu par le calcul de l'aire sous la courbe lors de la libération d'épinéphrine et de la norépinéphrine durant les 3 premières min après l'administration d'ANG II).

Nous avons donc vérifié cette hypothèse en administrant de la nifédipine en présence du BMS 186295 et du PD 123319. Nos résultats ont montré que la nifédipine combinée à ces deux antagonistes (BMS+PD+NIF), diminuent davantage la sécrétion des catécholamines lorsque comparée à celle obtenue avec la combinaison BMS+PD (Fig. 29: données non publiées). Cette dernière observation confirme les travaux de Peach et Dostal et démontre pour la première fois, dans un modèle *in vivo*, l'effet direct de l'ANG II sur le canal Ca^{2+} de type-L et de son effet sur la libération des catécholamines par la médullo-surrénale. Par conséquent, les récepteurs AT_1 et AT_2 ainsi que les canaux Ca^{2+} de type-L participent à la sécrétion des catécholamines contrôlée par l'ANG II.

À la lumière de ces résultats, nous croyons que la stimulation simultanée des récepteurs AT_1 et AT_2 soit nécessaire pour permettre la relâche des catécholamines par la glande surrénale chez le chien anesthésié. Nos observations, nous amènent à conclure que la non participation de l'un ou l'autre de ces récepteurs empêche toute libération de catécholamines par la médullo-surrénale. À ce sujet, nous proposons que la cellule chromaffine doit recevoir un signal provenant à la fois des récepteurs AT_1 et des récepteurs AT_2 (figure 30). Lorsque le récepteur AT_1 ou AT_2 est bloqué, les mécanismes impliqués dans la libération des catécholamines sont inactifs car ils ne reçoivent que le signal venant de l'un ou l'autre de ces récepteurs, ce qui a pour conséquence d'empêcher la libération des catécholamines. De plus, lorsque les deux récepteurs sont bloqués, les mécanismes impliqués sont toujours inactifs et ne permettent pas la libération des catécholamines. La réponse résiduelle obtenue suite à l'administration d'ANG II, en présence du blocage simultané du récepteur AT_1 et du récepteur AT_2 , suggère un effet direct de l'ANG II sur le canal Ca^{2+} de type-L.

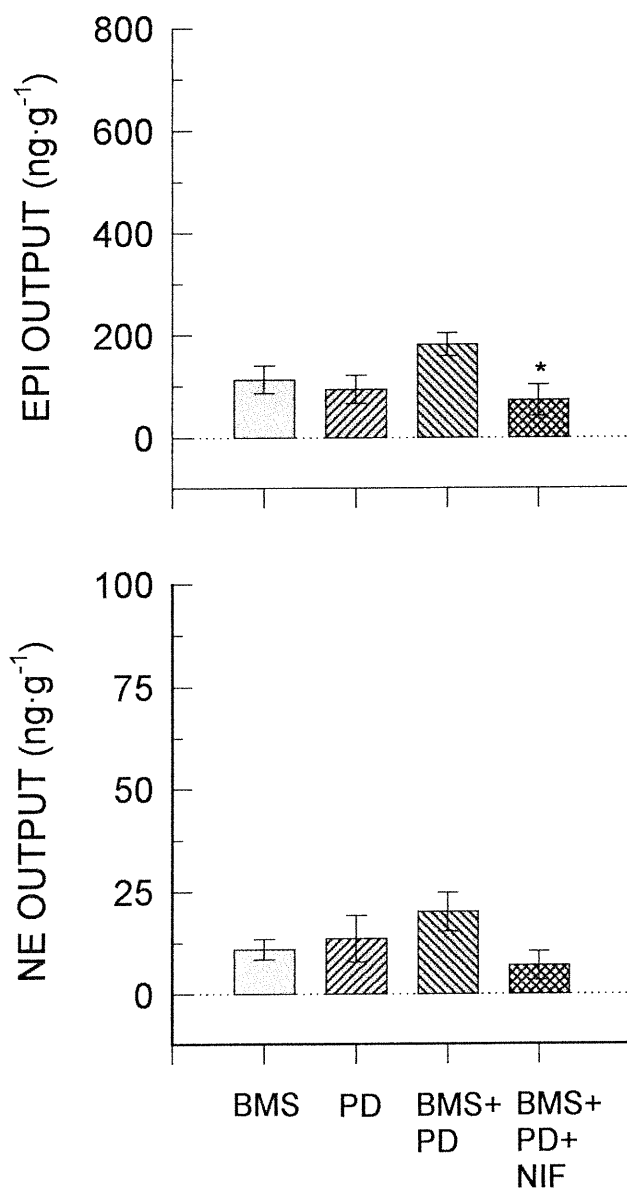


Fig. 29. La sécrétion d'épinéphrine (EPI) et de la norépinéphrine (NE) induite par l'ANG II est inhibé par le BMS 186295 (BMS: 23 μ M, n = 6), le PD 123319 (PD: 23 μ M, n = 6), le BMS et le PD combiné (BMS + PD: 23 μ M, n = 6) et la nifédipine (NIF: 289 μ M) combiné à BMS et au PD (BMS + PD + NIF, n = 6). Les données sont exprimé en quantité nette (ng·g⁻¹, obtenu par le calcul de l'aire sous la courbe lors de la libération d'épinéphrine et de la norépinéphrine durant les 3 min après l'administration d'ANG II. *, p < 0.05 versus le groupe BMS + PD.

