

Université de Montréal

**Les récepteurs intracellulaires de l'angiotensine II: nouvelles  
cibles thérapeutiques pour le remodelage cardiaque**

par

Artavazd Tadevosyan

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise en sciences (M.Sc)  
en sciences biomédicales

Avril 2009

© Artavazd Tadevosyan, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Les récepteurs intracellulaires de l'angiotensine II: nouvelles cibles thérapeutiques pour le  
remodelage cardiaque

présenté par :

Artavazd Tadevosyan

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Thorin	Président-rapporteur
Dr Stanley Nattel	Directeur de recherche
Dr Bruce G. Allen	Co-directeur de recherche
Dr Yvan Boulanger	Membre du jury

## Résumé

L'angiotensine-II (Ang-II), synthétisée à partir de sources extracardiaques et intracardiaques, régule l'homéostasie cardiaque en favorisant des effets mitogéniques et en promouvant la croissance cellulaire résultant d'une altération de l'expression génique. Dans cette étude, nous avons évalué la possibilité que les récepteurs de l'angiotensine-1 (AT1) ou les récepteurs de l'angiotensine-2 (AT2) situés sur l'enveloppe nucléaire régulent l'expression génique des cardiomyocytes. En analysant les noyaux cellulaires retenus des fractions de cœur de rat par immunobuvardage Western, nous avons détecté une copurification préférentielle des protéines AT1 et AT2 avec un marqueur de la membrane nucléaire (Nup 62), par rapport aux marqueurs de la membrane plasmique (Calpactin I), de l'appareil de Golgi (GRP 78) ou du réticulum endoplasmique (GM130). La microscopie confocale a permis de démontrer la présence des AT1 et AT2 dans les membranes nucléaires. La microinjection de l'Ang-II-FITC sur des cardiomyocytes a provoqué une liaison de préférence aux sites nucléaires. Les enregistrements de transients calciques ont illustré que les AT1 nucléaires régulent le relâchement du  $Ca^{2+}$ . L'incubation des ligands spécifiques d'AT1 et d'AT2 avec l'UTP [ $\alpha^{32}P$ ] a résulté en une synthèse *de novo* d'ARN (par exemple,  $16,9 \pm 0,5$  cpm/ng ADN contrôle vs  $162,4 \pm 29,7$  cpm/ng ADN-Ang II,  $219,4 \pm 8,2$  cpm/ng ADN L -162313 (AT1) et  $126,5 \pm 8,7$  cpm/ng ADN CGP42112A (AT2),  $P < 0,001$ ). L'incubation des noyaux avec Ang-II augmente de façon significative l'expression de NF $\kappa$ B, une réponse qui est réprimée partiellement par la co-administration de valsartan ou de PD123177. Les expériences dose-réponse avec Ang-II administrée à

l'ensemble des noyaux purifiés vs. aux cardiomyocytes seuls a montré une augmentation plus importante dans les niveaux d'ARNm de NFκB avec une affinité de ~ 3 fois plus grande (valeurs d'EC<sub>50</sub> = 9 contre 28 pmol/L, respectivement), suggérant un rôle préférentiel nucléaire dans la signalisation. Par conséquent, nous avons conclu que les membranes cardiaques nucléaires possèdent des récepteurs d'Ang-II couplés à des voies de signalisation et à la transcription génique. La signalisation nucléaire pourrait jouer un rôle clé dans les changements de l'expression de gènes cardiaques, entraînant ainsi des implications mécanistiques et thérapeutiques diverses.

**Mots-clés :** Angiotensine II, sous-types de récepteurs de l'angiotensine, enveloppe nucléaire, régulation des gènes, transcription, remodelage

## Abstract

Angiotensin-II (Ang-II) from extracardiac sources and intracardiac synthesis regulates cardiac homeostasis, with mitogenic and growth-promoting effects largely due to altered gene-expression. In this study, the possibility that angiotensin-1 (AT1R) or angiotensin-2 (AT2R) receptors are located on the nuclear envelope and mediate effects on cardiomyocyte gene expression was assessed. Western blot tests of nucleus-enriched rat heart fractions indicated the presence of AT1R and AT2R proteins that preferentially copurified with a nuclear membrane marker (Nup 62) but not markers of plasma (Calpactin I), Golgi apparatus (GRP 78) or endoplasmic reticulum (GM130) membranes. Confocal microscopy revealed the existence of AT1R and AT2R proteins on nuclear membranes. Microinjected Ang-II preferentially bound to nuclear sites of isolated cardiomyocytes.  $Ca^{2+}_i$ -recordings on nuclear preparations demonstrated an AT1R-mediated  $Ca^{2+}$  release. AT1R and AT2R ligands enhanced *de novo* RNA synthesis in isolated cardiomyocyte nuclei incubated with [ $\alpha^{32}P$ ]UTP (e.g.  $16.9 \pm 0.5$  cpm/ng for DNA control vs.  $162.4 \pm 29.7$  cpm/ng for DNA Ang-II,  $219.4 \pm 8.2$  cpm/ng for DNA L-162313 (AT1) and  $126.5 \pm 8.7$  cpm/ng for DNA CGP42112A (AT2),  $P < 0.001$ ). Ang-II application to isolated cardiomyocyte nuclei enhanced NF $\kappa$ B mRNA-expression, a response that was suppressed by co-administration of valsartan or PD123177. Dose-response experiments with Ang-II applied to purified nuclei vs. to whole cardiomyocytes showed a greater increase in NF $\kappa$ B mRNA levels at saturating concentrations with  $\sim 3$  fold greater affinity ( $EC_{50}$  values 9 vs. 28 pmol/L, respectively), suggesting preferential nuclear signaling. These results lead us to

conclude that cardiac nuclear membranes possess angiotensin receptors that couple to nuclear signaling pathways and regulate transcription. Signaling within the nuclear envelope (e.g. from intracellularly synthesized Ang-II) may play a role in Ang-II-mediated changes in cardiac gene-expression, with potentially important mechanistic and therapeutic implications.

**Keywords:** Angiotensin II, angiotensin receptor subtypes, nuclear envelope, gene regulation, transcription, remodelling

## Table des matières

Page titre.....	i
Page d'identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
<i>Abstract</i> .....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Dédicace.....	xiv
Remerciements.....	xv
 <b>CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE</b>	
1.1 Le système rénine-angiotensine .....	17
1.1.1 La biosynthèse de l'angiotensine II.....	18
1.1.2 Les récepteurs de l'angiotensine II.....	20
1.1.3 Le récepteur AT1.....	20
1.1.3.1 Voie de la phospholipase C.....	21
1.1.3.1.1 L'inositol triphosphate.....	22

1.1.3.1.2 Le 1,2-diacylglycérol	23
1.1.3.2 Voie des tyrosines kinases	24
1.1.3.3 Voie impliquant les canaux ioniques	26
1.1.4 Implication du SRA dans les pathologies cardiovasculaires via l'activation du récepteur AT1	26
<i>Hypertrophie du ventricule gauche</i>	27
<i>Fibrillation auriculaire</i>	28
<i>Athérosclérose</i>	29
1.1.4.1 Effet de l'AT1 sur la fonction contractile	30
1.1.4.2 Effet de l'AT1 sur la fonction cardiaque	31
1.1.4.3 Effet de l'AT1 sur le système cardiovasculaire	31
1.1.5 Le récepteur AT2	34
1.1.5.1 Effet de l'AT2 sur le tonus vasomoteur	34
1.1.5.2 Effet de l'AT2 sur la croissance cellulaire et la fibrose	36
1.1.6 Blocage pharmacologique des récepteurs de l'Ang-II	37
1.2 Système rénine-angiotensine intracellulaire	38
1.2.1 SRAi et remodelage cardiaque	38



1.2.2 Ang-II circulante vs Ang-II locale	40
1.2.3 Synthèse de l'Ang-II : intracellulaire ou extracellulaire?	42
1.2.4 Importance de l'Ang-II dans les pathologies cardiaques	44
1.3 Résumé des connaissances et buts de l'étude	46
1.3.1 Connaissances sur le sujet	46
1.3.2 Hypothèses et objectifs de l'étude	46
<b>CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE</b>	<b>48</b>
<b>CHAPITRE 3 : DISCUSSION</b>	<b>93</b>
3.1 Résumé des principaux résultats	93
3.2 Réactivité et orientation des RCPG sur la membrane nucléaire	94
3.3 Mécanisme de régulation de la transcription génique par les RCPG	96
3.4 Mécanismes de régulation du $Ca^{2+}$ intranucléaire par les RCPG	97
3.5 Perspectives cliniques	99
3.6 Conclusion	100
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>101</b>

## Liste des tableaux

Tableau I :	Effets à court et long terme de l'Ang-II se liant à l'AT1.....	21
Tableau II :	Caractéristiques de deux sous types de récepteurs d'Ang-II, AT1 et AT2 .....	35
On-line Table I :	<i>Antibody information</i> .....	92
On-line Table II :	<i>Primers Information</i> .....	92

## Liste des figures

### INTRODUCTION

Figure 1.1 : Système rénine-angiotensine .....	19
Figure 1.2 : Structure secondaire du récepteur AT1 .....	23
Figure 1.3 : Voies de signalisation intracellulaires associées à l'activation de l'AT1 .....	25
Figure 1.4 : Effets induits par le récepteur AT1 sur divers types cellulaires .....	33
Figure 1.5 : Modèle de régulation du SRA par l'Ang-II .....	44

### ARTICLE

Figure 1: Immunoreactivity of angiotensin II receptor subtypes 1 and 2 in purified cardiac nuclei .....	84
Figure 2: Subcellular distribution of AT1 receptors in adult rat ventricular cardiomyocytes .....	85
Figure 3: Subcellular distribution of AT2 receptors in adult rat ventricular cardiomyocytes .....	86
Figure 4: Endocytosis and intracellular trafficking of Ang-II .....	87
Figure 5: Subcellular localization of intracellularly applied FITC-Ang-II .....	88
Figure 6: Regulation of transcription initiation by AT1R and AT2R in nuclear membranes .....	89
Figure 7: Regulation of nuclear NFkB mRNA expression by nuclear ATR .....	90
Figure 8: Functional coupling of ATRs to Ca <sup>2+</sup> entry in enriched nuclear preparations .....	91

### DISCUSSION

Figure 1.6 : La membrane nucléaire .....	96
--	----

## Liste des abréviations

AGT :	angiotensinogène
Ang-II :	angiotensine II
Ang-IIi:	angiotensine II intracellulaire
AT1 :	récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT1R :	récepteur de type 1 de l'angiotensine II, <i>angiotensin II type 1 receptor</i>
AT2 :	récepteur de type 2 de l'angiotensine II
AT2R :	récepteur de type 2 de l'angiotensine II, <i>angiotensin II type 2 receptor</i>
bFGF :	facteur de croissance des fibroblastes
DAG :	1,2-diacylglycérol
ECA :	enzyme de conversion de l'angiotensine
ECA 2:	enzyme de conversion de l'angiotensine 2
FA :	fibrillation auriculaire
FITC :	fluorescein isothiocyanate
GDP :	guanosine diphosphate
GTP :	guanosine triphosphate
HVG :	hypertrophie du ventricule gauche
I-CAM :	molécules d'adhésion intracellulaire
IP <sub>3</sub> :	inositol triphosphate
M6-P :	récepteur de faible affinité du mannose 6-phosphate
MAPK :	protéine kinase activé par le mitogène, <i>mitogen activated protein kinases</i>

MCV :	maladies cardiovasculaires
Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> :	échangeur sodium-proton
NADPH :	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate protoné
NFκB :	facteur nucléaire kappa B
NO :	oxyde nitrique
PDGF :	facteur de croissance plaquettaire, <i>platelet-derived growth factor</i>
PIP <sub>2</sub> :	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC :	protéine kinase C
PLC :	phospholipase C
PN :	polynucléaire
RCPG :	récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G
ROS :	dérivés réactifs de l'oxygène, <i>reactive oxygen species</i>
Rr :	récepteur de forte affinité de la rénine
SRA :	système rénine-angiotensine
SRAi :	système rénine-angiotensine intracellulaire
TGFβ :	facteur de croissance transformant β, <i>transforming growth factor β</i>
VCAM :	molécules d'adhésion cellulaire vasculaire, <i>vascular cell adhesion molecules</i>

*Je dédie ce mémoire à  
tous ceux et celles qui  
m'ont accompagné et  
soutenu durant ma  
formation.*

## Remerciements

Je tiens à remercier vivement en tout premier lieu Dr Stanley Nattel, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce mémoire, pour avoir cru en mes capacités à mener à bien ce travail, pour son encadrement inestimable, pour ses conseils judicieux et sa pédagogie tout au long de ma formation à l'Institut de cardiologie de Montréal. Malgré ses travaux abondants, il a toujours été disponible pour d'intenses et rationnelles discussions. Par sa rigueur scientifique, son originalité et son grand savoir il m'a fait croire en mes moyens et m'a permis d'obtenir une autonomie scientifique et une des meilleures formations.

Je souhaite adresser également mes plus vifs remerciements au Dr Bruce G. Allen, co-directeur de recherche, pour toute la passion, la vision scientifique qu'il a su me transmettre et son support constant qui a permis de développer mes qualités en recherche cardiovasculaire.

Au-delà, je remercie les membres de mon laboratoire, mes collaborateurs et le personnel technique du centre de recherche de l'ICM, du Génome Québec et du Département de médecine de l'Université de Montréal pour leur aide extrêmement précieuse, leurs conseils et leur soutien apportés au quotidien ainsi que pour les nombreuses discussions sans lesquelles cette étude n'aurait pas été possible.

Mes remerciements sincères vont également aux Drs Éric Thorin et Yvan Boulanger pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Enfin, je tiens à remercier spécialement mes parents et ma sœur qui m'ont inculqué

le courage, la confiance et la détermination, des attributs qui me serviront tout au long de mon chemin vers ma quête personnelle d'excellence. Cet ouvrage est un reflet de leurs innombrables efforts.



# Chapitre 1 : Revue de la littérature

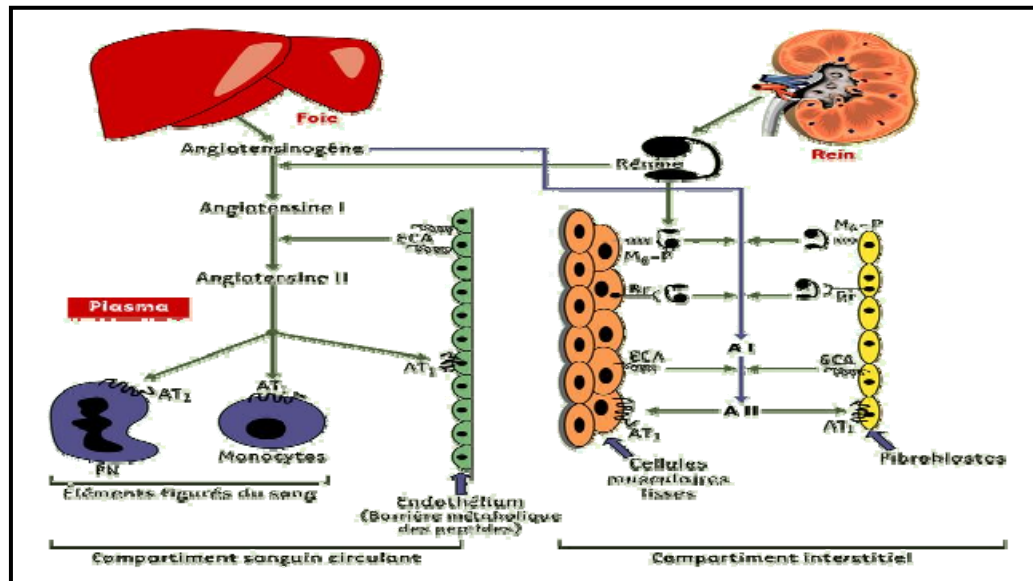
## 1.1 Le système rénine-angiotensine

Par ses actions concertées sur les vaisseaux, le rein et le cœur pour contrôler la tension artérielle, le système rénine-angiotensine (SRA) est l'un des systèmes régulateurs les plus importants de l'organisme. La découverte de la rénine, extraite à partir d'extraits de reins de lapin par Robert Tigerstedt en 1887, se qui a notamment permis d'éclaircir le concept d'hypertension rénovasculaire. Ce fut l'étape cruciale qui a initié un domaine de recherche d'importance inestimable tant au niveau clinique que fondamental.<sup>1</sup> Les recherches fondamentales et cliniques sur le SRA nous ont permis de mieux comprendre et de concevoir des nouvelles approches thérapeutiques afin de contrôler de façon efficace les différents risques cardiovasculaires.<sup>2</sup> Le SRA est maintenant reconnu comme un système doublement vasoactif, agissant au niveau circulatoire, endocrinien et tissulaire, paracrine/autocrine.<sup>3, 4</sup> Les effets des inhibiteurs du SRA conçus pour réguler la tension artérielle seulement, ont été plus bénéfiques qu'on aurait pu prévoir. Le blocage du SRA est maintenant une stratégie de choix pour la protection des systèmes cardiovasculaire, cérébrovasculaire et rénal. Il est donc primordial de mieux comprendre les mécanismes de signalisation intracellulaire activés afin de pouvoir apporter une thérapie ciblée.

### 1.1.1 La biosynthèse de l'angiotensine II

Deux enzymes constituent les piliers de la voie de biosynthèse du SRA. La première appelée la rénine, une protéine longue de 340 acides aminés et d'un poids moléculaire de 37 kDaltons. Elle est sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires du rein et clive l'angiotensinogène (AGT) produite par le foie afin de produire l'angiotensine I (*Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu*), un décapeptide pratiquement inactif. La seconde est l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), une métallopeptidase de zinc. L'ECA est à la fois circulante (plasma), tissulaire et cellulaire (cœur, cerveau, vaisseaux sanguins, foie, rein, organes reproducteurs).<sup>5-7</sup> Elle clive les deux résidus carboxy-terminaux de l'angiotensine I pour produire la forme la plus active, l'angiotensine II (*Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe*) (Ang-II) (Figure 1.1).<sup>8</sup> L'Ang-II, le composant actif du SRA, régule la pression artérielle, le volume plasmatique, l'activité nerveuse sympathique et les réponses à la soif. Il joue aussi des rôles clés dans l'adaptation pathologique manifestée par un remodelage du myocarde lors de l'infarctus et par un remodelage vasculaire lors de l'hypertension. De nouvelles voies de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, indépendante de l'ECA, ont été mises en évidence. Parmi elles nous retrouvons des voies de conversion impliquant la chymase, la cathepsine G ou la carboxypeptidase. Ces voies contribuent de façon non négligeable à la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II dans les tissus cardiaques ou rénaux. Elles sont aussi exacerbées dans certains contextes physiopathologiques en particulier lors de maladies coronariennes.<sup>9</sup>

Récemment, une autre carboxypeptidase, l'ECA2, ayant une homologie de 42% avec le site catalytique de l'ECA, mais non sensible aux inhibiteurs de l'ECA a été découverte.<sup>10, 11</sup> L'ECA2, localisée dans l'épithélium des poumons et dans le petit intestin, entraîne la synthèse de l'angiotensine 1-7 à partir de l'angiotensine I, via l'angiotensine 1-9, et à partir de l'angiotensine II. L'angiotensine 1-7 possède des effets vasodilatateurs, inhibiteurs de la croissance cellulaire, des actions antiprolifératives sur les myocytes cardiaques ainsi que sur les muscles lisses vasculaires.<sup>12, 13</sup> L'angiotensine-3 et -4 sont des produits de la dégradation de l'angiotensine II par des aminopeptidases. Leur rôle n'est à ce jour pas clairement déterminé.



**Figure 1.1 : Système rénine-angiotensine**

Les protéines sécrétées, rénine et angiotensinogène, diffusent dans les deux compartiments plasmatique et interstitiel, alors que les peptides, angiotensines I et II, sont métabolisés dans le compartiment où ils ont été produits. M<sub>6</sub>-P : récepteur de faible affinité du mannose 6-phosphate ; R<sub>r</sub> : récepteur de forte affinité de la rénine ; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine ; AT<sub>1</sub> : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; PN : polynucléaire.

### **1.1.2 Les récepteurs de l'angiotensine II**

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'angiotensine II est la forme la plus active du SRA. Elle déclenche de multiples et diverses voies de signalisation aboutissant à une réponse fonctionnelle immédiate, hypertension artérielle, puis à une réponse structurale hypertrophiante et, enfin, à des réponses pro-inflammatoires et procoagulantes. Ces effets sont médiés essentiellement par deux récepteurs distincts appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), soit les récepteurs à l'angiotensine II de type 1 (AT1) et de type 2 (AT2).

### **1.1.3 Le récepteur AT1**

Le gène codant pour l'expression du récepteur AT1 est situé sur le chromosome 3 chez l'homme. Il est impliqué dans la plupart des effets causés par l'Ang-II; tels que la régulation de la pression artérielle, le maintien de l'équilibre des électrolytes, la sécrétion hormonale et la fonction rénale (Tableau I).<sup>14-19</sup> Ce récepteur est une protéine membranaire de 359 acides aminés possédant une masse moléculaire de 46 kDa (Figure 1.2).<sup>20</sup> De nombreuses voies de signalisation peuvent intervenir, dont la plus classique met en jeu le couplage par l'intermédiaire d'une protéine G à une phospholipase C. D'autres voies peuvent aussi intervenir, en particulier des voies mettant en jeu des tyrosines kinases.

**Tableau I : Effets à court et à long terme de l'Ang-II via l'activation de l'AT1**

	<b>Vasoconstriction</b>
	-effet sur le muscle lisse vasculaire
	-activation sympathique
<i>Effets à court terme</i>	<b>Rétention hydrosodée</b>
	-réabsorption tubulaire du Na <sup>+</sup>
	-sécrétion de l'aldostérone
	-vasoconstriction rénale
	<b>Sur le myocarde</b>
	-hypertrophie des cardiomyocytes
	-prolifération des fibroblastes
<i>Effets à long terme (remodelage cardiaque)</i>	-synthèse du collagène
	<b>Sur les vaisseaux</b>
	-augmentation de l'épaisseur de paroi
	-prolifération des cellules musculaires lisses

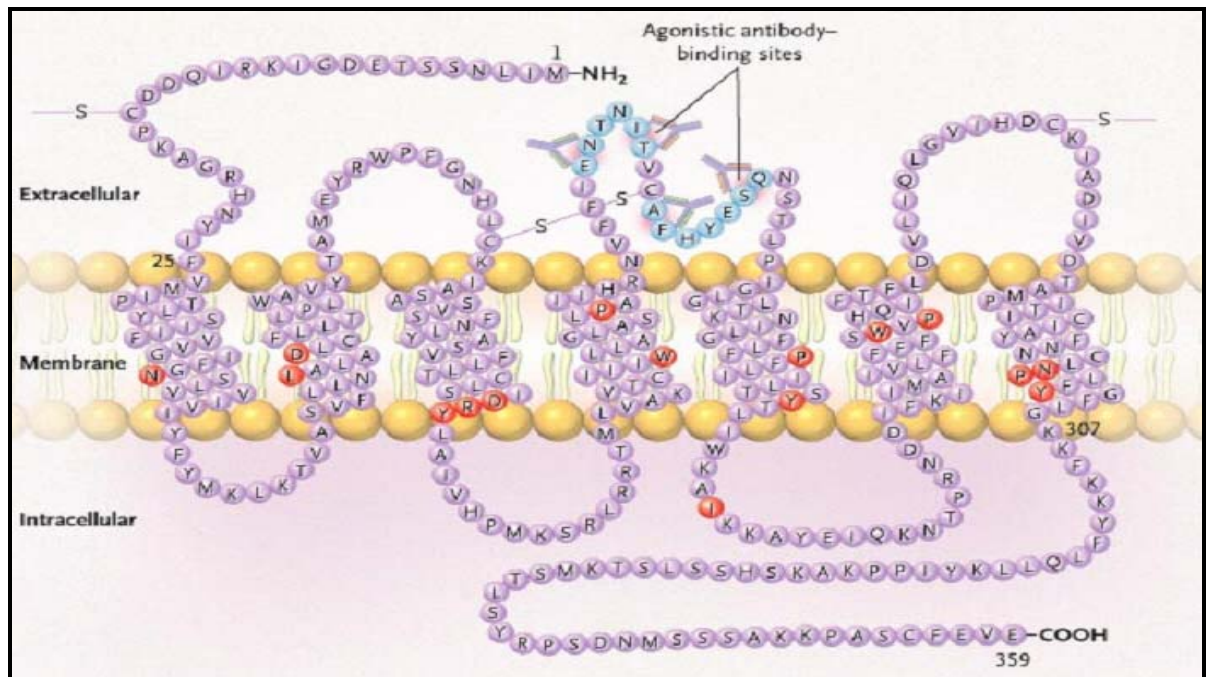
### 1.1.3.1 Voie de la phospholipase C

Une fois l'Ang-II liée au récepteur AT1, il se produit des modifications conformationnelles de celui-ci qui sont associées au remplacement du guanosine diphosphate (GDP) par du guanosine triphosphate (GTP) au niveau de la sous-unité  $\alpha$  de la

protéine G. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  se dissocient alors du récepteur. Les principales familles de protéines G sont classées en fonction de leurs sous-unités  $\alpha$  dont il existe trois classes:  $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$  et  $\alpha_q$ . Les récepteurs AT1, tout comme les récepteurs adrénergiques et à l'endothéline, sont des récepteurs couplés principalement à des protéines Gq. La sous-unité  $\alpha$  de la protéine G, dissociée du récepteur après son activation, va activer la phospholipase C (PLC) alors que l'ensemble  $\beta\gamma$  pourrait activer des tyrosines kinases. La PLC clive le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) présent au niveau de la membrane cellulaire en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et en 1,2 diacylglycérol (DAG).<sup>21</sup>

#### **1.1.3.1.1 L'inositol triphosphate**

L'IP<sub>3</sub> apparaissant sous l'effet de la PLC est un médiateur hydrophile très soluble dans le cytosol dans lequel il diffuse pour aller se fixer sur un récepteur qui lui est spécifique, situé au niveau du réticulum endoplasmique. La fixation sur ce récepteur entraîne l'ouverture d'un canal calcique permettant l'extrusion de calcium jusqu'alors entreposé dans le réticulum. Il en résulte donc une élévation rapide de calcium libre intracellulaire, d'où une première composante de la contraction au niveau du vaisseau sanguin.<sup>22</sup> À cette libération de calcium intracellulaire peut faire suite une entrée de calcium extracellulaire qui peut être inhibée par des dihydropyridines.<sup>23</sup> Le rôle des canaux calciques transmembranaires de type L a été mis en évidence dans l'augmentation de la concentration de calcium libre cytosolique survenant sous l'effet de l'activation des récepteurs AT1 par l'Ang-II.<sup>24</sup>



**Figure 1.2 : Structure secondaire du récepteur AT1**

Le récepteur AT1 appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G.

### 1.1.3.1.2 Le 1,2-diacylglycérol

Par opposition à l'IP<sub>3</sub>, le DAG est un lipide hydrophobe se localisant principalement au niveau de la membrane plasmique et ayant un rôle d'activateur de la protéine kinase C (PKC). La PKC activée phosphoryle différents substrats protéiques dont les canaux calciques, l'échangeur sodium-proton (Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>) ainsi que les différents effecteurs de la voie de signalisation. Cet effet de l'Ang-II peut intervenir dans les interrelations synergiques. Par exemple, l'Ang-II renforce les effets de la stimulation adrénergique de la contraction *in vitro* de l'aorte par activation de la PKC.<sup>25</sup> La PKC peut

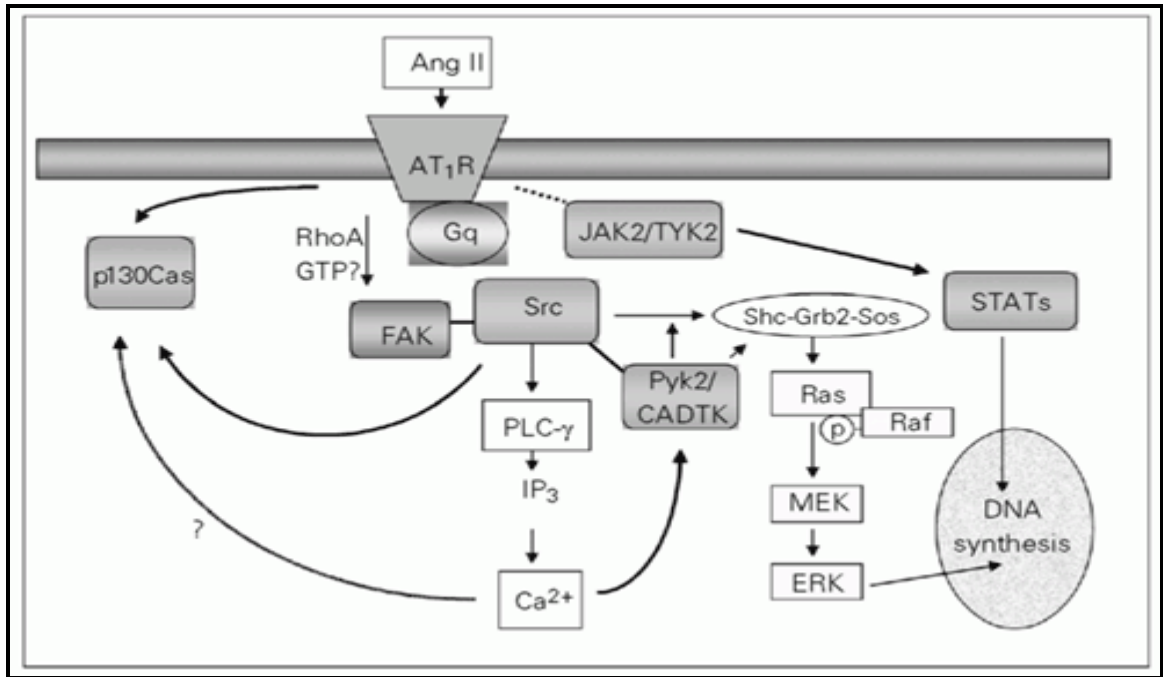
aussi activer de façon indirecte la phospholipase D qui hydrolyse la phosphatidylcholine pour produire l'acide phosphatidique. Ainsi, l'augmentation continue de la production d'acide phosphatidique interfère avec les processus oxydatifs et augmente la production d'anions superoxydes. Ces radicaux libres affaiblissent les capacités vasodilatatrices du NO et favorisent potentiellement les processus d'athérogenèse.<sup>26</sup>

Les PKC sont impliquées dans les phénomènes moléculaires qui aboutissent principalement à l'hypertrophie cardiaque et vasculaire via l'activation de la voie de MAPK (protéines kinases activées par le mitogène).<sup>27</sup> Ce phénomène cause l'augmentation de la synthèse protéique (collagène, ténascine, fibronectine) ainsi que l'activation des facteurs transcriptionnels de croissance (plaquettaire PDGF, transformant TGF $\beta$ , fibroblastes bFGF) qui sont à l'origine de la prolifération cellulaire.

### **1.1.3.2 Voie des tyrosines kinases**

L'Ang-II liée à son récepteur peut alternativement activer des voies de signalisation intracellulaire indépendantes des protéines G. La cascade impliquant la voie des tyrosines kinases (JAK/STAT, Src, Fyn, Yes, Pyk2) serait surtout impliquée dans les processus de croissance cellulaire et inflammatoires, dans le remodelage tissulaire et dans les mécanismes de contraction (Figure 1.3).<sup>28</sup> Dans les modèles expérimentaux de rat, il a été





**Figure 1.3 : Voies de signalisation intracellulaires associées à l'activation de l'AT1**

La liaison de l'Ang-II à son récepteur active des voies de signalisation dépendantes ou non des protéines G. PLC-γ : phospholipase C-γ; ERK : kinase régulé par des signaux extracellulaires, JAK2/TYK2 : Janus kinase/s; FAK : kinase focale d'adhérence; CADTK : tyrosine kinase dépendent du calcium; Akt : protéine kinase sérine / thréonine PYK: pyruvate kinase

démonstré que l'utilisation des bloqueurs sélectifs des tyrosines kinases s'avère très efficace pour diminuer les effets contractiles de l'Ang-II sur l'aorte, les vaisseaux mésentériques et les artères résistives.<sup>29, 30</sup> En plus, l'injection d'Ang-II dans différentes suspensions de cellules provoque la phosphorylation de résidus tyrosine de plusieurs protéines impliquant l'activation des protéines activées par le mitogène.