CINQUIÈME PARTIE

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET
RÉFÉRENCES

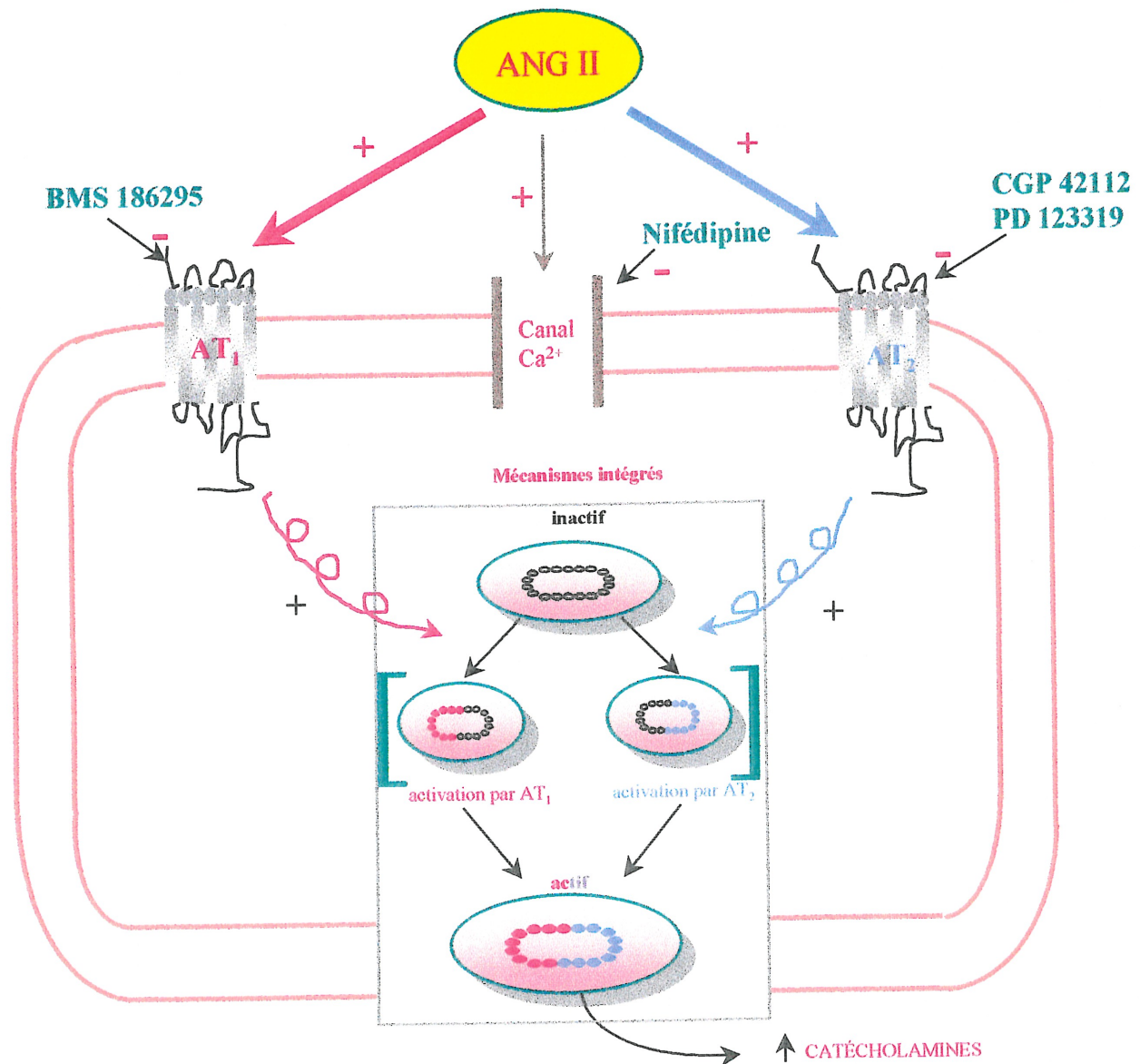


Fig. 30. Résumé des trois mécanismes régulateurs de l'ANG II dans la réponse médullaire. La sécrétion des catécholamines est assurée par l'administration d'ANG II et se fait via la stimulation des récepteurs AT₁ et AT₂ ainsi que le canal Ca²⁺ de type-L. Dans la cellule chromaffine du chien, la stimulation de ces deux récepteurs est nécessaire pour activer complètement les mécanismes impliqués dans la régulation de la relâche des catécholamines. Ainsi, lorsque la cellule ne reçoit qu'un seul signal venant soit du récepteur AT₁, soit du récepteur AT₂, le facteur ne peut donc s'activer et par conséquent empêche la libération des catécholamines.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus au cours de ces travaux nous ont permis de mieux comprendre le rôle des récepteurs AT₁ et AT₂ et l'influence des canaux Ca²⁺ de type-L sur la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales. Nous avons démontré que l'administration d'ANG II dans la glande surrénale augmente la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales. Cette sécrétion peut être fortement inhibée par le BMS 186295, suggérant que le SRA contribue à la sécrétion des catécholamines médullaires via le récepteur AT₁.

Nous avons pu confirmer l'hypothèse que les récepteurs AT₂ sont également impliqués dans la sécrétion des catécholamines contrôlée par l'ANG II. En effet, nous avons démontré pour la première fois *in vivo* que l'administration d'un antagoniste des récepteurs AT₂ diminue aussi la sécrétion des catécholamines par la glande surrénale chez le chien anesthésié.

Nos résultats nous portent à croire que les mécanismes impliqués dans la cellule chromaffine ont besoin à la fois des signaux provenant des deux récepteurs pour leur activation totale. Cette activation mène à la sécrétion des catécholamines par les médullo-surrénales en réponse à l'administration d'ANG II chez le chien anesthésié. Les canaux Ca²⁺ de type-L sont également impliqués dans cette sécrétion mais à un degré moindre.

RÉFÉRENCES

Aguilera, G. 1992. Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 90: 53-60.

Ahlquist, R.P. 1948. A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153: 586-600.

Ardaillou, R. 1999. Angiotensin II receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: S30-S39.

Artalejo, C.R., M.E. Adams, and A.P. Fox. 1994. Three types of Ca^{2+} channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367: 72-76.

Augustine, G.J., and E. Neher. 1992. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (London)* 450: 247-271.

Axelrod, J. 1966. Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines. *Pharmacol. Rev.* 18: 95-113.

Balla, T., A. J. Baukal, S. Eng, and K. J. Catt. 1991. Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol. Pharmacol.* 40: 401-406.

Baux, G., and P. Fossier. 1992. La libération d'acétylcholine et sa régulation. *Arc. Inter. Physiol. Biochem. Biophys.* 100: A3-A5.

Bedecs, K., N. Elbaz, M. Sutren, M. Masson, C. Susini, A.D. Strosberg, and C. Nahmias. 1997. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *J. Biochem.* 325: 449-454.

Belloni, A. S., P.G. Andreis, V. Macchi, G. Gottardo, L.K. Malendowicz, and G.G. Nussdorfer. 1998. Distribution and functional significance of angiotensin II AT_1 - and AT_2 -receptor subtypes in

the rat adrenal gland. *Endocrine Res.* 24: 1-15.

Bergsma, D.J., C. Ellis, C. Kumar, P. Nuthu-Langanti, H. Kersten, N. Elshourbagy, E. Griffin, J.M. Stadel, and N. Aiyar. 1992. Cloning and characterization of a human angiotensin type-1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 989-995.

Berk, B.C., Vekshtein, V., Gordon, H.M., and Tsuda, T. 1989. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13: 305-314.

Bernet, F., J. Bernard, C. Lohorie, V. Montel, E. Maubert, and J. P. Dupouy. 1994. Neuropeptide Y (NPY)- and vasoactive intestinal peptide (VIP)-induced aldosterone secretion by rat capsule/glomerular zone could be mediated by catecholamines via β_1 -adrenergic receptors. *Neurosc. Lett.* 166: 109-112.

Bernier, S.G., and G. Guillemette. 1996. L'angiotensine IV: une nouvelle hormone du système rénine-angiotensine. *Médecine/Sciences.* 12: 609-613.

Bickerton, R.K. and J.P. Buckley. 1961. Evidence for a central mechanism in angiotensin-induced hypertension. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 106: 834-836.

Bloch, R. 1992. Parasympathomimétique. Dans: Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. M. Schorderet (ed.). Frison-Roche, Genève. pp 70-81.

Bock, K.D. and F. Gross. 1961. Renin and angiotensin tachyphylaxis. *Circ. Res.* 9: 1044-1050.

Boonyaviroj, P., and Y. Gutman. 1979. α - and β -adrenoceptors and PGE₂ in the modulation of catecholamine secretion from bovine adrenal medulla in vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 716-717.

Bornstein, S. R., and M. Ehrhart-Bornstein. 1992. Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells. *Endocr.* 131 (6): 3126-3128.

Boulay, G., L. Chretien, D. E. Richard, and G. Guillemette. 1994. Short-term desensitization of the angiotensin II receptor of bovine adrenal glomerulosa cells correspond to a shift from a high to a low affinity state. *Endocrinology* 135 (5): 2130-2136.

Bottari, S.P., M. De Gasparo, U.M. Steckellings, and N.R. Levens. 1993. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Frontiers. Neuroendocrin* 14 (2): 123-171.

Bottari, S.P., I.N. King, Y. Bogdal, S. Reichlin, I. Dahlstroem, N. Lydon, and M. deGasparo. 1992. The angiotensin II AT₂ receptor stimulates phosphotyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commmun.* 183: 206-211.

Braley, L.M., A. Menachery, and G.H. Williams. 1981. Angiotensin II's role in mediating angiotensin I- and tetradecapeptide-induced steroidogenesis by rat glomerulosa cells. *Endocrinol.* 109: 960-965.

Brasch, H., L. Sieroslowski, and P. Dominiak. 1993. Angiotensin II increases norepinephrine release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors. *Hypertension.* 22 (5): 699-704.

Braun-Menéndez, E., E. Fasciolo, J.C. Leloir, and J.M. Munoz. 1940. The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* 98: 283-298.

Bravo, E. L., M. C. Khosla, and F.M. Bumpus. 1975. Vascular and adrenocortical responses to a specific antagonist of angiotensin II. *Am. J. physiol.* 228 (1): 110-114.

Brechler, V., P.W. Jones, N.R. Levens, M. De Gasparo, and S.P. Bottari. 1993. Agonistic and antagonistic properties of angiotensin analogs at the AT₂ receptor in PC12W cells. *Reg. Pept.* 44: 207-213.

Bredt, D.S., P.M. Hwang, and S.H. Snyder. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347: 768-770.

Breidert, M., S.R. Bornstein, M. Ehrhart-Bornstein, W.A. Scherbaum, and J. J. Holst. 1996. Angiotensin II regulates both adrenocortical and adrenomedullary function in isolated perfused pig adrenals. *Peptides.* 17 (2): 287-292.

Breslow, M.J. 1992. Regulation of adrenal medullary and cortical blood flow. *Am. J. Physiol.* 262: H1317-H1330.

Briand, S.I., J.M. Bellemare, S.G. Bernier, and G. Guillemette. 1998. Study on the functionality and molecular properties of the AT₄ receptor. *Endocr. Res.* 24: 315-323.

Brown, G.L., and J.S. Gillespie. 1957. The output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat. *J. Physiol.* 138: 81-102.

Bunn, S. J., and P. D. Marley. 1989. Effects of angiotensin II on cultured, bovine adrenal medullary cells. *Neuropeptides* 13: 121-132.

Burgoyne, R.D. 1991. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1071: 174-202.

Burgoyne, R.D., T.R. Cheek. 1987. Reorganisation of peripheral actin filaments as a prelude to exocytosis. *Biosci. Rep.* 7 (4): 281-288.

Burgoyne, R.D. 1984. Mechanisms of secretion from adrenal chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 779: 201-216.

Burnay, M.M., M.B. Vallotton, A.M. Capponi, and M.F. Rossier. 1998. Angiotensin II potentiates adrenocorticotrophic hormone-induced cAMP formation in bovine adrenal glomerulosa cells through a capacitative calcium influx. *Biochem. J.* 15; 330 (pt 1): 21-27.

Bylund, D.B., D.C. Eikenberg, J.P. Hieble, S.Z. Langer, R.J. Lefkowitz, K.P. Minneman, P.B. Molinoff, R.R. Ruffolo, Jr, and U. Trendelenburg. 1994. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46 (2): 121-136.

Cain, M.D., K.J. Catt, and J.P. Coghlan. 1969. Immunoreactive fragments of angiotensin II in blood. *Nature* 223: 617-618.

Campbell-Boswell, M. and Robertson, A. 1981. Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. *Exp. Mol. Pathol.* 35: 265-276.

Campbell, D.J. 1987. Circulating and tissue angiotensin systems. *J. Clin. Invest.* 79: 1-6.

Cardenas, A.M., C. Montiel, C. Esteban, R. Borges, and A.G. Garcia. 1988. Secretion from adrenaline and noradrenaline-storing adrenomedullary cells is regulated by a common dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Brain Res.* 456: 364-366.

Catterall, W.A., and J. Striessnig. 1992. Receptor sites for Ca²⁺ channel antagonists. *Trends. Pharmacol. Sci.* 13:256-262.

Cazaubon, C., J. Gougat, F. Bousquet, P. Guiraudou, R. Gayraud, C. Lacour, A. Roccon, G. Galindo, G. Barthelemy, B. Gautret, C. Bernhart, P. Perreault, J.C. Breliere, G. Le Fur, and D. Nisato. 1993. Pharmacological characterization of SR 47436, a new nonpeptide AT₁ subtype

angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 826-834.

Chaki, S. and T. Inagami. 1993. New signaling mechanism of angiotensin II in neuroblastoma Neuro-2A cells: activation of soluble guanylyl cyclase via nitric oxide synthesis. *Mol. Pharmacol.* 43: 603-608.

Chaki, S. and T. Inagami. 1992. Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 388-394.

Chang, L.L., W.T. Ashton, K.L. Flanagan, R.A. Rivero, T.B. Chen, S.S. O'Malley, G.J. Zingaro, S.D. Kivligh, P.K.S. Siegl, V.J. Lotti, R.S.L. and W.J. Greenlee. 1994. Potent trizolinone-based angiotensin II receptor antagonists with equivalent affinity for both the AT₁ and AT₂ subtypes. *Bioorgan. Medicin. Chem. Letters.* 4 (23): 2787-2792.

Chansel, D., and R. Ardaillou. 1998. Les métabolites actifs dérivés de l'angiotensine II. *Nephrologie.* 19 (7): 427-432.

Charlton, B.G., J. McGadey, D. Russell, and D.E. Neal. 1992. Noradrenergic innervation of the human cortex as revealed by dopamine-beta-hydroxylase immunohistochemistry. *J. Anat.* 180 (pt 3): 501-506.

Cheek, T.R., A. Morgan, A. J. O'Sullivan, R. B. Moreton, M. J. Berridge, and R. D. Burgoyne. 1993. Spatial localization of agonist-induced Ca²⁺ entry in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Cell. Science.* 105: 913-921.

Cheek, T.R. 1991. Calcium signalling and the triggering of secretion in adrenal chromaffin cells. *Pharmacol. Ther.* 52: 173-189.

- Chesselet, M.-F.** 1984. Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain. *Neuroscience* 12: 347-376.
- Chiba, S., and M. Tsukada.** 1986. Angiotensin II-induced tachyphylactic constrictions in isolated and perfused canine mesenteric arteries. *J. Exp. Med.* 150: 417-426.
- Chritton, S.L., M.F. Dousa, T.L. Yaksh, and G.M. Tyce.** 1991. Nicotinic- and muscarinic-evoked release of canine adrenal catecholamines and peptides. *Am. J. physiol.* 260: R589-R599.
- Chung, O., H. Kühl, M. Stoll, and T. Unger.** 1998. Physiological and pharmacological implications of AT₁ versus AT₂ receptors. *Kidney Int.* 54 (Suppl. 67): S95-S99.
- Clauser, E.** 1998. Structure et fonctions moléculaires des récepteurs de l'angiotensine II. *Néphrologie* 19: 403-410.
- Collett, A.R., M.J. Rand, and D.F. Story.** 1984. Catecholamine secretion from the rabbit adrenal gland is not modulated by a mechanism involving β -adrenoceptors. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 269: 63-69.
- Creutz, C.E., C.J. Pazoles, and H.B. Pollard.** 1978. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 253: 2858-2866.
- Cryer, P.E.** 1992. The adrenal medulla. In: *The adrenal gland*. Ed. James, V.H.T., Raven Press, New-York. pp.465-513.
- Csikos, T., O. Chung, and T. Unger.** 1998. Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT₂ receptor. *J. Hum. Hypertens.* 12: 311-318.
- Dale, H.H.** 1914. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 6: 147-190.

Danser A.H.J. 1996. Local renin-angiotensin systems. *Mol. Cell. Biochem.* 157:211-216.

Defaye, G., S. Lecomte, E.M. Chambaz, and S.P. Bottari. 1995. Stimulation of cortisol production through angiotensin AT₂ receptors in bovine fasciculata cells. *Endocrin. Res.* 21 (1-2): 183-187.

de Gasparo, M., K.J. Catt, and T. Inagami. 1998. Angiotensin receptors. In: *The IUPHAR Receptor Compendium*. IUPHAR Media Ltd., The Burlington Press, Foxton, Cambridge, U.K. pp. 80-86.

de Gasparo, M., and S. Whitebread. 1995. Binding of valsartan to mammalian angiotensin AT₁ receptors. *Reg. Peptides.* 59: 303-311.

DelliPizzi, A.M., S.D. Hilchey, and C.P. Bell-Quilley. 1994. Natriuretic action of angiotensin (1-7). *Br. J. Pharmacol* 111: 1-3.

Dogiel, A.S. 1894. Die nervendigungen in den mebe nniren der saugethiere. *Arch. Anat. Physiol. Anat. Abt.* 90-104.

Dostal, D.E., T. Murahashi, and M.J. Peach. 1990. Regulation of cytosolic calcium by angiotensins in vascular smooth muscle. *Hypertension* 15: 815-822.

Drust, D.S., and C.E. Creutz. 1988. Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 331: 88-91.

Dzau, V.J. 1987. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am. J. Cardiol.* 59 (suppl A): 59-65.

- Emorine, L.J., S. Marullo, M.-M. Briend-Sutren, G. Patey, K. Tate, C. Delavier-Klutchko, and A.D. Strosberg.** 1989. Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* 245: 1118-1121.
- Estivariz, F.E., P.J. Lowry, and S. Jackson.** 1992. Control of adrenal growth. In: The adrenal gland. ed. James, V.H.T. Raven Press, New-York. pp. 43- 70.
- Falkenhahn, M., P. Gohlke, M. Paul, M. Stoll, and T. Unger.** 1994. The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: New therapeutic aspects. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 24 Suppl 2: S6-S13.
- Fasolato, C., B. Innocenti, and T. Pozzan.** 1994. Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 77-83.
- Feldberg, W., and G.P.Lewis.** 1965. Further studies on the effects of peptides on the suprarenal medulla of cats. *J. Physiol.* (London) 178: 239-251.
- Feldberg, W., and G.P. Lewis.** 1964. The action of peptides on the adrenal medulla. Release of adrenaline by bradikinin and angiotensin. *J. Physiol.* (London) 171: 98-118.
- Feldberg, W., B. Munz, and H. Tsudzimura.** 1934. The mechanism of nervous discharge of adrenaline. *J. Physiol.* 81: 286-304.
- Fernandez, J. M., R. Granja, V. Izaguirre, C. Gonzalez-Garcia, V. Cena.** 1995. ω -Conotoxin GVIA blocks nicotine-induced catecholamine secretion by blocking the nicotinic receptor-activated inward currents in bovine chromaffin cells. *Neurosc. Lett.* 191: 59-62.

Fink, G.D. and C.A. Bruner. 1985. Hypertension during chronic peripheral and central infusion of angiotensin III. *Am. J. Physiol.* 249: E201-E208.

Ford, A.P.D.W., T.J. Williams, D.R. Blue, and D.E. Clark. 1994. α_1 -adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 167-170.

Foucart, S., R. Nadeau, and J. de Champlain. 1988. Local modulation of adrenal catecholamines release by β_2 -adrenoceptors in the anesthetized dogs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 337: 29-34.

Foucart, S., R. Nadeau, and J. de Champlain. 1987. The release of catecholamines from the adrenal medulla and its modulation by α_2 -adrenoceptors in the anesthetized dogs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 550-557.

Fredlund, P., S. Saltman, and K. J. Catt. 1975. Aldosterone production by isolated adrenal glomerulosa cells: Stimulation by physiological concentrations of angiotensin II. *Endocrinology* 97 (7): 1577-1586.

Freeman, E.J., G.M. Chisolm, C.M. Ferrario, and E.A. Tallant. 1996. Angiotensin (1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 28: 104-108.