### **1.1.3.3 Voie impliquant les canaux ioniques**

Des résultats expérimentaux suggèrent un rôle possible des canaux ioniques pouvant expliquer la survenue de dépolarisations membranaires observées en présence d'Ang-II au niveau des muscles lisses vasculaires.<sup>31</sup> Ces canaux dépendraient d'une part de l'activation du PKC. Les intervenants potentiels seraient :

- les canaux potassiques
- les canaux calciques dépendantes du voltage
- les canaux calciques dépendants des récepteurs
- les canaux chlore

### **1.1.4 Implication du SRA dans les pathologies cardiovasculaires via l'activation du récepteur AT1**

D'après de récentes analyses statistiques, les maladies cardiovasculaires (MCV) demeurent un facteur prédominant de mortalité, conduisant au décès de plus de 17 millions de personnes annuellement à travers le monde et ce, malgré les recherches intensives réalisées dans ce domaine.<sup>32</sup> Les MCV ont été décrites comme un continuum qui débute lorsque les facteurs de risques (ex. hypertension, diabète, hyperlipidémie) initient des événements pathophysiologiques conduisant à l'athérosclérose ou à l'hypertrophie du ventricule gauche, pouvant mener à l'infarctus du myocarde, au remodelage vasculaire, à la dilatation ventriculaire, à l'insuffisance cardiaque sévère et à la mort.<sup>33</sup> Le SRA joue un rôle clé dans le pathophysiologie des MCV et en conséquence est impliqué dans les

dommages causés aux divers organes à travers le continuum cardiovasculaire en contrôlant principalement les fonctions cardiovasculaires et rénales via la pression artérielle. Trois types de pathologies, soit l'hypertrophie du ventricule gauche, la fibrillation auriculaire et l'athérosclérose, qui peuvent être contrôlées par différents inhibiteurs du récepteur AT1 seront décrits ci-dessous.

### ***Hypertrophie du ventricule gauche***

L'hypertrophie du ventricule gauche (HVG) est reconnue comme un risque cardiovasculaire indépendant. En effet, l'intervention dans le processus du remodelage cardiaque pour la prévention de l'HVG est un aspect important pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Il a été démontré que les facteurs neurohormonaux et hémodynamiques peuvent initier un processus conduisant à l'hypertrophie cardiaque. Parmi les facteurs neurohormonaux, on retrouve l'adrénaline, la noradrénaline, l'endothéline, l'insuline, le TGF- $\beta$  et l'Ang-II qui sont essentiellement impliqués dans l'hypertrophie des cardiomyocytes.<sup>34, 35</sup> Parmi les facteurs neurohormonaux cités précédemment, l'Ang-II demeure le plus puissant promoteur d'hypertrophie cardiaque. Cet effet est probablement en relation avec le fait que durant l'embryogénèse l'Ang-II stimule le grossissement physiologique des myocytes par un équilibre non balancé entre la synthèse et la dégradation des protéines mais aussi par un changement d'expression des protéines intracellulaires. L'injection intraveineuse d'Ang-II chez des animaux adultes induit une hypertrophie cardiaque sévère suggérant que l'Ang-II peut provoquer une

modification de la structure cardiaque indépendamment des autres facteurs. Des études cliniques ont montré qu'un mauvais contrôle du SRA conduisant à une masse inadéquate du ventricule gauche.<sup>68</sup> Plusieurs études génétiques ont permis de constater que divers génotypes du SRA intervenaient dans le processus de l'adaptation structurelle du cœur.<sup>69-71</sup> Enfin, chez les patients présentant une sténose de l'artère rénale, liée à l'activation du SRA, l'HVG est très élevée.<sup>36</sup>

### ***Fibrillation auriculaire***

La fibrillation auriculaire (FA) est l'arythmie cardiaque la plus commune affectant plus de 5% de la population âgée de plus de 65 ans.<sup>37</sup> La FA conduit à une augmentation des risques cardiovasculaires. Elle est identifiée comme étant le principal acteur dans plus de 15% des accidents vasculaires cérébraux.<sup>38</sup> De plus, chez les personnes hypertendues, il a été démontré qu'en plus de l'hypertension, l'âge, la masse du ventricule gauche ainsi que son diamètre sont des facteurs importants causant le développement d'une FA.<sup>39</sup> Les biopsies pratiquées sur des cohortes de patients ont permis de relier la FA à l'inflammation dans laquelle le SRA joue un rôle important. En effet, la FA entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs AT1 et, réciproquement, le blocage du système diminue les processus inflammatoires.<sup>40</sup> Enfin, les statines, par leurs effets pléiotropiques tels la réduction de l'inflammation, permettent aussi de réduire le taux de FA.<sup>41</sup> L'activation du système angiotensine auriculaire joue aussi un rôle important dans les mécanismes mis en place lors de la fibrillation auriculaire, notamment ceux liés aux changements significatifs

du niveau d'expression des récepteurs, des kinases extracellulaires et des enzymes de conversion de l'angiotensine.<sup>42</sup> L'Ang-II a des effets importants sur les courants ioniques, elle entraîne une augmentation du calcium intracellulaire, change la vitesse de transport du potassium, induit la genèse passagère de différents courants et change la durée du potentiel d'action des cardiomyocytes.

### ***Athérosclérose***

Les facteurs causant des maladies cardiovasculaires classiques tels que le tabagisme, l'obésité, la dyslipidémie, l'hypertension, le stress et le diabète sont très bien établis comme responsables de l'athérosclérose vasculaire. Il a été prouvé que les mécanismes de l'inflammation vasculaire, de la génération de l'oxygène et des fonctions endothéliales sont très intimement reliés à la cascade de l'athérosclérose. De plus, les essais cliniques et fondamentaux ont démontré récemment que l'activation du SRA, donc la liaison de l'Ang-II à son récepteur AT1, est l'effecteur central pour tous ces mécanismes. Tout d'abord, l'inflammation est un des facteurs primaires causant l'athérosclérose. La présence de l'Ang-II dans les cellules sanguines a été directement reliée aux différents facteurs à hauts risques cardiovasculaires. Par exemple, l'activité leucocytaire produisant de l'Ang-II est fortement liée à la concentration du glucose plasmatique, de l'insuline plasmatique et du niveau de leptine.<sup>43</sup> En conséquence, les antagonistes de l'Ang-II agissent *in vivo* et *in vitro* pour réduire les facteurs proinflammatoires et proathérogéniques, incluant les facteurs nucléaires NFkB et les

protéines plasmatiques. La génération des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) favorisent le processus athérosclérotique. L'Ang-II stimule l'activité du NADPH et de la xanthine oxydase, qui sont des sources majeures des radicaux libres de l'oxygène dans les vaisseaux sanguins.<sup>44</sup> Comme les ions superoxyde peuvent réagir avec l'oxyde nitrique (NO), pour former le peroxyde nitrite, il est possible de prévenir l'induction du stress oxydatif par l'activation des NADPH oxydases et il en est de même pour l'activité du NO. L'endothéline joue un rôle important dans la régulation des fonctions vasculaires. Ainsi, un mauvais fonctionnement des endothélines périphériques et coronaires contribuerait à l'augmentation des événements cardiovasculaires. Enfin, il a été montré que l'Ang-II initie plusieurs mécanismes, tels que la dégradation du NO, l'augmentation des cytokines proinflammatoires et la vasoconstriction, altérant les fonctions des endothélines.<sup>45</sup>

#### **1.1.4.1 Effet de l'AT1 sur la fonction contractile**

La stimulation des récepteurs AT1 occasionne une réponse vasoconstrictrice de façon immédiate. Il s'agit d'une contraction tonique très rapide et de forte intensité liée à l'interaction des sous-unités d'actine et de myosine en réponse à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. De plus, il y a une entrée de calcium extracellulaire par les canaux de type L dépendants du voltage du à la dépolarisation membranaire et l'activation du PLC, de l'IP<sub>3</sub> et du DAG. Chez l'homme, une perfusion continue d'Ang-II augmente progressivement la pression sanguine artérielle en raison de l'activation de l'appareil contractile impliquant essentiellement les cellules musculaires

lisses avec un seuil limite atteint en l'espace de plusieurs jours. Cette réponse lente de la pression sanguine à l'Ang-II peut être associée à une diminution de la fonction natriurétique.

#### **1.1.4.2 Effet de l'AT1 sur la fonction cardiaque**

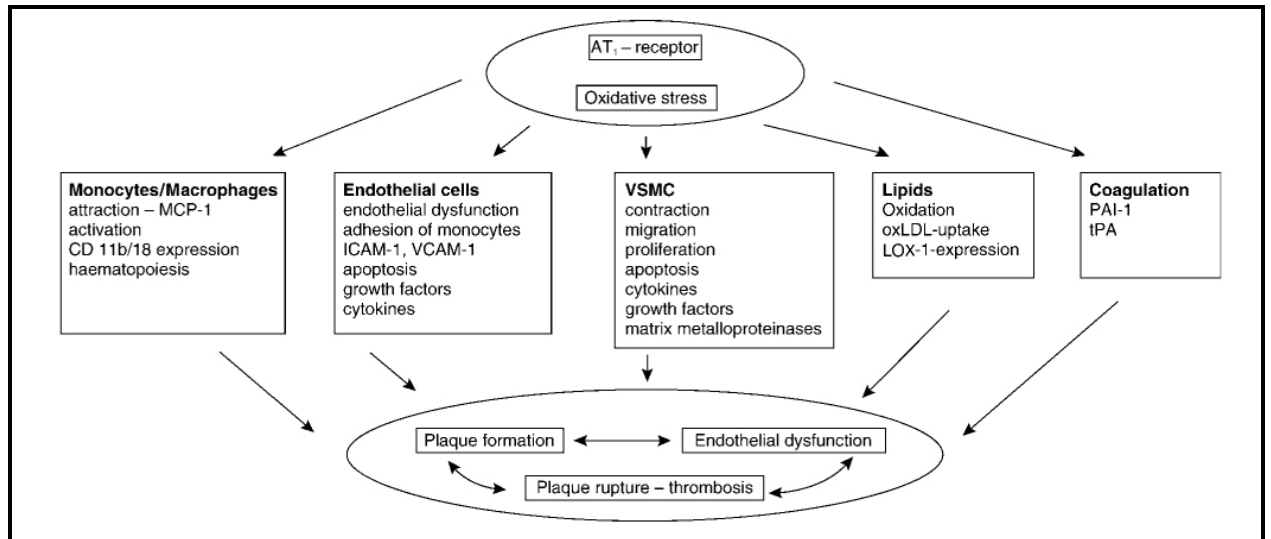
Des récepteurs AT1 sont exprimés au niveau des oreillettes et des ventricules du cœur. La densité de ces récepteurs varie dans plusieurs pathologies cardiaques. La réponse inotrope positive, en réponse à l'Ang-II, est relativement modérée et s'exerce davantage sur le tissu auriculaire que sur le tissu ventriculaire.<sup>46</sup> L'Ang-II, par l'augmentation du calcium dans les myocytes cardiaques, peut augmenter la contractilité cardiaque et, par l'augmentation du tonus sympathique et la libération de catécholamines surrénaliennes, peut indirectement augmenter la fréquence cardiaque. Les récepteurs AT1 présents au niveau du système de conduction intracardiaque peuvent être à l'origine de troubles de la conduction auriculo-ventriculaire et intraventriculaire ainsi que de l'hyperexcitabilité ventriculaire.<sup>47</sup> D'ailleurs, l'Ang-II a aussi des effets importants sur les courants ioniques, elle entraîne une augmentation du calcium intracellulaire, change la vitesse de transport du potassium, induit la genèse passagère de différents courants et change la durée du potentiel d'action des cardiomyocytes.

#### **1.1.4.3 Effet de l'AT1 sur le système cardiovasculaire**

Plusieurs données expérimentales ont validé l'importance de l'Ang-II dans les mécanismes de remodelage et d'hypertrophie cardiaque suite à la croissance et à la

prolifération de divers types cellulaires (cellules musculaires lisses vasculaires, fibroblastes et cardiomyocytes). Ces manifestations sont réversibles sous l'effet d'inhibiteurs de l'ECA et d'antagonistes de l'AT1, démontrant clairement que l'Ang-II est un facteur de croissance crucial au niveau du cœur.<sup>48</sup> Sur des cardiomyocytes néonataux, l'Ang-II cause une réponse hypertrophique avec induction de gènes précoces (c-jun, jun B, Egr 1, c-myc et c-fos), de gènes codant pour des facteurs de croissance (TGF $\beta$ ) et pour les composantes de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine et laminine). L'Ang-II provoque également la production de collagène et le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire par les fibroblastes cardiaques interstitiels et périvasculaires, suite à une fibrose cardiaque. En plus des effets cellulaires directs de l'Ang-II sur le système cardiovasculaire (Figure 1.4), il peut y avoir des changements au niveau de la précharge (rétention de Na<sup>+</sup>, expansion volumique) et de la postcharge (élévation de la pression artérielle), contribuant à l'hypertrophie et au remodelage cardiaque. Au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire, l'Ang-II augmente la synthèse protéique mais ne semble pas avoir d'effet prolifératif. Néanmoins, des effets mitogènes peuvent être mis en évidence lorsque celle-ci est associée à d'autres facteurs de croissance. *In vivo*, les effets sur la croissance cellulaire de l'Ang-II ont été étudiés sur des modèles ayant des lésions vasculaires créées par des ballonnets d'angioplastie. L'hyperplasie créée selon le modèle de désendothélisation peut être prévenue par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs AT1.





**Figure 1.4 : Effets induits par le récepteur AT1 sur divers types cellulaires**

La stimulation du récepteur par l'Ang-II active plusieurs voies de signalisation spécifiques aux cellules ciblées, entraînant des séquelles pathologiques.

De plus, l'expression de récepteurs AT<sub>1</sub> au niveau de la membrane plasmique a été démontrée chez les cellules endothéliales. L'interaction entre l'Ang-II et les cellules endothéliales pourrait expliquer les effets favorables observés chez les modèles de dysfonction endothéliale avec des bloqueurs du SRA. Dans l'hypertension induite par inhibition de la NO synthase, les modifications phénotypiques du muscle lisse vasculaire avec induction d'une infiltration par des cellules inflammatoires et fibrose ainsi qu'une hyperexpression de molécules d'adhésion (I-CAM et VCAM) sont prévenues par l'utilisation de bloqueurs du SRA.<sup>49</sup> En effet, l'interaction angiotensine-cellule endothéliale peut causer une élévation de la production de NO en stimulant la NO synthase. Cet effet endothélial permettrait théoriquement une modulation de l'action vasoconstrictive de l'Ang-II lorsque l'endothélium est fonctionnel. Cependant, l'absence

de vasodilatation endothéliale dépendant en réponse à l'Ang-II peut s'expliquer en partie par la libération de dérivés réactifs de l'oxygène qui serait responsable de la désactivation du monoxyde d'azote. Enfin, l'Ang-II peut aussi provoquer la production de l'endothéline, ce qui pourrait aussi expliquer l'effet vasoconstricteur mais également prolifératif et hypertrophique de ce peptide.<sup>50</sup>

### **1.1.5 Le récepteur AT2**

Le clonage de divers sous-types de récepteurs a permis de préciser les rôles respectifs des récepteurs AT1 et AT2 dans la transmission des effets de l'Ang-II (Tableau II). Le récepteur AT2 est présent essentiellement dans les tissus mésenchymateux du fœtus, les structures cérébrales, les reins, le poumon, le cœur, les artères et les artérioles. Même s'ils ont une similitude de 30% dans leurs séquences d'acides aminés avec le récepteur d'AT1, il est clair que l'AT2 est exprimé dans diverses conditions physiologiques et après infarctus de myocarde, lésion mécanique vasculaire au cours de l'insuffisance vasculaire ou après une lésion cutanée.<sup>8</sup>

#### **1.1.5.1 Effet de l'AT2 sur le tonus vasomoteur**

Les études avec les souris transgéniques ont permis d'éclaircir le rôle du récepteur AT2 dans le système cardiovasculaire. En effet, les souris qui n'expriment pas le récepteur AT2 ont une réponse vasopressive exagérée à l'injection de l'Ang-II, ce qui suggère que l'Ang-II dans les conditions physiologiques aurait des effets vasodilatateurs dépendantes

de l'AT2. Des travaux récents ont montré que l'activation de l'AT2 est suivie d'une vasodilatation dépendante de l'endothélium impliquant la voie du cytochrome P-450 et les acides époxyeicosatriénoïques.<sup>51</sup> L'AT2 pourrait aussi être impliqué dans la vasodilatation dépendante de l'endothélium et du débit d'artérioles mésentériques résistives de rat.