Gallinat, S., T. Csikos, S. Meffert, T. Herdegen, M. Stoll, and T. Unger. 1997. The angiotensin AT₂ receptor down-regulates neurofilament M in PC12W cells. *Neurosci. Lett.* 227: 29-32.

Gallo-Payet, N. P. Pothier, and H. Isler. 1987. On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible role in adrenocortical function. *Biochem. Cell. Biol.* 65: 588-592.

Ganong, W. F., P. J. Mulrow, A. Boryczkz, and G. Cera. 1962. Evidence for a direct effect of angiotensin II on adrenal cortex of the dog. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109: 381-384.

- Ganten, D., J. Mullins, and K. Lindpainter.** 1989. The tissue renin-angiotensin system: a target for angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Human. Hypertens.* 3: 63-70.
- Garrison, J.C. and M.J. Peach.** 1990. Renin and angiotensin. In: A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor (eds) *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics, 8th ed.* Pergamon Press, New York, pp. 749-763.
- Gaspo, R., L. Lamarche, J. de Champlain, and N. Yamaguchi.** 1997. Canine adrenal catecholamine response to VIP is blocked by PACAP-(6-27) in vivo. *Am. J. Physiol.* 272: R1606-T1612.
- Gaspo, R., N. Yamaguchi, and J. de Champlain.** 1995. Correlation between neural release of VIP and adrenomedullary catecholamine secretion in vivo. *Am. J. Physiol.* 268: R1449-R1455.
- Gaspo, R., N. Yamaguchi, and J. de Champlain.** 1993. Effects of nifedipine and Bay K 8644 on stimulation-induced adrenal catecholamine secretion in the dog. *Am. J. Physiol.* 265: R28-R34.
- Geisterfer, A., Peach, M.J. and Owens, G.K.** 1988. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Cir. Res.* 62: 749-756.
- Gilchrist, A.B., A. Leake, and B.G. Charlton.** 1993. Innervation of the human adrenal cortex: simultaneous visualisation using acetylcholinesterase histochemistry and dopamine beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Acta Anat.* 146 (1): 31-35.
- Goodfriend, T.L., and M.J. Peach.** 1975. Angiotensin III. Evidence and speculation for its role as an important agonist in the renin-angiotensin system. *Circ. Res.* 36: 38-48.
- Granneman, J.G., K.N. Lahners, and A. Chaudhry.** 1993. Characterization of the human β_3 -adrenergic receptor gene. *Mol. Pharmacol.* 44: 264-270.

Greenberg, A., and O. Zinder. 1982. α - and β -receptor control of catecholamine secretion from isolated adrenal medulla cells. *Cell Tissue Res.* 226: 655-665.

Gwosdow, A. R., N. A. O'Connell, J. A. Spencer, M. S. A. Kumar, R. K. Agarwal, H. H. Bode, and A. B. Abou-Samra. 1992. Interleukin-1-induced corticosterone release occurs by an adrenergic mechanism from rat adrenal gland. *Am. J. Physiol (Endocr. Metab.* 26). 263: E461-E466.

Guyton, A.C. 1991. The adrenocortical hormones. Chapter 77. In: Textbook of medical physiology. 8^o ed. W.B. Saunders Compagny, Philadelphia. pp842-854.

Hajnoczky, G., G. Csordas, A. Bago, A.T. Chiu, and A. Spatt. 1992. Angiotensin II exerts its effect on aldosterone production and potassium permeability through receptor subtype AT₁ in rat adrenal gland glomerulosa cells. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1009-1012.

Hall, K.L., S. Venkateswaran, J.M. Hanesworth, M.E. Schelling, and J.W. Harding. 1995. Characterization of a functional angiotensin IV receptor on coronary microvascular endothelial cells. *Regul. Pept.* 58: 107-115.

Hall, K.L., J.M. Hanesworth, A.E. Ball, G.P. Felgenhauer, H.L. Hosick, and J.W. Harding. 1993. Identification and characterization of a novel angiotensin binding site in cultured vascular smooth muscle cells that is specific for the hexapeptide (3-8) fragment of angiotensin II, angiotensin IV. *Regul. Pept.* 44: 225-232.

Halliwill, J.R., and G.E. Billman. 1992. Effect of general anesthesia on cardiac vagal tone. *Am. J. Physiol.* 262: H1719-H1724.

Hammond, C., and D. Tritsch. 1990. Neurobiologie cellulaire. Doin éditeurs, Paris. pp329-364.

Handa, R.J., C.M. Ferrario, and J.W. Strandhoy. 1996a. Renal actions of angiotensin (1-7): in vivo and in vitro studies. *Am. J. Physiol.* 270: F141-F147.

Handa, R.K., J.W. Harding, and S.E. Handa. 1996b. Inhibition of proximal tubule Na⁺ transport by angiotensins: role of the AT₄ receptor. *FASEB. J.* 10 (Abstract): A396.

Hano, T., M. Mizukoshi, A. Baba, N. Nakamura, and I. Nishio. 1994. Angiotensin II subtype 1 receptor modulates epinephrine release from isolated rat adrenal gland. *Blood Pressure (suppl 5)*, 105-108.

Hans, M., P. Illes, and K. Takeda. 1990. The blocking effects of ω -conotoxin on Ca²⁺ current in bovine chromaffin cells. *Neurosc. Lett.* 114: 63-68.

Havel, P.J., D.E. Flatness, J.B. Halter, J.D. Best, R.C. Veith, and G.J.J. Taborsky. 1987. Halothane anesthesia does not suppress sympathetic activation produced by neuroglucopenia. *Am. J. Physiol.* 252: E667-E672.

Heemskerk, F.M. and J.M. Saavedra. 1995. Quantitative autoradiography of angiotensin II AT₂ receptors with [125I]CG 42112. *Brain Research.* 677 (1), 29-38.

Herbert, J. M., C. Delisee, F. Dol, P. Schaeffer, C. Cazaubon, D. Nisato, and P. Chatelain. 1994. Effect of SR 47436, a novel angiotensin II AT₁ receptor antagonist, on human vascular smooth muscle cells in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 251: 143-150.

Hess, P., J. B. Lansman, and R. W. Tsien. 1984. Different modes of Ca²⁺ channel gating behavior favoured by dihydropyridine Ca²⁺ agonists and antagonists. *Nature* 311: 538-544.

Hinson, J. P., S. Kapas, C. D. Orford, and G. P. Vinson. 1992. Vasoactive intestinal peptide stimulation of aldosterone secretion by the rat adrenal cortex may be mediated by the local release

of catecholamines. *J. Endocr.* 133: 253-258.

Hinson, J. P. 1990. Paracrine control of adrenocortical function: a new role for the medulla? *J. Endocr.* 124: 7-8.

Hoffman, B.B., and R.J. Lefkowitz. 1996. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor. In: Goodman and Gilman's, the pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. J.G Hardman, A. Goodman Gilan, L.E. Limbird. McGraw-Hill Co, U.S.A. pp.199-248.

Hokfelt, T., J.M. Lundsberg, M. Schultzberg, and J. Fahrenkrug. 1981. Immunohistochemical evidence for a local VIP-ergic neurone system in the adrenal gland of the rat. *Acta Physiol. Scand.* 113: 575-576.

Holycross, B.J., Peach, M.J. and Owens, G.K. 1993. Angiotensin II stimulates increased protein synthesis, not increased DNA synthesis, in intact rat aortic segments, in vitro. *J. Vasc. Res.* 30: 80-86.

Hughes, A.D. 1998. Molecular and cellular mechanisms of action of angiotensin II (AT₁) receptors in vascular smooth muscle. *J. Human Hypertens.* 12: 275-281.

Inagami, T., S. Eguchi, K. Numaguchi, E.D. Motley, H. Tang, T. Matsumoto, and T. Yamakawa. 1999. Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: S57-S61.

Inagami, T., M. Mizukoshi, and D.F. Guo. 1994. Molecular cloning, functions, and regulation. In: J.M. Saavedra and P.B.M.W.M. Timmermans (eds) Angiotensin receptors, Plenum Press, New-York, pp 1-15.

Inagami, T., and R.C. Harris. 1993. Molecular insights into angiotensin II receptor subtypes. *News Physiol. Sci.* 8: 215-218.