**Tableau II : Caractéristiques de deux sous types de récepteurs d'Ang-II, AT1 et AT2**

	Récepteurs de l'angiotensine II	
	<i>AT<sub>1</sub></i>	<i>AT<sub>2</sub></i>
<i>Gène</i>	at1	at2
<i>Chromosome</i>	Chromosome 3	Chromosome X
<i>Longueur de la séquence</i>	359 acides aminés (7 domaines transmembranaires)	363 acides aminés (7 domaines transmembranaires)
<i>Masse moléculaire (kDa)</i>	~46	~44
<i>Effecteur</i>	G <sub>q/11</sub>	Protéine G
<i>Médiateurs intracellulaires</i>	PLC, PLD, PLA <sub>2</sub> , Ca <sup>2+</sup> , tyrosine kinases, MAP kinases, IP <sub>3</sub>	Phosphatases, cGMP
<i>Location tissulaire</i>	Muscle lisse cardiaque, foie, cerveau, rein	Tissus reproducteurs, cerveau
<i>Effets physiologiques</i>	Vasoconstriction, prolifération cellulaire, hypertrophie cellulaire, production de superoxyde, relâchement de l'endothéline	Vasodilatation, apoptose, inhibition de la croissance, production de NO, synthèse de collagène
<i>Antagonistes</i>	Candesartan, losartan, irbesartan, tasosartan, telmisartan, valsartan	PD123177, PD123319

### 1.1.5.2 Effet de l'AT2 sur la croissance cellulaire et la fibrose

L'implication du récepteur AT2 dans le trophisme du système cardiovasculaire n'est pas encore très claire. Toutefois, des données expérimentales *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'AT2 joue un rôle crucial dans les processus physiologiques et pathologiques de croissance rapide de tissus.<sup>52</sup> Sa synthèse est activée au cours du remodelage (hypertrophie du ventricule, réendothélisation de la paroi vasculaire et cicatrisation cutanée). D'ailleurs, l'AT2 implique la voie de signalisation des tyrosine phosphatases aptes à inactiver les processus de transcription et de traduction de la cellule, ce qui suggère un rôle inhibiteur de la croissance. Les rats ayant reçu un traitement avec les agonistes d'AT2 ou ayant le gène de l'AT2 surexprimé montrent une diminution significative de l'hypertrophie. L'administration des bloqueurs de l'AT2 est associée à une augmentation de la tension artérielle et à une diminution sensible de l'hypertrophie.<sup>53</sup> Enfin, de nombreuses études ont montré l'effet protecteur des antagonistes des récepteurs AT2 sur la fibrose cardiaque et vasculaire. Ces antagonistes normalisent le contenu en collagène et en élastine de l'aorte thoracique recevant continuellement l'Ang-II.<sup>54</sup> Bref, l'activation et le blocage du SRA ont des effets trophiques cardiovasculaires indiscutables mais leur rôle doit être précisé par des études plus mécanistiques.

### **1.1.6 Blocage pharmacologique des récepteurs de l'Ang-II**

Trois moyens thérapeutiques existent actuellement afin de diminuer l'activité du SRA :

- 1) Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, l'enzyme qui transforme Ang-I en Ang-II
- 2) Les inhibiteurs de la rénine, l'enzyme limitant du système qui aboutit à la synthèse d'Ang-II
- 3) Les antagonistes des récepteurs de l'Ang-II

À l'inverse des inhibiteurs qui n'ont pas toujours un seul substrat, les récepteurs AT1 et AT2 sont très spécifiques à leurs ligands. Par exemple, les inhibiteurs de l'ECA manquent de spécificité puisque d'autres voies sont concernées. En revanche, le blocage des récepteurs de l'Ang-II, particulièrement celui d'AT1, supprime directement tous les effets possibles du SRA.

## 1.2 Système rénine-angiotensine intracellulaire

Bien que le concept d'un système de rénine-angiotensine intracellulaire (SRAi) existe depuis un certain temps, c'est seulement récemment qu'il a commencé à croître en popularité. Comme son nom l'indique, le SRAi est défini par la présence du SRA fonctionnel au sein de la cellule, y compris les composantes qui participent à la synthèse de l'Ang-II ainsi que les protéines effectrices. Le SRAi semble être spécifique aux types cellulaires ainsi qu'au stimulus. Des études récentes ont prouvé l'existence du SRAi dans les cellules du système cardiovasculaire.<sup>67, 55</sup> Ici, nous discuterons du rôle du SRAi dans le remodelage cardiovasculaire et de sa régulation dans le système local.

### 1.2.1 SRAi et remodelage cardiaque

Le remodelage cardiaque inclut le remodelage cardiaque et vasculaire, phénomènes qui peuvent se produire indépendamment l'un de l'autre. Le remodelage cardiaque est généralement défini en termes de changements dans la structure et la fonction du ventricule gauche, tandis que le remodelage vasculaire est lié à la dysfonction endothéliale, à l'hypertrophie vasculaire et à l'inflammation. Il existe plusieurs facteurs étiologiques du remodelage cardiovasculaire, l'hypertension étant le plus répandu et le plus puissant. Bien que la stimulation mécanique causée par l'hypertension artérielle active de nombreux processus cellulaires, les signaux neurohormonaux ont également un rôle majeur dans l'hypertension induite par le remodelage cardiovasculaire. L'Ang-II est l'un des facteurs

importants qui a été largement étudié et est impliqué dans plusieurs processus liés au remodelage cardiovasculaire.<sup>56</sup> Il existe d'importantes données à l'appui d'un rôle de l'Ang-II dans l'homéostasie de la pression artérielle, par l'intermédiaire du récepteur AT1 dans les reins et le système vasculaire. En outre, l'Ang-II exerce des effets directs sur la croissance des cellules cardiaques et vasculaires. Deux rapports récents ont toutefois suggéré l'absence d'un rôle direct pour l'Ang-II sur le système cardiovasculaire.<sup>57, 58</sup> Dans une des études, l'utilisation de reins de souris de type sauvage et  $AT_{1a}^{-/-}$  a permis aux chercheurs de montrer que les récepteurs AT1 dans les reins et les tissus extra-rénaux contribuent grandement au maintien de la pression artérielle. Dans la pathogenèse de l'hypertension et l'hypertrophie cardiaque induite par la perfusion systémique d'Ang-II, les récepteurs AT1 dans les reins semblent jouer un rôle critique.<sup>58</sup> Cela a été basé sur l'observation que l'Ang-II cause de l'hypertension et de l'hypertrophie cardiaque chez les animaux sauvages et aussi chez ceux qui ont des récepteurs AT1 exprimés seulement dans les reins, mais pas chez les animaux avec des récepteurs dans tous les tissus excluant les reins. Sur la base de cette étude, il a été suggéré que l'Ang-II n'a pas d'effets directs sur le système cardio-vasculaire, en l'absence d'hypertension.

En plus de l'expression d'AT1, l'état des autres composantes du SRA est pertinent. L'activité basale du SRA est très faible dans le système cardiovasculaire, mais est renforcée dans les pathologies par des stimuli tels que l'hypertension et les lésions tissulaires. Il est possible que, chez les souris avec  $AT_{1a}^{-/-}$  rénal, en raison de la désensibilisation des récepteurs AT1 dans le système cardiovasculaire et de l'absence

d'hypertension, il n'y ait pas eu de stimuli pour l'activation du SRA local. L'incapacité de l'Ang-II à produire de l'hypertrophie cardiaque dans l'étude ci-dessus pourrait être expliquée par l'absence d'activation du système. Si tel était le cas, une question logique serait de savoir si le SRA local a un rôle plus direct que l'Ang II circulant dans le remodelage cardiovasculaire.

### **1.2.2 Ang-II circulante vs Ang-II locale**

Le SRA tissulaire est caractérisé par la synthèse de l'Ang-II au niveau local et par la régulation de façon indépendante de l'Ang-II circulante.<sup>59</sup> Dans le cœur, l'expression basale des composantes du SRA est très faible, ce qui a amené certains chercheurs à remettre en question l'existence du SRA cardiaque.<sup>60</sup> Toutefois, l'activation du SRA cardiaque en réponse à des conditions pathologiques, telles que la surcharge de pression ou de volume, l'infarctus du myocarde et le diabète, a été largement démontrée dans des études expérimentales et cliniques.<sup>59</sup> En conséquence, le blocage du SRA par les inhibiteurs d'ECA et les antagonistes des récepteurs d'AT1 s'est avéré bénéfique dans plusieurs pathologies cardiaques. L'effet principal de l'activation locale du SRA sur le cœur est le développement de l'hypertrophie cardiaque et de la fibrose. Une étude récente a analysé de façon critique certains éléments qui soutiennent actuellement le point de vue du SRA en tant que médiateur direct des effets cardiaques.<sup>57</sup> Les auteurs de l'étude concluent que les effets cardiaques de l'Ang-II ne sont pas directs, mais dépendants de la pression. Cette dernière affirmation est vraie en ce sens que la pression artérielle est un puissant



stimulus pour l'activation du SRA, alors que les niveaux plasmatiques d'Ang-II ne sont pas modifiés. Il a été récemment montré que, en bloquant l'activation tissulaire de la prorénine, il y a réduction de la concentration cardiaque d'Ang-II et ce, sans aucune modification au niveau circulatoire.<sup>61</sup> La réduction cardiaque d'Ang-II a abouti à l'amélioration de l'hypertrophie cardiaque et de la fibrose, sans aucune réduction de la pression artérielle. Le peptide qui a été utilisé dans cette étude a bloqué sélectivement l'activation des prorénines tissulaires sans aucun effet non spécifique. Cette étude a clairement démontré les effets cardiaques indépendants de la pression de l'Ang-II locale. Ainsi, dans l'étude décrite précédemment, on peut prédire que, en absence d'Ang-II locale, en raison de l'absence d'hypertension ou d'autres stimuli, la perfusion exogène d'Ang-II serait inefficace. L'importance de l'Ang-II locale dans le développement d'un phénotype cardiaque a également été démontrée dans les animaux génétiquement modifiés. Les animaux qui ont été préparés pour exprimer l'AGT seulement dans le foie et le cerveau, mais pas dans le cœur, ont montré une l'hypertrophie cardiaque réduite, en comparaison avec des animaux exprimant l'AGT dans le foie, le cerveau et le cœur, et avec une pression artérielle élevée.<sup>62</sup> Plusieurs autres études utilisant des animaux transgéniques pour l'expression spécifique des AGT et d'AT1 cardiaque ont soutenu un effet indépendant de la pression du SRA cardiaque.<sup>57</sup> Il est à noter que le stimulus mécanique, comme l'hypertension, augmente l'expression cardiaque d'AGT et des récepteurs AT1. L'hypertrophie cardiaque, cependant, n'a pas été observée chez les animaux où l'expression de l'Ang-II est manipulée par la surexpression de l'ECA ou par une protéine de type artificiel. Ces deux études

semblent contredire les études antérieures démontrant un aspect méconnu du SRA, c'est-à-dire la production de l'Ang-II intracellulaire. Fait intéressant, la surexpression de l'ECA se traduit par un cumul de l'Ang-II seulement de façon extracellulaire. Ceci est en désaccord avec la surexpression d'AT1 ou d'AGT ou l'hypertension stimulée par SRA, où le site de synthèse de l'Ang-II est déterminé par des paramètres endogènes, comme la participation d'autres enzymes générant l'Ang-II (cathepsines et chymase), ce qui pourrait aboutir à la synthèse et à la localisation intracellulaire de l'Ang-II.<sup>63</sup> On peut alors se demander si le site de la synthèse locale d'Ang-II et sa destination, intracellulaire ou extracellulaire, influence les conséquences fonctionnelles de l'activation du SRA sur le système cardiovasculaire.

### **1.2.3 Synthèse de l'Ang-II : intracellulaire ou extracellulaire?**

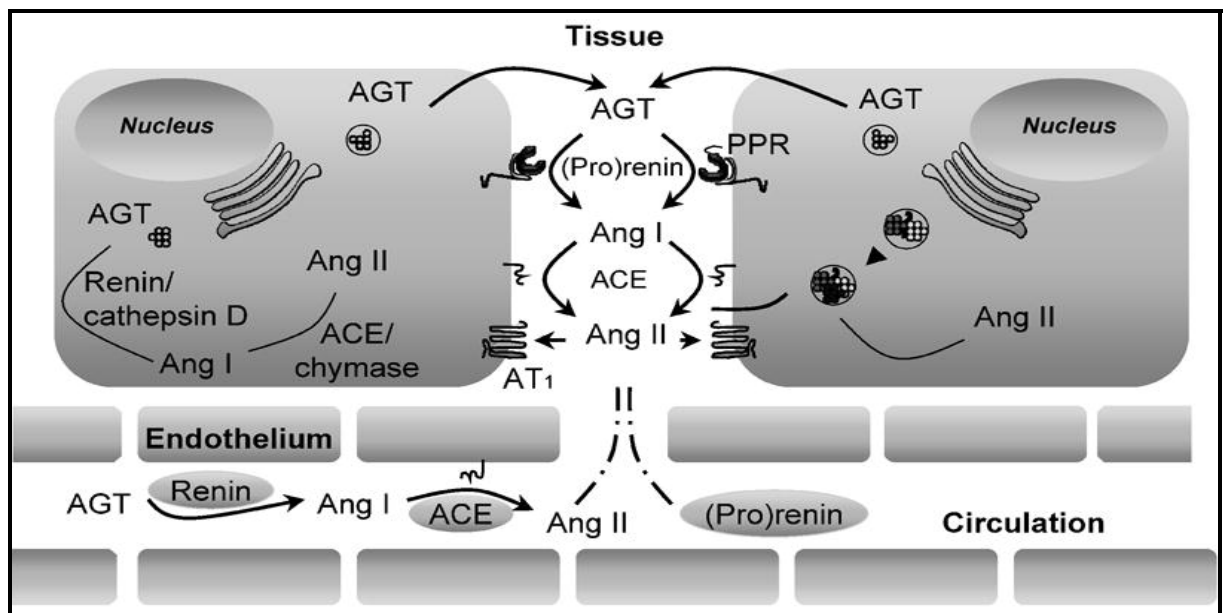
Le site de synthèse d'Ang-II dans les tissus, intracellulaire ou extracellulaire, a longtemps été débattu. Il a été récemment montré chez les cardiomyocytes et les fibroblastes de rat, que la synthèse de l'Ang-II et sa localisation dépendent des stimuli et du type cellulaire. La stimulation des myocytes par les agonistes beta-adrénergiques conduit à une augmentation de la synthèse de l'Ang-II, à la fois de façon extracellulaire et intracellulaire, qui peut être inhibée par l'inhibiteur d'ECA et l'inhibiteur de la rénine. En revanche, l'exposition des myocytes cardiaques à une hyperglycémie entraîne une augmentation marquée de la synthèse d'Ang-II, par rapport à la stimulation par l'isoprotérénol. Ces observations suggèrent que la synthèse intracellulaire se produit à

différents endroits, selon le stimulus, probablement dans des granules de sécrétion suivant la stimulation par l'isoprotérénol et dans d'autres compartiments cytoplasmiques avec la stimulation par glucose. La synthèse intracellulaire de l'Ang-II est inhibée par l'aliskiren (inhibiteur de la rénine) et la chymostatine (inhibiteur de la chymase), mais pas par le benazeprilat. Dans les fibroblastes cardiaques, l'isoprotérénol et le glucose ont des effets similaires, résultant en une synthèse intracellulaire et extracellulaire de l'Ang-II. Récemment, l'existence d'une synthèse d'Ang-III a été également montrée dans les cellules rénales ainsi que dans les cellules du muscle lisse vasculaire.<sup>54, 64</sup>

Une caractéristique importante de la synthèse de l'Ang-III est qu'elle est catalysée par la chymase, et non par l'ECA, chez les cardiomyocytes de rat, les cellules mésangiales et les cellules du muscle lisse vasculaire, à l'exception des fibroblastes cardiaques. Le fait de savoir si la voie indépendante de l'ECA constitue le principal mécanisme de synthèse d'Ang-II dans d'autres conditions pathologiques reste à déterminer même si chez l'homme, dans le cœur et la vascularisation, la chymase génère plus d'Ang-II que l'ECA. Il a été proposé que l'Ang-II générée par la chymase joue un rôle crucial dans l'hypertension et le diabète chez l'homme. L'incapacité de l'Ang-II, générée par l'ECA, de produire de l'hypertrophie ventriculaire suggère en outre l'importance des mécanismes indépendants de l'ECA et de l'Ang-III.