- Israel, A., C. Stromberg, K. Tsutsumi, M.D. Garrido, M. Torres, and J.M. Saavedra.** 1995. Angiotensin II receptor subtypes and phosphoinositide hydrolysis in rat adrenal medulla. *Brain Research Bulletin* 38, 441-446.
- Jackson, E.K., and J.C. Garrison.** 1996. Renin and angiotensin. In: *The pharmacological basis of therapeutics*, edited by A. Goodman Gilman, J.G. Hardman, and L.E. Limbird (ninth ed.). New-York: McGraw-Hill, pp 733.
- Janis, R., A. J. G. Sarmiento, S. C. Maurer, G. T. Bolger, and D. J. Triggle.** 1984. Characteristics of the binding of [3H] nitrendipine to rabbit ventricular membranes: modification by other Ca²⁺ channel antagonists and by the Ca²⁺ channel agonist Bay K 8644. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231(1): 8-15.
- Jimenez, R. R., M. G. Lopez, C. Sancho, R. Maroto, and A. G. Garcia.** 1993. A component of the catecholamine secretory response in the bovine adrenal gland is resistant to dihydropyridines and ω -conotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 1278.
- Johnston, C.I., M. Naitoh, and L.M. Burrell.** 1997. Rational and pharmacology of angiotensin II receptor antagonists: current status and future issues. *J. Hypertens.* 15: S3-S6.
- Johnston, C.I.** 1992. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *J. Hypertens.* 10 (suppl 7): S13-S26.
- Johnston, C.I.** 1990. Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs* 39 (suppl 1): 21-31.
- Kambayashi, Y., S. Bardhan, K. Takahashi, S. Tsuzuki, H. Inui, T. Hamakubo, and T. Inagami.** 1993. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* 268: 24543-24546.

Kang, J., P. Posner, and C. Sumners. 1994. Angiotensin type II receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory G-protein. *Am. J. Physiol.* 267: C1289-C1297.

Kass, R. S., and J. P. Arena. 1989. Influence of pH on calcium channel block by amlodipine, a charged dihydropyridine compound. *J. Gen. Physiol.* 93:1109-1127.

Katzung, B.G. 1998. Introduction to autonomic pharmacology. In: Basis and clinical pharmacology. 7^e édition. Ed. Katzung, B.G. Appleton and Lange, pp. 73.

Kerins, D.M., Q. Hao, and D.E. Vaughan. 1995. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J. Clin. Invest.* 96: 2515-2520.

Kesse, W. K., T. L. Parker, and R. E. Coupland. 1988. The innervation of the adrenal gland. I. Source of pre- and post-ganglionic nerve fibres to the rat adrenal gland. *J. Anat.* 157: 33-41.

Kim, S. J. W. Lim, and J. Kim. 1995. Contribution of L- and N-type calcium currents to exocytosis in rat adrenal medullary chromaffin cells. *Brain Res.* 675: 289-296.

Kimura, T., A. Takeuchi, and S. Satoh. 1994. Inhibition by ω -conotoxin GVIA of adrenal catecholamine release in response to endogenous and exogenous acetylcholine. *Eur. J. Pharmacol.* 264: 169-175.

Kimura, T., T. Shimamura, and S. Satoh. 1992. Effects of pirenzepine and hexamethonium on adrenal catecholamine release in response to endogenous and exogenous acetylcholine in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20: 870-874.

Kleitman, N., and M.A. Holzwarth. 1985. Catecholaminergic innervation of the rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res.* 241: 139-147.

Knight, D. E., and P. F. Baker. 1982. Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J. Membrane. Biol.* 68:107-140.

Koganei, H., T. Kimura, and S. Satoh. 1995. Effects of beta adrenoceptor agonists and antagonists on adrenal catecholamine release in response to splanchnic nerve stimulation in anesthetized dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273 (3): 1337-1344.

Kohara, K., K.B. Brosnihan, M.C. Chappel, M.C. Khosla, and C.M. Ferrario. 1991. Angiotensin (1-7): a member of circulating angiotensin peptides. *Hypertension* 17: 131-138.

Koike, G., M. Horiuchi, T. Yamada, C. Szpirer, H.J. Jacob, and V.J. Dzau. 1994. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 1842-1850.

Kondo, H. 1985. Immunohistochemical analysis of the localization of neuropeptides in the adrenal gland. *Arch. Histol. Jpn.* 48: 453-481.

Kramar, E.A., J.W. Harding, and J.W. Wright. 1997. Angiotensin II- and IV-induced changes in cerebral blood flow roles of AT₁, AT₂, and AT₄ receptor subtypes. *Reg. Peptide.* 68: 131-138.

Krief, S., F. Lönnqvist, S. Raimbault, B. Baude, A. Van Spronsen, P. Arner, A.D. Strosberg, D. Ricquier, and L.J. Emorine. 1993. Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest.* 91: 344-349.

Kuramoto, H., H. Kondo, and T. Fujita. 1987. Calcitonin gene related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in scattered chromaffin cells and nerve fibers in the adrenal gland of rats. *Cell Tissue Res.* 247: 309-315.

- Kuramoto, H., H. Kondo, and T. Fujita.** 1986. Neuropeptide tyrosine (NPY)-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and intraadrenal nerve fibers of rats. *Anat. Rec.* 214: 321-328.
- Kuttan, S.C., and M.K. Sim.** 1993. Actions of norepinephrine and angiotensin II on aortic rings of adult and aged normotensive and hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21 (3): 371-375.
- Lands, A.M., A. Arnold, J.P. McAuliff, F.P. Luduena, and T.G. Brown. Jr.** 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214: 597-598.
- Landsberg, L., and J.B. young.** 1992. Catecholamine and the adrenal medulla. In: Textbook of endocrinology. 8^{ed}. Wilson, J.D., et D.W. Foster. eds W.B. Sanders Co. Philadelphia, pp.621-685.
- Langer, S.Z.** 1997. 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *Trends In Pharmacol. Sci.* 18 (3): 95-99.
- Langer, S.Z.** 1974. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* 23 (13): 1793-1780.
- Lassegue, B., K.K. Griendling, and R.W. Alexander.** 1994. Molecular biology of angiotensin II receptors. In: J.M. Saavedra and P.B.M.W.M. Timmermans (eds) Angiotensin receptors, Plenum Press, New-York, pp 17-48.
- Lefkowitz, R.J., B.B. Hoffman, and P. Taylor.** 1996. Neurotransmission. The autonomic and somatic motor nervous system. In: The pharmacological basis of therapeutics, edited by A. Goodman Gilman, J.G Hardman, and L.E. Limbird (ninth ed.). New-York: McGraw-Hill. pp105-139.
- Levens, N.R., M.J. Peach, and R.M. Carey.** 1981. Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the control of renal function. *Circ. Res.* 48: 156-167.

Lewis, G. P., and E. Reit. 1965. The action of angiotensin and bradykinin on the superior cervical ganglion of the cat. *J. Physiol.* (London) 179: 538-553.

Li, J.Y., L. Yahiaoui, M.C. Berthelon, and J.M. Saez. 1998. Regulation of cell proliferation and angiotensin II type 2 receptors in R3T3 cells. *Endocr. Res.* 24: 297-305.

Li, Q., J. Zhang, M. Pfaffendorf, and P.A. Van Zwieten. 1996. Direct positive chronotropic effects of angiotensin II and angiotensin III in pithed rats and in rat isolated atria. *Br. J. Pharmacol.* 118 (7): 1653-1658.

Li, Q., J. Zhang, M. Pfaffendorf, and P.A. Van Zwieten. 1995. Comparative effects of angiotensin II and its degradation products angiotensin III and angiotensin IV in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 116 (7): 2963-2970.

Lindpainter, K. and D. Ganten. 1991. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ. Res.* 68: 905-921.

Linnoila, R.I., R.P. Diaugustine, and R.J. Miller. 1980. Distribution of Met⁵- and Leu⁵-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience* 5: 2247-2259.

Livett, B. G., and P.D. Marley. 1993. Noncholinergic control of adrenal catecholamine secretion. *J. Anat.* 183: 2777-289.

Lokuta, A.J., C. Cooper, S.T. Gaa, H.E. Wang, and T.B. Rogers. 1994. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J. Biol. Chem.* 269: 4832-4838.

Lu, X.Y., K.L. Grove, W. Zhan, and R.C. Speth. 1995. Pharmacological characterization of angiotensin II AT(2) receptor subtype heterogeneity in the rat adrenal cortex and medulla. *Endocr. J.* 3: 255-261.

Lönnqvist, F., S. Krief, A.D. Strosberg, B. Nyberg, L.J. Emorine, and P. Arner. 1993. Evidence for a functional β_3 -adrenoceptor in man. *Br. J. Pharmacol.* 110: 929-936.

Luque, M., P. Martin, N. Martell, C. Fernandez, K.B. Brosnihan, and C.M. Ferrario. 1996. Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin (1-7) in essential hypertension. *J. Hypertens.* 14: 799-805.

Malhotra, R.K., T.D. Wakade, and A.R. Wakade. 1988. Vasoactive intestinal polypeptide mobilize intracellular Ca^{2+} through breakdown of phosphoinositides to induce catecholamine secretion. Role of IP_3 in exocytosis. *J. Biol. Chem.* 263: 2123-2126.

Marchand, C., L. Brown, and C. Sernia. 1993. Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22: 449-455.

Marieb, E.N., and G. Laurendeau. 1992. Le système nerveux autonome. Chapitre 14. Dans: Anatomie et physiologie humaine. Ed. The Benjamin/Cummings, Canada. pp.459-564.

Martineau, D., S. Lamouche, R. Briand, and N. Yamaguchi. 1999. Functional involvement of angiotensin AT_2 receptor in adrenal catecholamine secretion in vivo. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77: 367-374.

Martineau, D. R. Briand, and N. Yamaguchi. 1996. Functional evidence for L-type Ca^{2+} channels controlling adrenal catecholamine release induced by angiotensin II in vivo. *Am. J. Physiol.* 271 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 40): R1713-R1719.

Martineau, D. N. Yamaguchi, and R. Briand. 1995. Inhibition by BMS 186295, a selective nonpeptide AT₁ antagonist, of adrenal catecholamine release induced by angiotensin II in the dog in vivo. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 459-464.

Mazzocchi, G., G. Gottardo, V. Macchi, P.G. Andreis, L.K. Malendowicz, and G.G. Nussdorfer. 1998. The AT₂ receptor-mediated stimulation of adrenal catecholamine release may potentiate the AT₁ receptor-mediated aldosterone secretagogue action of angiotensin-II in rats. *Endocrine Res.* 24: 17-28.

Mazzocchi, G., L. K. Malendowicz, V. Meneghelli, G. Gottardo, and G. G. Nussdorfer. 1993. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulates hormonal secretion of the rat adrenal cortex in vitro: Evidence that adrenal chromaffin cells are involved in the mediation of the mineralocorticoid, but not glucocorticoid secretagogue action of VIP. *Biomed. Res.* 14: 435-440.

McGehee, D.S., and L.W. Role. 1995. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Ann. Rev. Physiol.*, 57: 551-558.

McMillian, M.K., R.K. Tuominen, P.M. Hudson, H.H. Suh, and J.S. Hong. 1992. Angiotensin II receptors are coupled to ω -conotoxin-sensitive calcium influx in bovin adrenal medullary chromaffin cells. *J. Neurochem.* 58: 1285-1291.

McNicol, A.M. 1992. The human adrenal gland. In: The adrenal gland. Second edition. Ed. James, V.H.T. Raven Press, New York, pp1.

Meffert, S., M. Stoll, U.M. Steckelings, S.P. Bottari, and T. Unger. 1996. The angiotensin II AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol. Cell. Endocr.* 122: 59-67.

- Mento, P.F. and B.M. Wilkes.** 1987. Plasma angiotensins and blood pressure during converting enzyme inhibition. *Hypertension* 9 (suppl III): 42-48.
- Miller, V.L.** 1995. Tissue-culture invasion: fact or artefact? *Trends in Microbiol.* 3: 69-71.
- Miller-Wing, A.V., J.M. Hanesworth, M.F. Sardinia, K.L. Hall, J.W. Wright, R.C. Speth, K.L. Grove, and J.W. Harding.** 1993. Central angiotensin IV binding sites: distribution and specificity in guinea pig brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 1718-1726.
- Minneman, K.P.** 1988. α_1 -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol. Rev.* 40: 84-119.
- Moeller, I., G. Paxinos, F.A.O. Mendelsohn, G.P. Aldred, D. Casley, and S.Y. Chai.** 1996. Distribution of AT_4 receptors in the macaca fasciculata brain. *Brain. Res.* 712: 307-324.
- Montiel, C., A.R. Artajelo, and A.G. Garcia.** 1984. Effects of the novel dihydropyridine Bay K 8644 on adrenomedullary catecholamine release evoked by calcium reintroduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 851-857.
- Moriguchi, A., E.A. Tallant, K. Matsumura, T.M. Reilly, H. Walton, D. Ganten, and C.M. Ferrario.** 1995. Opposing actions of angiotensin (1-7) and angiotensin II in the brain of transgenic hypertensive rats. *Hypertension* 25: 1260-1265.
- Moriguchi, A., K.B. Brosnihan, H. Kumagai, D. Ganten, and C.M. Ferrario.** 1994. Mechanisms of hypertension in transgenic rats expressing the mouse Ren-2 gene. *Am. J. Physiol.* 266: R1273-R1279.
- Mukoyama, M., M. Nakajima, M. Horiuchi, H. Sasamura, R.E. and V.J. Dzau.** 1993. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of a seven-transmembrane

receptors. *J. Biol. Chem.* 268: 24539-24542.

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.

Nagase, M., T. Shimosawa, K. Ando, and T. Fujita. 1996. Local renin-angiotensin system in sympathetic overactivity of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 19 (3): 171-177.

Nahmias, C., and A.D. Strosberg. 1995. The angiotensin AT₂ receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 217-252.

Nakajima, M. Hutchinson, H.G., Fujinaga, M., Hayashida, W. Morishita, R., Zhang, L., Horiuchi, M., Pratt, R.E. and Dzau, V.J. 1995. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 10663-10667.

Negishi, M., and S. Ito. 1992. Prostaglandin E₂-induced arachidonic acid release and catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.* 44: 2315-2321.

Negishi, M., S. Ito, and O. Hayaishi. 1990. Arachidonic acid stimulates phosphoinositide metabolism and catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 169 (2): 773-779.

Neri, G., P.G. Andreis, T. Prayer-Galetti, G. P. Rossi, L. K. Malendowicz, and G. G. Nussdorfer. 1996. Pituitary adenylate-cyclase activating peptide enhances aldosterone secretion of human adrenal gland: Evidence for an indirect mechanism, probably involving the local release of catecholamines. *J. Clin. Endocr. Metab.* 81 (1): 169-173.

Netter, F.H. 1980. Innervation of the adrenal glands and the kidneys. In: The CIBA collection of medical illustrations. Vol 1. Nervous System. New-York, pp. 97.

Netter, F.H. 1965. The suprarenal glands. In the CIBA collection of medical illustrations. Vol. 4. Endocrine system. and selected metabolic diseases. New Jersey, pp 81.

O'Connell, N. A., A. Kumar, K. Chatzipanteli, A. Mohan, R. K. Agarwal, C. Head, S. R. Bornstein, A. B. Abou-Samra, and A. R. Gwosdow. 1994. Interleukin-1 regulates corticosterone secretion from the rat adrenal gland through a catecholamine-dependent and prostaglandin E₂-independent mechanism. *Endocrinology* 135 (1): 460-467.

Oda, H., D.P. Lotshaw, R. Franco-Saenz, and P.J. Mulrow. 1991. Local generation of angiotensin II as a mechanism of aldosterone secretion in rat adrenal capsules. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196: 175-177.

Oliver, J. A., and R. R. Sciacca. 1984. Local generation of angiotensin II as a mechanism of regulation of peripheral vascular tone in the rat. *J. Clin. Invest.* 74: 1247-1251.

Orci, L., K.H. Gabbay, and W.J. Malaisse. 1972. Pancreatic beta-cell web: its possible role in insulin secretion. *Science* 175: 1128-1130.

Osswald, W., and S. Guimaraes. 1983. Adrenergic mechanisms in blood vessels: morphological and pharmacological aspects. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 96:53-122.

Owen, P. J., D. B. Marriott, and M. R. Boarder. 1989a. Evidence for a dihydropyridine-sensitive and conotoxin-insensitive release of noradrenaline and uptake of calcium in adrenal chromaffin cells. *Br. J. Physiol.* 97: 133.

Owen, N.E., and K.M. Ridge. 1989b. Mechanism of angiotensin II stimulation of Na-K-Cl cotransport of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 257: C629-636.

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.

Palaic, D. and P.A. Khairallah. 1967. Inhibition of noradrenaline uptake by angiotensin. *J. Pharm. Pharmacol.* 19: 396-397.

Pandey, K.N., K.S. Misono, and T. Inagami. 1984. Evidence for intracellular formation of angiotensins. Coexistence of renin and angiotensin-converting enzyme in Leyding cells of rats testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 1337-1343.

Peach, M.J., and D.E. Dostal. 1990. The angiotensin II receptor and the actions of angiotensin II. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16:(suppl 4): S25-S30.

Peach, M.J. 1977. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 57: 313-370.

Peach, M.J. 1971. Adrenal medullary stimulation induced by angiotensin I, angiotensin II, and analogues. *Circ. Res.* 28 and 29 (Suppl. II): II-107-II-116.

Peach, M.J., W.H. Cline, D.T. Watts. 1966. Release of adrenal catecholamines by angiotensin II. *Circ. Res.* 14: 571-575.

Pelet, C., C. Mironneau, L. Rakotoarisoa, and G. Neuilly. 1995. Angiotensin II receptor subtypes and contractile responses in portal vein smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 279: 15-24.