### 1.2.4 Importance de l'Ang-II dans les pathologies cardiaques

Les études démontrent clairement que l'Ang-II joue un rôle clé dans les physiopathologies cardiovasculaires. Outre les effets directs sur la croissance, l'Ang-II peut avoir un rôle majeur dans la régulation du SRA locales (Figure 1.5). Bien qu'il ne soit pas déterminé, l'Ang-II pourrait réguler l'expression de l'AT1, induisant le maintien soutenu des récepteurs AT1 sur la membrane cellulaire et prévoyant ainsi les réponses médiées par l'Ang-II. En l'absence de l'Ang-II, l'activité extracellulaire de l'Ang-II serait de courte durée, dû à la désensibilisation des récepteurs. Ainsi, dans les études de perfusion d'Ang-II dans le rein chez les souris déficientes en AT1 et avec surexpression de l'Ang-II et de l'ECA dans le cœur, l'absence d'action de l'Ang-II pourrait expliquer l'absence d'un phénotype hypertrophique.<sup>65</sup>



**Figure 1.5 Modèle de régulation du SRA par l'Ang-II**

Les cellules cardiaques peuvent synthétiser l'Ang-II de façon extra et intracellulaire.

Les essais cliniques comparant les bloqueurs du SRA avec d'autres antihypertenseurs n'ont pas démontré sans ambiguïté un rôle direct de l'Ang-II dans la pathologie cardiaque au-delà d'une réduction de la pression artérielle.<sup>66</sup> L'Ang-II pourrait avoir un rôle crucial dans les pathologies, car les actions de l'Ang-II ne sont pas bloquées par des inhibiteurs de l'ECA ou des récepteurs de l'angiotensine, en raison d'une impossibilité pour ces médicaments soit d'entrer dans la cellule, soit de bloquer les voies alternatives de synthèse d'Ang-II et de ses actions. Possiblement, la majorité des avantages cliniques de la thérapie des inhibiteurs du SRA peuvent être liés aux mécanismes non médiés par le SRA. Des inhibiteurs plus spécifiques de la rénine qui auraient la possibilité de bloquer à la fois la génération d'Ang-II intra- et extracellulaire, pourraient fournir un traitement plus efficace, mais aussi permettraient une compréhension plus adéquate des effets cardiaques de l'Ang-II.

## 1.3 Résumé des connaissances et buts de l'étude

### 1.3.1 Connaissances sur le sujet

1. L'Ang-II en activant les des récepteurs AT1 et AT2, qui se localisent au niveau de la membrane plasmique, joue un rôle physiopathologique dans l'hypertrophie cardiaque, l'infarctus du myocarde, l'hypertension et l'athérosclérose.
2. Des études *in vitro* ont caractérisé la synthèse intracellulaire de l'Ang-II, dont la production est principalement médiée par la chymase.
3. L'Ang-II a également des effets biologiques à l'intérieur de la cellule (intracrine), dont certains ne sont pas inhibés par les bloqueurs des récepteurs de l'Ang-II.
4. Il existe des évidences illustrant que les ligands des RCPG (l'insuline, les facteurs épidermiques de croissance, les facteurs nerveux de croissance, le  $\beta$ -interféron, l'endothéline-1, les ligands beta et alpha adrénergiques, et la prostaglandine) se situent dans la région périnucléaire ou sur la membrane nucléaire.

### **1.3.2 Hypothèses et objectifs de l'étude**

Basée sur les diverses connaissances précédemment décrites, l'hypothèse de la présente étude était : “ Chez les cellules cardiaques, la présence des récepteurs de l'Ang-II, AT1 et AT2 au niveau de la membrane de l'enveloppe nucléaire entraîne, à la suite de son activation par l'Ang-II endogène, des effets biologiques responsables du remodelage cardiaque”.

Considérant le rôle majeur du système de rénine-angiotensine dans la régulation du fonctionnement / dysfonctionnement du cœur, les objectifs de la présente étude étaient de déterminer l'existence intracellulaire des deux sous-types de récepteurs de l'Ang-II, leur localisation et les conséquences fonctionnelles associées à leur activation par l'Ang-II dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat.

## **Chapitre 2: Article scientifique**

# **A Potential Role for Nuclear-delimited Signaling via Nuclear-Envelope Angiotensin Receptors in the Control of Cardiac Gene Expression**

Artavazd Tadevosyan, Ange Maguy, Louis R. Villeneuve, Judith  
Babin, Arnaud Bonnefoy, Bruce G. Allen, Stanley Nattel

**Short title:** Nuclear envelope angiotensin receptors

**Word Count:** 5999

**Subject codes:** [128] ACE/Angiotensin receptors, [142] Gene expression, [147] Growth factors/cytokines

---

Department of Medicine, Montreal Heart Institute and Université de Montréal (A.T., A.M., L.R.V., J.B., A.B, B.G.A, S.N.), and Department of Pharmacology and Therapeutics (B.G.A, S.N.), McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Address for correspondence: Stanley Nattel, 5000 Bélanger Street East, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada



## ABSTRACT

Angiotensin-II (Ang-II) from extracardiac sources and intracardiac synthesis regulates cardiac homeostasis, with mitogenic and growth-promoting effects largely due to altered gene expression. Here, we assessed the possibility that angiotensin-1 (AT1R) or angiotensin-2 (AT2R) receptors are located on the nuclear envelope and mediate effects on cardiomyocyte gene expression. Western blot tests of nucleus-enriched rat heart fractions indicated the presence of AT1R and AT2R proteins that preferentially copurified with a nuclear-membrane marker (Nup 62) but not markers of plasma (Calpactin I), Golgi (GRP 78) or endoplasmic reticulum (GM130) membranes. Confocal microscopy revealed AT1R and AT2R proteins on nuclear membranes. Microinjected Ang-II preferentially bound to nuclear sites of isolated cardiomyocytes.  $Ca^{2+}_i$ -recordings on nuclear preparations revealed AT1R-mediated  $Ca^{2+}$ -release. AT1R and AT2R ligands enhanced *de novo* RNA synthesis in isolated cardiomyocyte nuclei incubated with [ $\alpha^{32}P$ ]UTP (e.g. 16.9±0.5 cpm/ng DNA control vs. 162.4±29.7 cpm/ng DNA Ang-II, 219.4±8.2 cpm/ng DNA L-162313 (AT1), 126.5± 8.7 cpm/ng DNA CGP42112A (AT2),  $P<0.001$ ). Ang-II application to isolated cardiomyocyte nuclei enhanced NF $\kappa$ B mRNA-expression, a response that was suppressed by co-administration of valsartan or PD123177. Dose-response experiments with Ang-II applied to purified nuclei vs. whole cardiomyocytes showed a greater increase in NF $\kappa$ B mRNA levels at saturating concentrations with ~3 fold greater affinity (EC50 values 9 vs. 28 pmol/L, respectively), suggesting preferential nuclear signaling. We conclude that cardiac nuclear membranes possess angiotensin-receptors that couple to nuclear signaling

pathways and regulate transcription. Signaling within the nuclear envelope (e.g. from intracellularly synthesized Ang-II) may play a role in Ang-II-mediated changes in cardiac gene-expression, with potentially important mechanistic and therapeutic implications.

**Key Words:** angiotensin II, angiotensin receptor subtypes, nuclear envelope, gene regulation, transcription, remodelling

## INTRODUCTION

Ang-II is implicated in the regulation of cardiac contractility, impulse propagation, cell proliferation and communication through the activation of specific heptahelical membrane-spanning G-protein coupled receptors (GPCRs). Blockers of the renin-angiotensin system (RAS) are widely used in the treatment of hypertension and heart failure.<sup>1-3</sup> There is increasing evidence that RAS components can act intracellularly.<sup>4-6</sup> Extracellular signaling peptides could operate internally following internalization. Alternatively, intracellular action could occur via production of Ang-II within target cells.

Neonatal cardiac myocyte stimulation by high concentrations of glucose or isoproterenol results in the intracellular synthesis and nuclear trafficking of Ang-II.<sup>7</sup> Serum-deprived cardiomyocytes release angiotensin into the culture medium and Ang-II concentrations increase 100-fold upon mechanical stretch.<sup>8</sup> Internalization of pro-renin into cardiomyocytes leads to the generation of intracellular angiotensin independently of glycosylation.<sup>9</sup> Introduction of Ang-II inside the cell has important effects on transmembrane calcium currents, on cardiomyocyte conductance and potentially on the pathogenesis of cardiac arrhythmias.<sup>10</sup> Intracellular Ang-II binding sites have been imaged in renal and hepatocyte nuclei, but whether those receptors represent internalized plasma membrane receptors or a genuine new class of Ang-II receptors (ATRs) remains unclear.<sup>11,12</sup> Despite Ang-II's fundamental role in the regulation of heart function and gene expression, a direct demonstration of functional ATRs inside cardiac cells is lacking.

Accordingly, the current study investigated the subcellular distribution of type 1 and 2 ATRs (AT1Rs, AT2Rs respectively) in native ventricular cardiomyocytes, with particular attention to the nuclear envelope, and assessed evidence for a potential functional role of such intracellular receptors.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and Antibodies

The following antibodies were used for immunoblotting: AT1R, AT2R (Alomone Labs); calpactin I, GM 130, GRP 78 (BD Biosciences) and nucleoporin 62 (ABCAM) (see on-line Table I for more details). All the secondary antibodies used for Western and immunostaining experiments were from Jackson ImmunoResearch Laboratories. Candesartan was kindly provided by AstraZeneca and valsartan by Novartis. The primers for quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) assays were purchased from SuperArray/Invitrogen. Unless otherwise specified, all reagents were of molecular biology grade and obtained from Fisher or Sigma-Aldrich.

### Isolation of Cardiomyocytes

Male Wistar adult rats (200-300g) were anesthetized with a combination of ketamine/xylazine (10 mg/kg body weight i.p.) and treated with heparin (1.0 U/kg body wt). All animal-handling procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute and the procedures complied with guidelines established in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication 65–23, revised 1996). Left-ventricular cardiomyocytes were isolated using a Langendorff-perfusion system. The hearts were cannulated via the aorta and *in situ* retrograde perfusion of the coronary arteries was started with 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  in Tyrode solution containing

140 mmol/L NaCl, 5.5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mmol/L HEPES and 10 mmol/L dextrose adjusted to pH 7.5 with NaOH. After perfusion for 3 min with tyrode solution at 6 ml/min, the hearts were perfused for 5 min with the same solution minus Ca<sup>2+</sup>. Subsequently, hearts were enzymatically digested with Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode solution containing 0.5 mg/ml type II collagenase for approximately 45 min. When the heart softened, the left ventricle was minced into small pieces in Kraftbrue medium (20 mmol/L KCl, 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mmol/L glucose, 40 mmol/L mannitol, 70 mmol/L L-glutamic acid, 10 mmol/L β-hydroxybutyric acid, 20 mmol/L taurine, 10 mmol/L EGTA and 0.1% albumin pH 7.4, NaOH). All solutions were constantly aerated with 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>, and solutions and cells were kept at 37 °C throughout the isolation process. Ca<sup>2+</sup>-tolerant, rod-shaped ventricular cardiomyocytes (75 to 90% of all cells) were used on the day of isolation for immunohistochemistry or snap-frozen at -80 °C for subsequent biochemical studies. Canine cardiomyocytes were isolated as previously described.<sup>13</sup>

### **Isolation of Nuclei**

Nuclear isolation was performed according to a modified version of a previously-described method.<sup>14</sup> Briefly, rat hearts were manually ground into a powder under liquid nitrogen, resuspended in cold phosphate-buffered saline (PBS) (137 mmol/L NaCl, 10 mmol/L phosphate, 2.7 mmol/L KCl with a final pH of 7.4, NaOH) and homogenized with a Polytron. The total extract was labelled Fraction A. The subsequent steps were carried out on ice or in a cooling cabinet at 4 °C. Homogenates were centrifuged at 1400×g for 15

min and the supernatant, denoted Fraction B, was diluted 1:1 with buffer A (10 mmol/L K-HEPES, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 25 µg/ml leupeptin, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> with a final pH of 7.4, NaOH), incubated for 10 min on ice and re-centrifuged at a higher speed (3500×g) for 15 min. The resulting supernatant was discarded and the pellet, containing crude nuclei (designated Fraction C) was resuspended in buffer B (0.3 mol/L K-HEPES, 1.5 mol/L KCl, 0.03 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 25 µg/ml leupeptin, 0.2 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> at a final pH of 7.4, NaOH), incubated on ice for 10 min, and centrifuged for 30 min at 5000×g. The pellet, comprising a nuclear-enriched fraction (designated Fraction D), was resuspended in buffer C (20 mmol/L Na-HEPES, 25% (volume/volume) glycerol, 0.42 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mmol/L DTT, 25 µg/ml leupeptin, 0.2 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> at a final pH of 7.4, NaOH) or 1× transcription buffer (see below) and either used freshly or aliquoted, snap-frozen with liquid nitrogen, and stored at -80 °C. Protein concentrations were determined by Bradford assay using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Wilmington, Delaware).

### **Immunoblot Analysis**

Isolated proteins (Fractions A, B, C and D) were separated by sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) with 8% (w/v) acrylamide running gels and 4% (w/v) acrylamide stacking gels. Proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes at 300 mA and 4 °C for 60 min in a transfer

buffer consisting of 25 mmol/L tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-base), 192 mmol/L glycine and 20% (v/v) ethanol. The membranes were blocked for 120 min with a solution of non-fat dry milk 5% (w/v) and 0.1% (v/v) Tween 20 blocking agent in PBS at ambient temperature. Following blocking, membranes were incubated with the primary antibody overnight at 4 °C with continuous mixing (on line Table 1). The following day, membranes were washed (4×12 min) with a solution containing 0.5% (w/v) skimmed milk powder and 0.1% (v/v) Tween 20 in PBS, then incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (60 min at room temperature). Membranes were thoroughly washed with PBS-Tween 20 (4×12 min) and immunoreactive bands revealed using Enhanced Chemiluminescence Reagent (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, Massachusetts) in conjunction with Bio-Max MR film. Preliminary experiments were performed to establish exposure times that avoided film saturation and permitted quantification. To ensure equal protein loading, blots were stripped and stained using Ponceau S (0.5% Ponceau S, 1% glacial acetic acid, in deionized water). Immunoblots were scanned (1200 dpi) and band intensities quantified with Quantity One 1D analysis software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

### **Confocal Microscopy and Deconvolution**

Freshly-isolated cardiomyocytes were plated on 18-mm laminin (10 µg/ml)-coated coverslips for 60 min (37 °C, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>), fixed with 2%-paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with blocking buffer comprising 2% normal donkey serum (NDS)



and 0.2% (v/v) TX-100 (TX-100) in PBS for 60 min. After extensive washing to remove the excess serum, cells were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody diluted in PBS buffer containing 1% NDS and 0.05% TX-100. Coverslips were then rinsed several times with PBS and incubated for 60 min at room temperature with secondary antibody (Alexa 488 conjugated anti-rabbit antibody or Alexa 555-conjugated anti-mouse antibody diluted in 1% NDS and 0.05% TX-100). After final washing with PBS, coverslips were mounted and fixed on glass slides with drop of a mixture containing 0.1% diazabicyclo(2.2.2)octane (DABCO)/glycerol. Fluorescence images were acquired using a Zeiss LSM 510 confocal fluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Composite images were created using Zeiss LSM510 software. For every secondary antibody, control experiments were performed omitting the primary antibody to confirm the specificity of the primary antibody. Nuclei were visualized using TO-PRO-3 nucleic acid stain (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Image stacks were digitally deconvolved (0.01% threshold, lowest background and real signal/noise values) for 25 iterations to reduce out-of-focus light using the Maximum Likelihood Estimation algorithm and the appropriate experimentally-determined point spread function with Huygens Professional compute engine 3.1.0p1 (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands). Files were stored in *ICS* format and exported to PowerPoint (Microsoft, Redmond, Washington).