- Penhoat, A., R. Ouali, C. Jaillard, D. Langlois, M. Begeot, and J.M. Saez.** 1991. Characterization and regulation of angiotensin and corticotropin receptors on cultured bovine adrenal cells. *Endocrin. Res.* 17 (1-2): 1-18.
- Péronnet, F., R. Nadeau, G. Boudreau, R. Cardinal, D. Lamontagne, N. Yamaguchi, and J. de Champlain.** 1988. Release of endogenous epinephrine from cardiac sympathetic nerves during electrical stimulation in dogs. *Am. J. Physiol.* 254: R659-R662.
- 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.
- Phillips, M.I.** 1987. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.* 49: 0413-435.
- Phillips, J. H.** 1982. Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience* 7: 1595-1609.
- Pörsti, I., A.T. Bara, R. Busse, and M. Hecker.** 1994. Release of nitric oxide by angiotensin (1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br. J. Pharmacol.* 111: 652-654.
- Powis, D.A., and K.J. O'Brien.** 1991. Angiotensin II increases catecholamine release from bovine adrenal medulla but does not enhance that evoked by K⁺ depolarization or by carbachol. *J. Neurochem.* 57: 1461-1469.
- Pratt, J. H., and J. A. McAteer.** 1989. β -adrenergic enhancement of angiotensin II-stimulated aldosterone secretion. *Life Sci.* 44 (26): 2089-2095.
- Quinn, S.J., and G.H. Gordon.** 1992. Regulation of aldosterone secretion. In: *The adrenal gland., Second Edition.* Ed. James, V.H.T. Raven Press, New York, pp159.

Radhakrishnan, R. and M.K. Sim. 1994. Enhanced pressor response to angiotensin III in spontaneously hypertensive rats: effects of losartan. *Eur. J. Pharmacol.* 259 (1): 87-90.

Rand, M.J., H. Majewski, and D.F. Story. 1990. Modulation of neuroeffector transmission. *Cardiovasc. Pharmacol.*, 3^e edition. edited by M. Antonaccio, Raven Press, New-York, 229-291.

Reit, E. 1972. Actions of angiotensin on the adrenal medulla and autonomic ganglia. *Fed. Proc.* 31: 1338-1343.

Riva, L. and A.M. Galzin. 1996. Pharmacological characterization of a specific binding site for angiotensin IV in cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 305 (1-3): 193-199.

Robinson, P.M., R.A. Perry, K.J. Hardy, J.P. Coghlan, and B.A. Scoggins. 1977. The innervation of the adrenal cortex in the sheep. *J. Anat.*, 124: 117-129.

Robinson, R.L. 1967. Stimulation of the catecholamine output of the isolated, perfused adrenal gland of the dog by angiotensin and bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 156: 252-257.

Role, L.W., and R.L. Pearlman. 1983. Both nicotinic and muscarinic receptors mediate catecholamine secretion by isolated guinea-pig chromaffin cells. *Neuroscience* 1013: 979-985.

Rosenbaum, M., C.C. Malbon, J. Hirsch, and R.L. Leibel. 1993. Lack of β_3 -adrenergic effect on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 352-355.

Rundle, S.E., B.J. Canny, P.M. Robinson, and J.W. Funder. 1988. Innervation of the sheep adrenal cortex: an immunohistochemical study with rat corticotropin-releasing factor antiserum. *Neuroendocrinology* 48: 8-15.

Saavedra, J.M. 1992. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrin. Rev.* 13: 329-380.

- Saltman, S., P. Fredlund, and K. J. Catt.** 1976. Actions of angiotensin II antagonists upon aldosterone production by isolated adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 98 (4): 894-903.
- Santos, R.A.** 1994. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin (1-7): evidence that the actions of angiotensin (1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res. Bull.* 35 293-298.
- Sasaki, K., Y. Tamano, 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: 230-232.
- Satoh, S., T. Itoh, and H. Kuriyama.** 1987. Actions of angiotensin II and noradrenaline on smooth muscle cells of the canine mesenteric artery. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 410: 132-138.
- Schafer, F., A.R. Muller, H.A. Schmid, R. Gerstberger, and E. Simon.** 1996. Angiotensin II receptor subtypes in the duck subfornical organ: an electrophysiological and receptor autoradiographic investigation. *Brain Research.* 711 (1-2), 118-124.
- Schiavone, M.T., M.C. Khosla, and C.M. Ferrario.** 1990. Angiotensin (1-7): evidence for novel actions in the brain. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16 (suppl 4): S19-S24.
- Schindler, C.W., S.R. Tella, H.K. Erzouki, and S.R. Goldberg.** 1995. Pharmacological mechanisms in cocaine's cardiovascular effects. *Drugs & Alcohol Dependence* 37: 183-191.
- Schwartz, J.** 1992. Sympathomimétique. Dans: Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. M. Schorderet (ed.). Frison-Roche, Genève. pp 49-61.
- Sechi, L. A., C.A. Griffin, E.F. Grady, J.E. Kalinyak, and M. Schambelan.** 1992. Cardiac angiotensin receptors in experimental hyperthyroidism in dogs. *Cir. Res.* 71: 1482-1489.

- Sharma, T.R., T.D. Wakade, R.K. Malhotra, and A.R. Wakade.** 1987. Secretion of catecholamines from the perfused adrenal gland of the rat is not regulated by α -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 122: 167-172.
- Sim, M.K., and S.C. Kuttan.** 1992. Effects of noradrenaline and prostanglandin $F_{2\alpha}$ on angiotensin-induced contraction and tachyphylaxis in rat aortic rings. *Pharmacol. Toxicol.* 70: 60-64.
- Sontag, J.M., P. Sanderson, M. Klepper, D. Aunis, K. Takeda, and M.-F. Bader.** 1990. Modulation of secretion by dopamine involves decreases in calcium and nicotinic currents in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (London)*, 427: 495-517.
- Speth, R.C. and A. Husain.** 1988. Distribution of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor binding sites in the rat ovary. *Biol. Reprod.* 38: 695-702.
- Starke, K.** 1981. Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21: 7-30.
- Staszewska-Barczak, J., and J.R. Vane.** 1967. The release of catecholamines from the adrenal medulla by peptides. *Br. J. Pharmac. Chemother.* 30: 655-667.
- Stauderman, K. A., and R. M. Pruss.** 1989. Dissociation of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} mobilization responses to angiotensin II in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 264: 18349-18355.
- Stephenson, S.L., and A.J. Kenny.** 1987. Metabolism of neuropeptides. *Biochem. J.* 241: 237-247.
- Sumners, C., W. Tang, B. Zelezna, and M.K. Raizada.** 1991. Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanisms in neurons and astrocytes from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7567-7571.

Svane, D., O. Kahr, V.B. Hansen, P. Holm-Nielsen, and A. Forman. 1995. Angiotensin-converting enzyme activity and contractile effects of angiotensin I and II in human uteroplacental arteries. *Am. J. Obst. Gynecol.* 172 (3): 991-997.

Swinyard, C.A. 1937. The innervation of the suprarenal glands. *Anat. Rec.* 68: 417-430.

Swanson, G.N., J.M. Hanesworth, M.F. Sardinia, J.K.M. Coleman, J.W. Wright, K.L. Hall, A.V. Miller-Wing, J.W. Stobb, V.I. Cook, E.C. Harding, and J.W. Harding. 1992. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul. Pept.* 40: 409-419.

Szabo, B., L. Hedler, C. Schurr, and K. Starke. 1990. Peripheral presynaptic facilitatory effect of angiotensin II on noradrenaline release in anesthetized rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15 (6): 968-975.

Takayanagi, R., K. Ohnaka, Y. Sakai, R. Nakao, T. Yanase, M. Haji, T. Inagami, H. Furuta, D.F. Guo, M. Nakamuta, and H. Nawata. 1992. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 910-916.

Takeuchi, A., T. Kimura, and S. Satoh. 1993. Effects of nifedipine and BAY-K-8644 on the release of catecholamines from the dog adrenal gland in response to splanchnic nerve stimulation. *Clin. Exp. Physiol. Pharmacol.* 20: 35-39.

Tallan, E.A., X. Lu, R.B. Weiss, M.C. Chappel, and C.M. Ferrario. 1997. Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin (1-7) receptor. *Hypertension* 29: 388-393.

Taylor, P. 1996. Agents acting at the neuromuscular junction and autonomic ganglia. In: A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor (eds) *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis*

of therapeutics, 9th ed. Pergamon Press, New York, pp. 177-197.

Tigerstedt, R. and P.G. Bergam. 1898. Niere und Kreislauf. *Skandinav. Archiv. für. Physiol.* 8: 223-271.

Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.C., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A.M. and Smith, R.D. 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45: 205-251.

Timmermans, P.B.M.W.M., A.T. Chiu, W.F. Herblin, P.C. Wong, and R.D. Smith. 1992a. Angiotensin II receptor subtypes. *Am. J. Hypertens.* 5: 406-410.

Timmermans, P.B.M.W.M., D. Benfield, A.T. Chiu, W.F. Herblin, P.C. Wong, and R.D. Smith. 1992b. Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am. J. Hypertens.* 5: 221S-225S.