### **[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP RNA Transcription Assay**

Transcription initiation assays were performed using freshly isolated nuclei as previously described.<sup>15</sup> A mixture of nuclei (treated with ligand where indicated), transcription buffer (50 mmol/L Tris, 0.15 mol/L KCl, 1 mmol/L MnCl<sub>2</sub>, 6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L ATP, 2 mmol/L DTT, 1 U/ $\mu$ L RNase inhibitor, pH adjusted to 7.4 with NaOH) and [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] UTP were incubated for 30 min at 30 °C. CTP and GTP were omitted to prevent chain elongation. Following treatment with DNase (10U/ $\mu$ l), nuclei were solubilized (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA and 1% SDS), aliquots transferred onto Whatman GF/C glass fibre filters (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), washed with 5% trichloroacetic acid (TCA), and air-dried. <sup>32</sup>P incorporation was measured by Cerenkov counting in  $\beta$ -counter. The DNA concentration was determined spectrophotometrically and <sup>32</sup>P-incorporation is expressed as dpm/ng DNA.

### **RNA Extraction, Reverse Transcription, and Real-time PCR**

Total RNA was extracted from nuclei using the TRIzol method (Invitrogen) after homogenization with a motor-driven mixer. The concentration, quality and purity of total RNA were determined using a BioAnalyzer (Genome Quebec, Montreal, Quebec, Canada). Total RNA was treated with DNase 1 (10 U for 15 min at 37 °C) to remove potential contamination by genomic DNA. cDNA templates for PCR amplification were synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA with a reverse transcriptase kit (SuperArray, Frederick, MD).

Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using SuperArray SYBR PCR kits and a Stratagene *MX3000P* qPCR system. Quantitative measurements were performed in triplicate and normalized to the average of three housekeeping internal controls (GAPDH, B2m, Hspcb). All reactions included 2  $\mu$ l of cDNA and 0.5  $\mu$ mol/L primers. Standard curves were made from 10-fold serial dilutions of cDNA pools containing high concentrations of the gene of interest. Data was collected and analyzed using the MX3000p software. Relative gene expression was calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method.<sup>16</sup> The sequences of primers used for qPCR are shown in on-line Table II.

### **Intracellular Calcium Imaging**

Ca<sup>2+</sup>-transients were measured on isolated nuclei with the ratiometric calcium indicator fura-2/AM (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). Freshly isolated nuclei were incubated on ice for 45 min with 7.5  $\mu$ mol/L Fura-2/AM in a loading buffer containing 25 mmol/L HEPES, 100 mmol/L KCl, 2 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>. After an initial loading period, nuclei were washed to remove non-incorporated Fura-2/AM and were then added to a 50- $\mu$ L loading buffer containing 800 nmol/L CaCl<sub>2</sub> and seeded onto glass slides. Ang-II, the AT1 agonist P162313, the AT2 agonist CGP42112A, or vehicle (dimethylsulfoxide, DMSO) were added to the nuclei. Where indicated, selective antagonists candesartan (AT1R) or PD123177 (AT2R) were also included. A microspectrofluorimeter (IonOptix, Milton, Massachusetts) was used for fluorescence measurements. Excitation wavelengths were 340 and 380 nm, fluorescence emission was

detected at 509 nm and was expressed as the ratio of the two excitation wavelengths ( $F_{340}/F_{380}$ ). The amplitudes of  $\text{Ca}^{2+}$ -transients were calculated by subtraction of the baseline  $F_{340}/F_{380}$  ratio from peak values.  $\text{Ca}^{2+}$ -concentrations were determined by calibrating the fluorescent signal by sequential addition of 9  $\mu\text{mol/L}$  ionomycin plus 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  to obtain the maximal fluorescence ratio ( $R_{\text{max}}$ ) and 4 mmol/L EGTA to obtain the minimum fluorescence ratio ( $R_{\text{min}}$ ). Autofluorescence was determined by subtracting fluorescence from non-loaded nuclei and from the fluorescence produced by fura-2-loaded nuclei.

### **Statistical Analysis**

For each set of experiment, at least five independent experiments were performed. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ANOVA with Tukey's post-hoc test was used for statistical comparison. A P-value  $<0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### **Endogenous AT1 and AT2 Receptors Localize to the Nucleus**

To examine the intracellular localization of AT1 and AT2 receptors, we isolated membrane, cytosolic and nuclear fractions from adult rat hearts. This cellular fractionation was validated by Western blots for calpactin I (cell membrane, 38 kDa), GRP 78 (endoplasmic reticulum, 78 kDa), Nup62 (nuclear pore central plug, 62 kDa), and GM130 (Golgi cisternae, 130 kDa) respectively (Fig. 1A). Both AT1R (~43 kDa) and AT2R (~47 kDa) immunoreactivity was detected in the crude-cell fraction A, as were calpactin I, GRP 78 and GM130. After further purification steps, the final nuclear fraction D was enriched in nucleoporin 62 (Nup62), AT1R and AT2R immunoreactivity, but significantly depleted of calpactin I, GRP 78 and GM130. Figure 1B shows mean intensities of the various bands in fractions B and D as a ratio of calpactin I in fraction A, and demonstrates the substantial reduction in non-nuclear markers (GRP78, GM130) and increase in the nuclear (Nup 62) and AT1R/AT2R markers in the nuclear-enriched preparation. The morphological and biochemical properties of freshly isolated rat heart nuclei were analyzed as shown in Figure 1C. Low-magnification phase-contrast microscopic imaging reveals the integrity of the nuclei, with intact nuclear envelope surrounding each nucleus. The freshly-isolated nuclei were stained by propidium iodide (middle panel), a fluorescent dye that binds only to double-stranded nucleic acids. Finally, very high concentrations of DNA were found in the isolated nuclei (nuclear:  $1233 \pm 40$  ng/ $\mu$ l vs. cytoplasmic supernatant:  $159 \pm 19$  ng/ $\mu$ l,

$P < 0.001$ ,  $n = 10/\text{group}$ ; Fig. 1D). These data confirm that both AT1R and AT2R are present in freshly-isolated cardiac nuclei.

To further investigate the subcellular localization of ATRs, we used confocal immunofluorescence microscopy with deconvolution to image isolated adult rat ventricular cardiomyocytes decorated with antibodies against AT1R and AT2R, as illustrated Figures 2 and 3. AT1R and AT2R antibodies revealed a striated pattern within the cell consistent with presence at the T-tubular network and surface membranes (Fig. 2A). Immunofluorescence was also observed around the nucleus in AT1R stained myocytes. Panel B shows the same cardiomyocyte stained for Nup62 and panel C indicates extensive colocalization, more clearly evident in the higher-power image in the inset. Similar results to those shown in Figure 2 were obtained in 40 cardiac cells examined from 10 rats. No signal was observed in cells where the primary antibody was omitted. Results similar to those obtained for AT1Rs were also obtained with AT2Rs (Fig. 3), in 30 cells examined from 10 rats. Both AT1R and AT2R nuclear staining were observed in cardiomyocytes isolated from normal canine hearts.

### **Differential Subcellular Trafficking of Ang-II: Extracellular Versus Intracellular Injection**

Figure 4 shows *in vitro* fluorescence imaging of intracellular Ang-II distribution after extracellular administration to freshly isolated cardiomyocytes. Ang-II labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) was applied extracellularly. High-resolution images

were then acquired by confocal microscopy at 5-min intervals. A 60-min time course confirmed the trafficking of Ang-II inside the cell, without any clear specificity for the nucleus. FITC-labeled Ang-II trafficking was significantly changed by the AT1R antagonist valsartan (10  $\mu\text{mol/L}$ ). These data suggest that ATRs in the nuclear membrane are not a result of endocytosis.

We then microinjected fluorescently-labeled Ang-II into the cytoplasm of single cardiomyocytes to analyze the intracellular distribution of Ang-II (Eppendorf Femtojet 1 nmol/L Ang-II in 50 to 75 flu per cell), as shown in Figure 5A. Although FITC-Ang-II rapidly diffused throughout the cytoplasm (Fig. 5B-D), the fluorescence was enriched or sequestered in the perinuclear region of injected cells 10-20 seconds after microinjection. The fluorescence decreased rapidly after 20 seconds and disappeared within 30 seconds. At no time was fluorescence detected in cells neighboring the microinjected cell, suggesting that the distribution observed in injected cells did contain a contribution from FITC-Ang-II which had exited the cell, bound to cell-surface receptors, and been endocytosed. Similar results were obtained in 10 microinjected cells. These data suggest that nuclei have higher density of specific Ang-II binding sites than do other subcellular structures.

### **Nuclear Ang-II Receptors Regulate Transcription**

$\beta$ -adrenergic receptors were recently shown to stimulate [ $^{32}\text{P}$ ]UTP incorporation in isolated nuclei.<sup>17</sup> To determine whether nuclear ATRs are able to control transcription, freshly isolated nuclei were incubated with [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]UTP in addition to ATR ligands and

antagonists. Ang-II, L162,313 (AT1R-selective agonist), CPG42112A (AT2R-selective agonist), candesartan (AT1R-selective antagonist) and PD123177 (AT2R-selective antagonist) were added directly to the incubation medium (Fig. 6A). Both non-selective and subtype-specific agonists increased the synthesis of RNA, although stimulation with an AT1R-agonist produced a greater response than with the AT2R-agonist ( $219 \pm 8$  CPM/ng DNA vs.  $127 \pm 9$  CPM/ng DNA,  $N=6/\text{group}$ ,  $p < 0.001$ ). Both AT1R and AT2R antagonists significantly reduced the ability of Ang-II to enhance transcription.

To determine whether the activation of heterotrimeric G proteins are involved in coupling ATRs within the nuclear membrane to transcription, freshly isolated nuclei were pre-treated for 120 min with pertussis toxin (PTX). Pretreatment of isolated nuclei with PTX blocked the ability of Ang-II to increase *de novo* RNA synthesis (Fig. 6B). Thus  $G_i$  is involved in coupling Ang-II receptors to transcription.

Ribosomal RNA (rRNA) constitutes the most abundant form of RNA. To determine if stimulation of ATRs on nuclear membranes alters the abundance of rRNA following stimulation of isolated nuclear preparations, total RNA was resolved on 2% agarose gels and visualized by staining with ethidium bromide. Ang-II increased rRNA levels (Fig. 6C). Overall, Ang-II increased the signal strength (18S and 28S) to  $1.41 \pm 0.05$  O.D compared to  $0.9 \pm 0.04$  O.D in control ( $N=6/\text{group}$ ,  $p < 0.01$ ). The Ang-II effect was attenuated by valsartan, which reduced signal strength to  $0.99 \pm 0.05$  O.D. ( $N=6$ ,  $P < 0.05$ ).



### **Nuclear Ang-II Receptors Regulate NFκB Gene Expression**

Studies have shown that Ang-II is implicated in the activation of various nuclear transcription factors, including NFκB.<sup>18</sup> To determine the potential role of nuclear ATRs in the control of transcription factors, we treated isolated cardiomyocytes and purified nuclei with different concentrations of Ang-II. Following RNA isolation, the expression of NFκB was assessed by qPCR and normalized to the average of three housekeeping genes, beta-2 microglobulin (B2m), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and heat shock protein 90 kDa alpha, class B member (Hspcb). The primer sequences are provided in on-line Table II. Figure 7A shows dose-response curves obtained from application of Ang-II to whole cells (extracellular) or nuclear preparations for 120 min. The half-maximal concentration, EC<sub>50</sub>, required for the effect of Ang-II on NFκB expression were 28 pmol/L and 9 pmol/L for extracellular and for nuclear administration, respectively (N=6/dose/group). There was a significantly greater increase in NFκB mRNA expression following Ang-II application to nuclear preparations versus extracellular application to isolated cardiomyocytes. Preincubation of nuclei with valsartan (10<sup>-6</sup> mol/L) or PD123177 (10<sup>-6</sup> mol/L) prior to Ang-II addition administration reduced the Ang-II-induced increase in NFκB mRNA abundance (65% and 79% inhibition, respectively, versus Ang-II alone ; n=5/group, p<0.05, Figure 7B).

### **Nuclear Ang-II Receptors Regulate Intranuclear Calcium Transients**

The nuclear envelope serves as a pool for calcium and has been proposed to regulate nuclear calcium signals.<sup>19</sup> Several mechanisms for generating  $\text{Ca}^{2+}$ -transients in the nucleus have been identified.<sup>20</sup> The effect of ATR-agonists on nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration was examined in freshly isolated nuclei using the ratiometric fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, Fura-2/AM. Exposure to vehicle did not alter nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ -signals (Fig. 8A). Exposure of nuclei to Ang-II (10  $\mu\text{mol/L}$ ) produced a prompt increase in  $[\text{Ca}^{2+}]$ . In the example trace shown in Figure 8B, luminal  $[\text{Ca}^{2+}]$  rose from a baseline value of 113 nmol/L to 366 nmol/L, followed by a rapid return to 75% above baseline values and a much slower decrease thereafter (Fig. 8B). The AT1R-selective agonist L162,313 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) also caused an intranuclear  $\text{Ca}^{2+}$ -transient (Fig. 8C), and the Ang-II response was prevented by co-administration with the AT1R-inhibitor candesartan 10  $\mu\text{mol/L}$  (Fig. 8D). Unlike AT1R-selective agonists, administration of the AT2R-agonist CGP42112A (10  $\mu\text{mol/L}$ ) failed to elicit a nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  response (Fig. 8E) and the AT2R-antagonist PD-123177 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) was unable to prevent an Ang-II mediated  $\text{Ca}^{2+}$  rise. Overall mean data (N=6/group) are summarized in Figure 8G, indicating a significant increase in nuclear  $[\text{Ca}^{2+}]$  with AT1R agonists, that is blocked by an AT1R-antagonist. AT2R-selective agonists produced no significant change in  $[\text{Ca}^{2+}]$ , nor did antagonism of AT2R significantly attenuate the response to Ang-II.

## DISCUSSION

### Main Findings

In the present study, we examined the subcellular localization of Ang-II receptors and their functionality in adult rat ventricular cardiac myocytes. Our data indicate that both AT1R and AT2R localize to and signal at the nuclear envelope, and that this localization is not a result of post-endocytotic trafficking. We also found that nuclear AT1Rs and AT2Rs mediate *de novo* RNA synthesis in a Gi-dependent manner, affecting the abundance of both rRNA and NFκB mRNA. In contrast, only AT1Rs induce Ca<sup>2+</sup> transients in isolated nuclei.

### Relation to Previous Studies of GCPR Nuclear Receptors

Classically GPCRs, which comprise the largest protein superfamily in the human genome, are thought to induce intracellular effects via downstream signaling pathways from the plasma membrane.<sup>21,22</sup> In recent years, we and others have confirmed that endothelin,<sup>15</sup> β- and α-adrenergic ligands,<sup>17,23</sup> prostaglandin E<sub>2</sub><sup>24</sup> receptors, in addition to the signaling molecules associated with many GPCRs, including adenylyate cyclase (AC)<sup>25</sup>, G-protein coupled receptor kinases (GRK)<sup>26,27</sup>, phospholipase proteins (PL)<sup>22</sup>, Gi, Gs, and Gq, are present on the nuclear/perinuclear membranes in a constitutive manner, independent of agonist stimulation. Determining the subcellular localization of proteins provides crucial information concerning their function and their interaction with other

molecules in a specific microenvironment, and thus represents a critical step in genome annotation.