Timmermans, P.B.M.W.M., P.C. Wong, A.T. Chiu, and W.F. Herblin. 1991. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 55-62.

Tortora, G.J., and N.P. Anagnostakos. 1987. Principes d'anatomie et de physiologie. 5^e édition de Gérard J. Tortora et Nicolas P. Anagnostakos, eds: Reynald Goulet, Canada. pp369-383.

Tsusumi. K. and J.M. Saavedra. 1992. Heterogeneity of angiotensin II AT₂ receptors in the rat brain. *Mol. Pharmacol* 41: 290-297.

Tsuzuki, S., T. Ichiki, H. Nakakubo, Y. Kitami, D.F. Guo, H. Shirai, and I. Inagami. 1994. Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200: 1449-1454.

Unger, T., O. Chung, T. Csikos, J. Culman, S. Gallinat, P. Gohlke, S. Hohle, S. Meffert, M. Stoll, U. Stroth, and Y.Z. Zhu. 1996. Angiotensins receptors. *J. Hypertens.* 14 (suppl 5): S95-S103.

Unger, T., E. Badoer, D. Ganten, R.E. Lang, and R. Rettig. 1988. Brain angiotensin: pathways and pharmacology. *Circ.* 77 (suppl I): 40-54.

Urata, H., H. Nishimura, and D. Ganten. 1996. Chymase-dependent angiotensin II forming system in humans. *Am. J. Hypertens.* 9: 277-284.

Urata, H., Nishimura, H. and Ganten, D. 1995. Mechanism of angiotensin formation in humans. *Eur. Heart. J.* 16 (Suppl N): 79-85.

Van Kats, J.P., L.M. de Lanoy, A.H. Jan Danser, J.R. Van Meegen, P.D. Verdouw, and M. A.D.H. Schalekamp. 1997. Angiotensin II type I (AT₁) receptor-mediated accumulation of angiotensin II in tissues and its intracellular half-life in vivo. *Hypertension* 30 (part 1): 42-49.

Vatta, M.S., L.G. Biancotti, A.S. Locatelli, M.L. Ponchado, and B.E. Fernandez. 1992. Monophasic and biphasic effects of angiotensin II and angiotensin III on norepinephrine uptake and release in rat adrenal medulla. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: 821-825.

Verhofstad, A.A.J. 1993. Kinetics of adrenal medullary cells. *J. Anat.* 183: 315-326.

Vicaut, E., G. Montalescot, X. Hou, O. Stucker, and B. Teisseire. 1988. Arteriolar vasoconstriction and tachyphylaxis with intraarteriolar angiotensin II. *Microvasc. Res.* 37: 28-41.

Vinson, G. P., J. P. Hinson, and I. E. Toth. 1994. The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J. Neuroendocr.* 6: 235-246.

- Vizi, E.S., I.E. Toth, K.S. Szalay, K. Windisch, E. Orso, D. Szabo, and G.P. Vinson. 1992. Catecholamines released from local adrenergic axon terminals are possibly involved in fine tuning of steroid secretion from zona glomerulosa cells: functional and morphological evidence. *J. Endocrinol.* 135 (3): 551-561.
- Waisman, D.M. 1995. Annexin II tetramer: structure and fonction. *Mol. Cel. Biochem.* 149: 301-322.
- Wakade, T.D., M.A. Blank, R.K. Malhotra, R. Pourcho, and A.R. Wakade. 1991. The peptide VIP is a neurotransmitter in rat adrenal medulla: physiological role in controlling catecholamine secretion. *J. Physiol. (London)* 444: 349-362.
- Wallenstein, S., C.L. Zucker, and J. Fleiss. 1980. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ. Res.* 47: 1-9.
- Wang, D.H., J. Qiu, and Z. Hu. 1998. Differential regulation of angiotensin II receptor subtypes in the adrenal gland: Role of aldosterone. *Hypertension* 32: 65-70.
- Wang, L., M. Eberhard, and P. Erne. 1995. Stimulation of DNA and RNA synthesis in cultured rabbit cardiac fibroblasts by angiotensin IV. *Clin. Sci.* 88: 557-562.
- Warashina, A., Y. Habara, K. Yamaguchi, and T. Kanno. 1994. $[Ca^{2+}]_i$ changes arising in individual guinea-pig chromaffin cells in response to various receptor agonists and their relation to catecholamine secretion in the perfused adrenal gland. *Biomed. Res.* 15:271-280.
- Watanabe, T., N. Shimamoto, A. Takahashi, and M. Fujino. 1995.. PACAP stimulates catecholamine release from adrenal medulla: a novel noncholinergic secretagogue. *Am. J. Physiol.* 269: E903-E909.

- Watkins, L., and W. Maixner.** 1991. The effect of pentobarbital anesthesia on the autonomic nervous system control of heart rate during baroreceptor activation. *J. Auton. Nerv. Syst.* 36: 107-114.
- Watson, S., and D. Girdlestone.** 1995. Tips on nomenclature. *Trends. Pharmacol. Sci.* 16 (1): 15-16.
- Whitebread, S.E., V. Tayler, S.P. Bottari, B. Kamber, and M. de Gasparo.** 1991. Radioiodinated CGP 42112A: A novel high affinity and highly selective ligand for the characterization of angiotensin AT₂ receptors. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* 181: 1365-1371.
- Winkler, H., D.K. Apps, and R. Fischer-Colbrie.** 1986. The molecular function of adrenal chromaffin granules: established facts and unresolved topics. *Neuroscience* 18: 261-290.
- Wong, P.C., S.D. Hart, A. Zaspel, A.T. Chiu, R.D. Smith, and P.B.M.W.M. Timmermans.** 1990. Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype specific ligands: DuP 753 (AII-1) and PD 123177 (AII-2). *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 255: 584-592.
- Wright, J.W., L.T. Krebs, J.W. Stobb, and J.W. Harding.** 1995. The angiotensin IV system. Functional implications. *Frontiers Neuroendocrinol.* 16: 23-52.
- Wright, J.W. and J.W. Harding.** 1994. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 21-53.
- Wright, J.W., A.V. Miller-Wing, M.J. Shaffer, J.M. Hanesworth, and J.W. Harding.** 1993. Angiotensin (3-8) (angiotensin IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory. *Brain. Res. Bull.* 32: 497-502.

Yamada, T., M. Horiuchi, and V.J. Dzau. 1996. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 156- 160.

Yamaguchi, N. 1997. Role of ET_A and ET_B receptors in endothelin-1-induced adrenal catecholamine secretion in vivo. *Am. J. Physiol.* 272: R1290-R1297.

Yamaguchi, N. 1995. Implication of L-type Ca²⁺ channels in noncholinergic adrenal catecholamine secretion by endothelin-1 in vivo. *Am. J. Physiol.* 269 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 38): R287-R293.

Yamaguchi, N. 1993a. *In vivo* evidence for adrenal catecholamine release mediated by non-nicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. *Am. J. Physiol.* 265: R766-R771.

Yamaguchi, N. 1993b. Inhibition by nifedipine of endothelin-induced adrenal catecholamine secretion in anesthetized dogs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 301-305.

Yamaguchi, N. 1992. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: 167-206.

Yamaguchi, N., L. Lamarche, and R. Briand. 1991. Simultaneous evaluation of medullary secretory functions of normal and acutely denervated adrenals. *Am. J. Physiol.* 260 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 29): R306-R313.

Yamaguchi, N., and M. Brassard. 1988. A differential effect of yohimbine on adrenal and neuronal catecholamine release during bilateral carotid occlusion in the dog. *J. Auton. Nerv. Sys.* 25: 141-153.

Yamaguchi, N., J. de Champlain, and R.A. Nadeau. 1977. Regulation of norepinephrine release from cardiac sympathetic fibers in the dog by presynaptic alpha- and beta-receptors. *Circ. Res.* 41:

108-117.

Yang, C.C., T.B. Kuo, S.H. Chan, and J.Y. Chan. 1995. Neurobiology of central angiotensin III and dipsogenesis. *Biol. Signals.* 4 (2): 59-71.

Zhan, J., and R. Pratt. 1996. The AT₂ receptor selectively associates Gi α 2 and Gi α 3 in the rat fetus. *J. Biol. Chem.* 271: 15026-15033.

Zhou, X.-F., and B.G. Livett. 1990. Substance P increases catecholamine secretion from perfused rat adrenal glands evoked by prolonged field stimulation. *J. Physiol. (London)*, 425: 321-334.

Zimlichman, R., D.S. Goldstein, S. Zimlichman, R. Stull, and H.R. Keiser. 1987. Angiotensin II increases cytosolic calcium and stimulates catecholamine release in cultured bovine adrenomedullary cells. *Cell Calcium* 8: 315-325.

Zini, S., M.C. Fournié-Zaluski, E. Chauvel, B.P. Roques, P. Corvol, and C. Llorens-Cortes. 1996. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors. Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 11968-11973.