The data in the present paper suggest that Ang-II stimulates nuclear receptors to induce transcriptional responses in a  $G_i$ -dependant manner, similar to previous observations for cardiac nuclear  $\beta$ -adrenoceptors.<sup>17</sup> We found that Ang-II increases  $[Ca^{2+}]_i$  in nuclear-enriched preparations via AT1Rs. Intracellular Ang-II increases nuclear  $[Ca^{2+}]_i$  in vascular smooth muscle cells (VSMCs), an effect that is blocked by intracellular but not extracellular AT1R-blockade.<sup>28</sup> Intracellular application of Ang-II increases cell- $[Ca^{2+}]_i$  in A7r5 VSMCs lacking extracellular ATRs, an effect prevented by AT1R- but not AT2R-blockers.<sup>29</sup> Nuclear  $Ca^{2+}$ -signaling appears to be an important regulator of gene-transcription, particularly in neurons,<sup>30</sup> and IP3-receptors are involved in nuclear  $Ca^{2+}$ -signaling in a muscle cell line.<sup>31</sup> Our observation of nuclear AT1R-selective effects to increase nuclear  $[Ca^{2+}]_i$  suggests a potential role for AT1R-mediated nuclear  $Ca^{2+}$  changes in transcriptional responses. The degree of P-UTP<sup>32</sup> incorporation-enhancement was greater with nuclear-preparation application of the AT1R-agonist L162,313 than with the AT2R-agonist CGP42112A (Figure 6A), consistent with the notion that AT1R-related  $Ca^{2+}$ -dependent nuclear signaling may participate in transcriptional responses. However, clearly the Ang-II-related transcriptional response does not depend solely on increased nuclear  $[Ca^{2+}]_i$ , because Ang-II induced rRNA (Figure 6C) and NF $\kappa$ B (Figure 7B) RNA expression-changes were sensitive to both AT1R and AT2R-blockade. Further work will

be needed to characterize how Ang-II induces nuclear  $[Ca^{2+}]_i$ -responses and to define nuclear  $[Ca^{2+}]_i$ -sensitive and insensitive transcriptional-control pathways.

### **Evidence for a Role of Intracellular Ang-II Signaling**

The implication of an intracellular renin-angiotensin system in biological responses has long been debated. Ichihara *et al.* demonstrated the existence of nonproteolytically-activated intracardiac prorenin and elevated tissue angiotensin II concentrations, which produced end-organ damage despite prevention of systemic renin-angiotensin activation.<sup>32</sup> By contrast, the prevention of intracellular prorenin-activation fully prevented cardiac fibrosis, despite the maintenance of systemic renin-angiotensin activation and severe hypertension.<sup>32</sup> Mice engineered to lack intracardiac angiotensinogen lack cardiac hypertrophy and fibrosis despite hypertension comparable with similarly-hypertensive control mice.<sup>33</sup> In a rat VSMC-line (A7r5) devoid of plasma membrane ATRs, intracellular (liposome-based) Ang-II delivery enhances cell proliferation whereas extracellular Ang-II has no effect, with intracellular Ang-II responses suppressed by intracellular application of AT1R or AT2R-blockers.<sup>29</sup> Enhancement of intra-cardiomyocyte Ang-II release from a transgenic fusion protein causes deleterious myocardial remodelling and functional deterioration post-myocardial infarction in the absence of systemic Ang-II changes.<sup>34</sup> In summary, there is evidence for a specific role of intracellular Ang-II signalling in cardiovascular remodelling. Our data, which indicate that AT1Rs and AT2Rs are present in cardiomyocyte nuclei and that Ang-II induces AT1R and AT2R-mediated transcriptional

responses in purified nuclear preparations, suggest that nuclear ATRs may be important mediators of intracellular Ang-II effects on the heart.

### **Potential Role of Nuclear AT1 and AT2 Receptors in Cardiac Remodeling**

Ang-II is an important signaling molecule for cardiac remodeling, although there remains uncertainty over whether cardiac Ang-II signaling alone is enough to induce remodeling or whether Ang-II actions conspire with stressors (like hypertension and excess hemodynamic load) to induce remodeling.<sup>35</sup> Overexpression of AT1Rs is a much more potent stimulus to cardiac remodeling than Ang-II overproduction, suggesting that receptor density may be the limiting factor for Ang-II-related remodeling.<sup>35</sup> It has long been known that radiolabelled Ang-II preferentially localizes in the nuclear zones of cardiomyocytes following intraventricular injection.<sup>36</sup> The presence of nuclear Ang-II receptors has been demonstrated in the liver<sup>11,12</sup> and kidneys.<sup>37</sup> Similar to our findings, direct application of Ang-II to isolated renal cortical cell nuclei enhances *in vitro* transcription of a variety of genes.<sup>37</sup> Ang-II activates several nuclear transcription factors and is implicated in the pathogenesis of vascular damage through NFκB.<sup>18</sup> NFκB increases the expression of cytokines, enzymes, adhesion molecules as well as other products involved in inflammation, proliferation and hypertrophy.<sup>38</sup> Our observations raise the interesting possibility that direct nuclear receptor-signaling may be an important mediator of Ang-II's action to promote cardiac remodeling via altered gene-transcription.

### **Novel Elements and Potential Implications**

Our work is the first demonstration, to our knowledge, that cardiomyocytes express Ang-II receptors on the nuclear envelope, that such receptors can induce nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ -transients and that their activation can induce changes in cardiac gene transcription that can be blocked by ATR. These findings provide a plausible mechanism for observations suggesting that Ang-II acts through intracellular receptors to regulate cardiomyocyte growth and induce cardiac remodeling.<sup>39</sup> There is growing interest in the development of intracrine pharmacology, small-molecule compounds designed to modulate intracellular signaling systems mediated by compounds synthesized within the target cell.<sup>40</sup> Lipid-soluble renin inhibitors and angiotensin converting-enzyme inhibitor prodrugs are particularly effective in inhibiting ATR-related glioblastoma<sup>41</sup> and neuroblastoma<sup>42</sup> cell-growth, pointing to the potential importance of blocking intracellular Ang-II signaling. Further information about the nature, role and significance of cardiomyocyte nuclear ATRs should contribute to the development of rationally-based intracrine pharmacology for cardiac remodeling-prevention.

### **Potential Limitations**

Transmembrane receptors can exist in monomeric, homodimeric or heterodimeric states, and in the multimeric state which may alter its pharmacological properties. AT1 and bradykinin B2 receptors form stable heterodimers, increasing G-protein activation.<sup>43</sup> The

dimerization status of the nuclear-membrane ATRs could have important implications for the intracrine physiology of the renin-angiotensin system, but is beyond the scope of the present study. We have not investigated the specific molecular properties of nuclear ATRs, and it remains to be determined whether they are identical to membrane receptors that are simply targeted to the nucleus, or whether a subset of ATRs with specific molecular compositions are selectively targeted to nuclear membranes.

## CONCLUSIONS

The current study provides novel insights into cardiac intracellular Ang-II signalling by demonstrating the existence of nuclear AT1Rs and AT2Rs that are coupled to RNA transcription and nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling. A better understanding of the nature and role of intracellular Ang-II receptors will help to provide a better appreciation of the molecular basis for cardiac remodelling and hopefully lead to the development of improved pharmacological interventions for cardiac disease prevention and therapy.

## Acknowledgements

We thank Annick Fortier for expert statistical analysis; George Vaniotis, Balazs Ordog and Chantal St-Cyr for excellent technical assistance and suggestions and France Thériault for secretarial support.



**Sources of Funding**

Supported by the Canadian Institutes of Health Research (MGP 6957) and the European-North American Atrial Fibrillation Research Alliance (ENAFRA) award from Fondation Leducq.

**Disclosures Section**

None.

## REFERENCES

1. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002;359(9311):995-1003.
2. Wachtell K, Horneham B, Lehto M, Slotwiner DJ, Gerds E, Olsen MH, Aurup P, Dahlof B, Ibsen H, Julius S, Kjeldsen SE, Lindholm LH, Nieminen MS, Rokkedal J, Devereux RB. Cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive patients with a history of atrial fibrillation: The Losartan Intervention For End Point Reduction in Hypertension (LIFE) study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(5):705-711.
3. Groth W, Blume A, Gohlke P, Unger T, Culman J. Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J Hypertens*. 2003;21(11):2175-2182.
4. De Mello WC. Cardiac intracrine renin angiotensin system. Part of genetic reprogramming? *Regul Pept*. 2006;133(1-3):10-12.
5. Singh VP, Le B, Khode R, Baker KM, Kumar R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes*. 2008;57(12):3297-3306.
6. Re RN, Cook JL. Mechanisms of disease: Intracrine physiology in the cardiovascular system. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4(10):549-557.
7. Singh VP, Le B, Bhat VB, Baker KM, Kumar R. High-glucose-induced regulation of intracellular ANG II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(2):H939-948.

8. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. 1993;75(5):977-984.
9. Peters J, Farrenkopf R, Clausmeyer S, Zimmer J, Kantachuvesiri S, Sharp MG, Mullins JJ. Functional significance of prorenin internalization in the rat heart. *Circ Res*. 2002;90(10):1135-1141.
10. De Mello WC. Intracellular angiotensin II regulates the inward calcium current in cardiac myocytes. *Hypertension*. 1998;32(6):976-982.
11. Booz GW, Conrad KM, Hess AL, Singer HA, Baker KM. Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology*. 1992;130(6):3641-3649.
12. Tang SS, Rogg H, Schumacher R, Dzau VJ. Characterization of nuclear angiotensin-II-binding sites in rat liver and comparison with plasma membrane receptors. *Endocrinology*. 1992;131(1):374-380.
13. Coutu P, Chartier D, Nattel S. Comparison of Ca<sup>2+</sup>-handling properties of canine pulmonary vein and left atrial cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(5):H2290-2300.
14. Xiao L, Coutu P, Villeneuve LR, Tadevosyan A, Maguy A, Le Bouter S, Allen BG, Nattel S. Mechanisms Underlying Rate-Dependent Remodeling of Transient Outward Potassium Current in Canine Ventricular Myocytes. *Circ Res*. 2008.
15. Boivin B, Chevalier D, Villeneuve LR, Rousseau E, Allen BG. Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 2003;278(31):29153-29163.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.

17. Boivin B, Lavoie C, Vaniotis G, Baragli A, Villeneuve LR, Ethier N, Trieu P, Allen BG, Hebert TE. Functional beta-adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2006;71(1):69-78.
18. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res.* 2000;86(12):1266-1272.
19. Malviya AN, Rogue PJ. "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell.* 1998;92(1):17-23.
20. Zima AV, Bare DJ, Mignery GA, Blatter LA. IP3-dependent nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling in the mammalian heart. *J Physiol.* 2007;584(Pt 2):601-611.
21. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999;18(7):1723-1729.
22. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 2000;21(1):90-113.
23. Wright CD, Chen Q, Baye NL, Huang Y, Healy CL, Kasinathan S, O'Connell TD. Nuclear {alpha}1-Adrenergic Receptors Signal Activated ERK Localization to Caveolae in Adult Cardiac Myocytes. *Circ Res.* 2008.
24. Bhattacharya M, Peri KG, Almazan G, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR, Chemtob S. Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15792-15797.
25. Willard FS, Crouch MF. Nuclear and cytoskeletal translocation and localization of heterotrimeric G-proteins. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(4):387-394.
26. Martini JS, Raake P, Vinge LE, DeGeorge B, Jr., Chuprun JK, Harris DM, Gao E, Eckhart AD, Pitcher JA, Koch WJ. Uncovering G protein-coupled receptor kinase-

- 5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(34):12457-12462.
27. Sorriento D, Ciccarelli M, Santulli G, Campanile A, Altobelli GG, Cimini V, Galasso G, Astone D, Piscione F, Pastore L, Trimarco B, Iaccarino G. The G-protein-coupled receptor kinase 5 inhibits NFkappaB transcriptional activity by inducing nuclear accumulation of IkappaB alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(46):17818-17823.
  28. Haller H, Lindschau C, Erdmann B, Quass P, Luft FC. Effects of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1996;79(4):765-772.
  29. Filipeanu CM, Henning RH, de Zeeuw D, Nelemans A. Intracellular Angiotensin II and cell growth of vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2001;132(7):1590-1596.
  30. Bezin S, Charpentier G, Lee HC, Baux G, Fossier P, Cancela JM. Regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling by translocation of the Ca<sup>2+</sup> messenger synthesizing enzyme ADP-ribosyl cyclase during neuronal depolarization. *J Biol Chem*. 2008 Oct 10;283(41):27859-70.
  31. Kusnier C, Cárdenas C, Hidalgo J, Jaimovich E. Single-channel recording of inositol trisphosphate receptor in the isolated nucleus of a muscle cell line. *Biol Res*. 2006;39(3):541-53.
  32. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Nishiyama A, Inagami T, Hayashi M. Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension*. 2006;47(5):894-900.
  33. Kang N, Walther T, Tian XL, Bohlender J, Fukamizu A, Ganten D, Bader M. Reduced hypertension-induced end-organ damage in mice lacking cardiac and renal angiotensinogen synthesis. *J Mol Med*. 2002;80(6):359-366.

34. Xu J, Carretero OA, Lin CX, Cavaasin MA, Shesely EG, Yang JJ, Reudelhuber TL, Yang XP. Role of cardiac overexpression of ANG II in the regulation of cardiac function and remodeling postmyocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Sep;293(3):H1900-7.
35. Reudelhuber TL, Bernstein KE, Delafontaine P. Is angiotensin II a direct mediator of left ventricular hypertrophy? Time for another look. *Hypertension*. 2007 Jun;49(6):1196-201.
36. Robertson AL, Jr., Khairallah PA. Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. *Science*. 1971;172(988):1138-1139.
37. Li XC, Zhuo JL. Intracellular ANG II directly induces in vitro transcription of TGF-beta1, MCP-1, and NHE-3 mRNAs in isolated rat renal cortical nuclei via activation of nuclear AT1a receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Apr;294(4):C1034-45.
38. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336(15):1066-1071.
39. Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, Booz GW, Dostal DE, Kumar R. Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regul Pept*. 2004;120(1-3):5-13.
40. Re RN, Cook JL. The basis of an intracrine pharmacology. *J Clin Pharmacol*. 2008 Mar;48(3):344-50.
41. Juillerat-Jeanneret L, Celerier J, Chapuis Bernasconi C, Nguyen G, Wostl W, Maerki HP, Janzer RC, Corvol P, Gasc JM. Renin and angiotensinogen expression and functions in growth and apoptosis of human glioblastoma. *Br J Cancer*. 2004 Mar 8;90(5):1059-68.

42. Chen L, Re RN, Prakash O, Mondal D. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces neuroblastoma cell growth rate. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991 Mar;196(3):280-3.
43. AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature.* 2000;407(6800):94-98.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** *Immunoreactivity of Angiotensin II receptor subtypes 1 and 2 in purified cardiac nuclei.* A, Rat hearts were fractionated into four fractions: total extract (A), supernatant (B), crude nuclear (C) and enriched nuclear (D) fractions. Aliquots (30ug) of each fraction were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF. After blocking, membranes were incubated with antisera specific for Calpactin I, GRP78, Nup62, GM130, AT1 or AT2 (examples of Western blots are illustrated, n=6/antibody/per fraction). Immunoreactive bands were visualized by ECL. B, Mean  $\pm$  SEM expression levels for GRP78, GM130, Nup62, AT1, AT2 normalized to Calpactin I. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs respective fraction in B. C, Representative phase-contrast image showing nuclei possess an intact nuclear envelope (left); middle panel, propidium iodide staining of isolated nuclei (right). D, Mean  $\pm$  SEM DNA content (ng/ $\mu$ l) of cytoplasmic or nuclear fractions (n=10/group). \*\*\*P<0.001 vs. cytoplasmic.

**Figure 2.** *Subcellular distribution of AT1 receptors in adult rat ventricular cardiomyocytes.* Panels A-D show representative results from a single cell. Panel A is a confocal image demonstrating the nuclear localisation of AT1R (green). B shows nuclear staining with nucleoporin p62 (red). C is a superimposed confocal image showing the colocalization of AT1R with Nup 62, coincident signals appear in yellow (Merge). D is a phase contrast image of the same cell. Data are representative of 40 cells from 10 rats.



**Figure 3.** *Subcellular distribution of AT2 receptors in adult rat ventricular cardiomyocytes.* Panels A-D show representative results from a single cell. Panel A is a confocal image demonstrating the nuclear localisation of AT2R (green). B shows nuclear staining with nucleoporin p62 (red). C is a superimposed confocal image showing the colocalization of AT2R with Nup 62, coincident signals appear in yellow (Merge). D is a phase contrast image of the same cell. Data are representative of 30 cells from 10 rats.

**Figure 4.** *Endocytosis and intracellular trafficking of Ang-II.* FITC-Ang-II (1 nmol/L) was applied extracellularly to the bathing medium. Images are shown immediately after Ang-II application (0 min) and then 30 and 60 min later. Merged images are superimposed fluorescent and dark-field images. Where indicated, cells were preincubated with valsartan (10  $\mu$ mol/L, for 25 min) prior to administration of Ang-II. Z-stacks were acquired every 5 min using a Zeiss LSM-510 confocal microscope. (N=6/group)

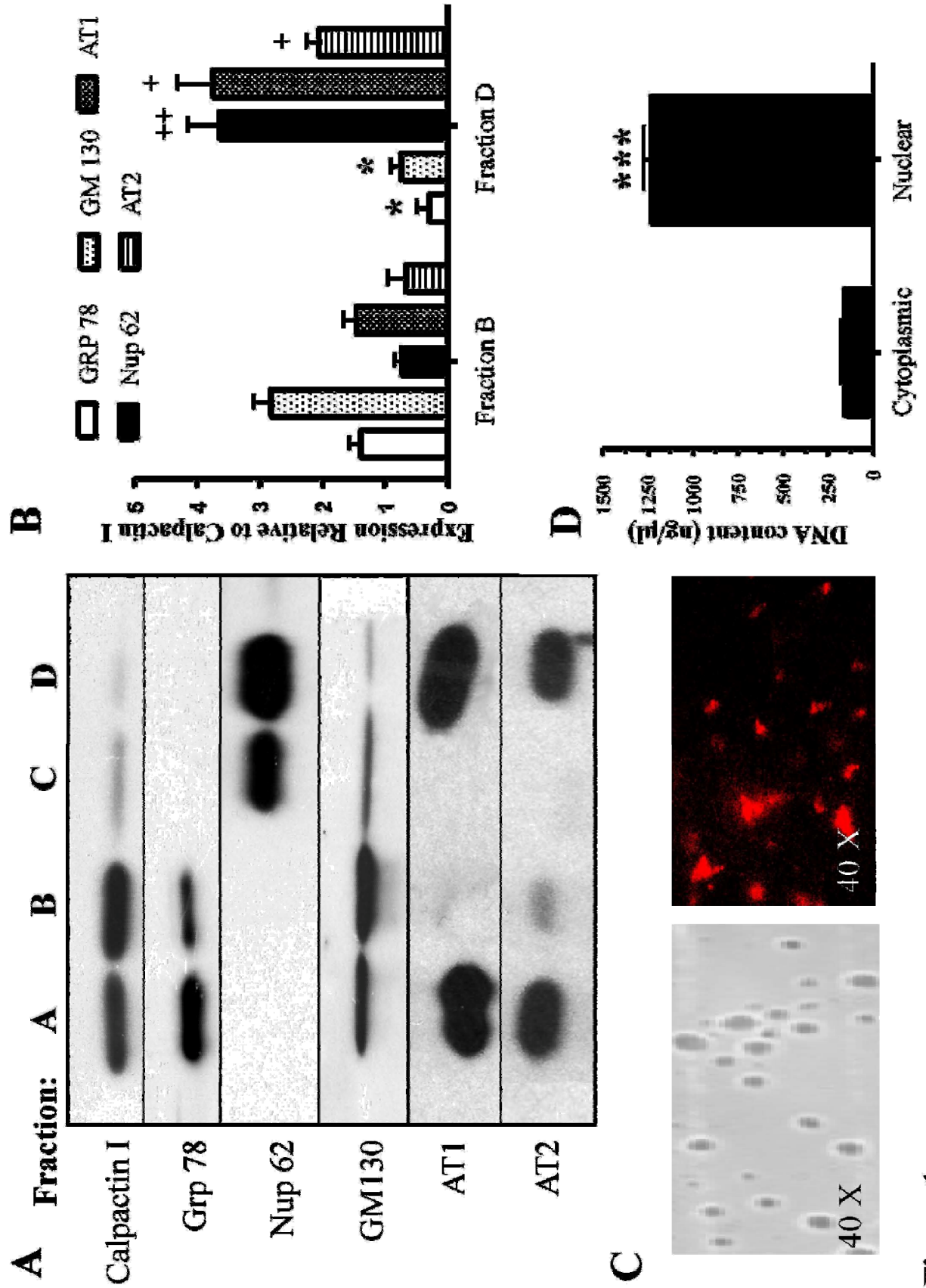
**Figure 5.** *Subcellular localization of intracellularly applied FITC-Ang-II.* A, phase contrast image showing myocyte immediately prior to injection. FITC-ANG-II (1 nmol/L) was microinjected into freshly isolated cardiomyocytes and fluorescence visualized at 10 (B), 20 (C), and 30 (D) seconds post-injection. No fluorescence was observed in adjacent cells at any time. (N=10 microinjected cells from 10 rats)

**Figure 6.** *Regulation of transcription initiation by nuclear envelope AT1R and AT2R.* A, De novo RNA synthesis. Isolated nuclear preparations were stimulated with 1- $\mu$ mol/L Ang-II, L 162,313 (a non-peptide AT1R-selective agonist), CGP 42112A (an AT2R-selective agonist), candesartan plus Ang-II, or PD123177 plus Ang-II, as indicated. Following the addition of antagonists candesartan (Cand) and PD123177, nuclei were preincubated for 30 min prior to the addition of Ang-II. B, Nuclei were treated with PTX 5  $\mu$ g/ml for 2 h and stimulated with Ang-II. Data represent mean  $\pm$  SEM of at least five separate experiments performed in triplicate and normalized to control. \*\*\* $p$ <0.001 vs. control; \*\* $p$ <0.01 vs Ang-II; N.S. = non significant vs. basal. C, representative 2% agarose gel electrophoresis of RNA extracted from purified nuclei, non-stimulated (lane 1), stimulated with Ang-II (10  $\mu$ mol/L) (lane 2) and stimulated with Ang-II in the presence of valsartan (Val) (10  $\mu$ mol/L) stained with ethidium bromide. 1  $\mu$ g of each sample was loaded. Bottom panel shows mean  $\pm$  SEM results as arbitrary optical density (O.D.) units from 6 different experiments. \*\* $P$ <0.01 vs. control, <sup>++</sup> $P$ <0.01 vs. Ang-II

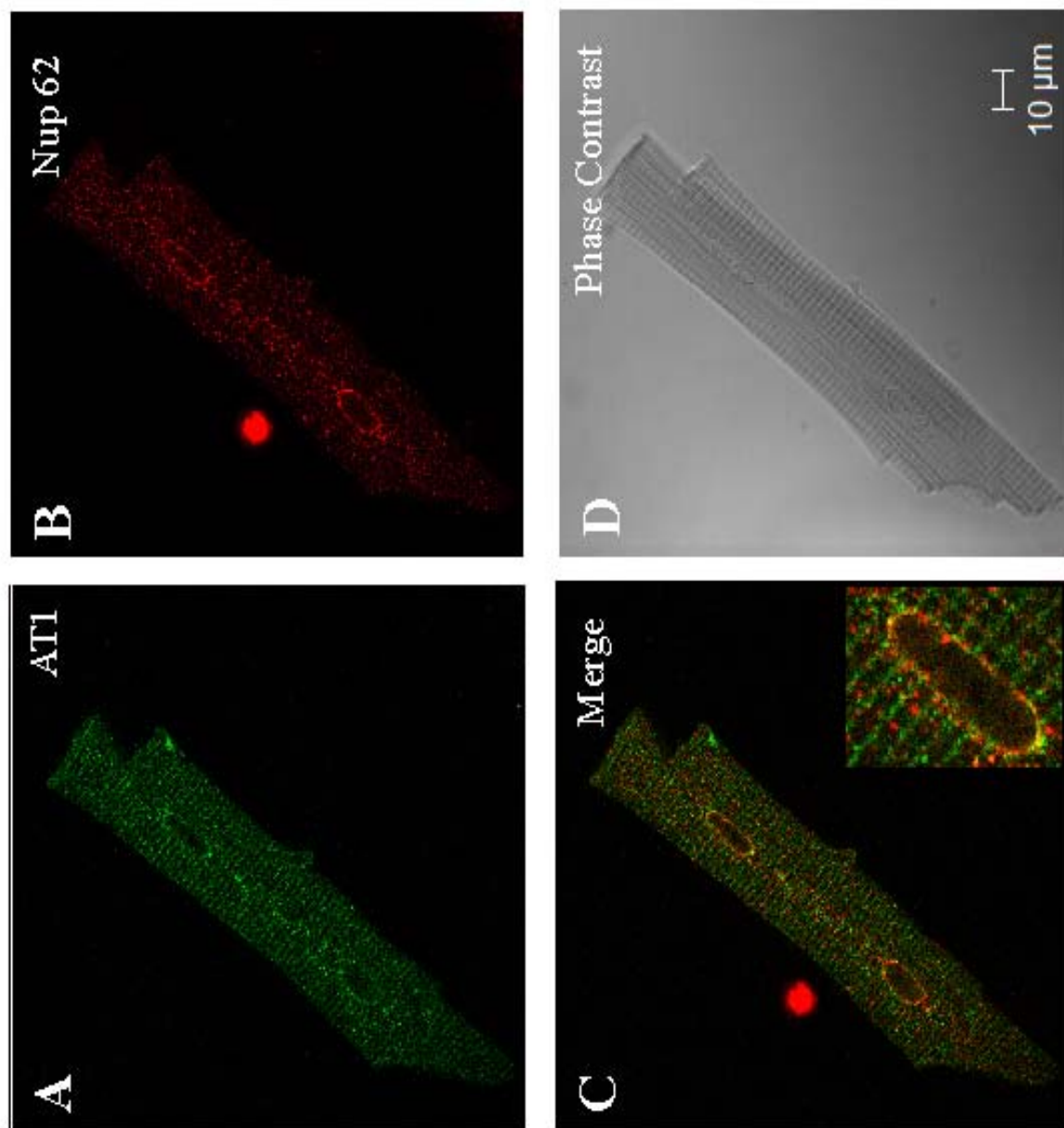
**Figure 7.** *Regulation of nuclear NF $\kappa$ B mRNA expression by nuclear ATR.* Isolated nuclei were treated for 2 h with Ang-II at different concentrations. NF $\kappa$ B mRNA was quantified by qPCR. A. Data are presented as NF $\kappa$ B mRNA expression relative to an average of three housekeeping genes (N=6/concentration/group). \*\*\* $P$ <0.001 vs. intact cells, N.S. = non significant. B. Valsartan (10  $\mu$ mol/L) or PD123177 (10  $\mu$ mol/L) significantly reduced the

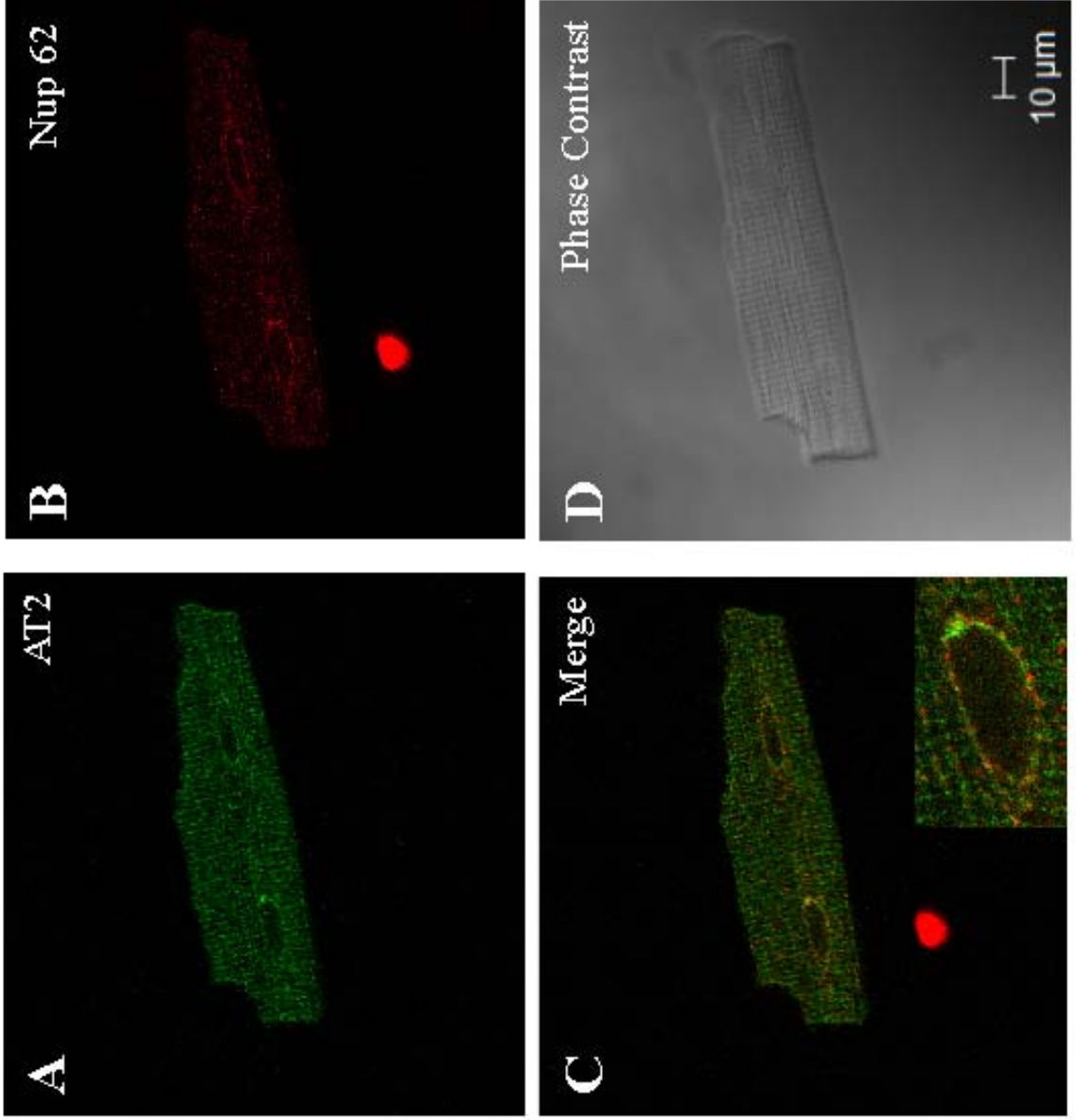
Ang-II (10  $\mu\text{mol/L}$ ) caused NF $\kappa$ B activity. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM \*P<0.05 vs. control, <sup>+</sup>P<0.01 vs. AngII, <sup>#</sup>P<0.01 vs. valsartan.

**Figure 8.** *Functional coupling of ATRs to  $\text{Ca}^{2+}$  entry in enriched nuclear preparations.* FURA-2/AM-loaded freshly isolated cardiac nuclei were seeded onto glass slides and nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  concentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was measured with an IonOptix microspectrofluorimeter ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 340 and 380 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  = 509 nm). Typical recordings of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  are shown, (A) vehicle (DMSO); (B) Ang-II (10  $\mu\text{mol/L}$ ); (C) L-162,313 (10  $\mu\text{mol/L}$ ); (D) candesartan (10  $\mu\text{mol/L}$ ) plus Ang-II (10  $\mu\text{mol/L}$ ); (E) CGP 42112A (10  $\mu\text{mol/L}$ ); (F) PD123177 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) plus Ang-II (10  $\mu\text{mol/L}$ ). G, Summary graph of  $[\text{Ca}^{2+}]$  transient amplitude under each condition, mean  $\pm$  SEM (N=6/group/condition) \*P<0.05 vs. control, N.S. = non significant vs. control, arrows indicate the moment that the drug was applied.



**Figure 1**

**Figure 2**



**Figure 3**

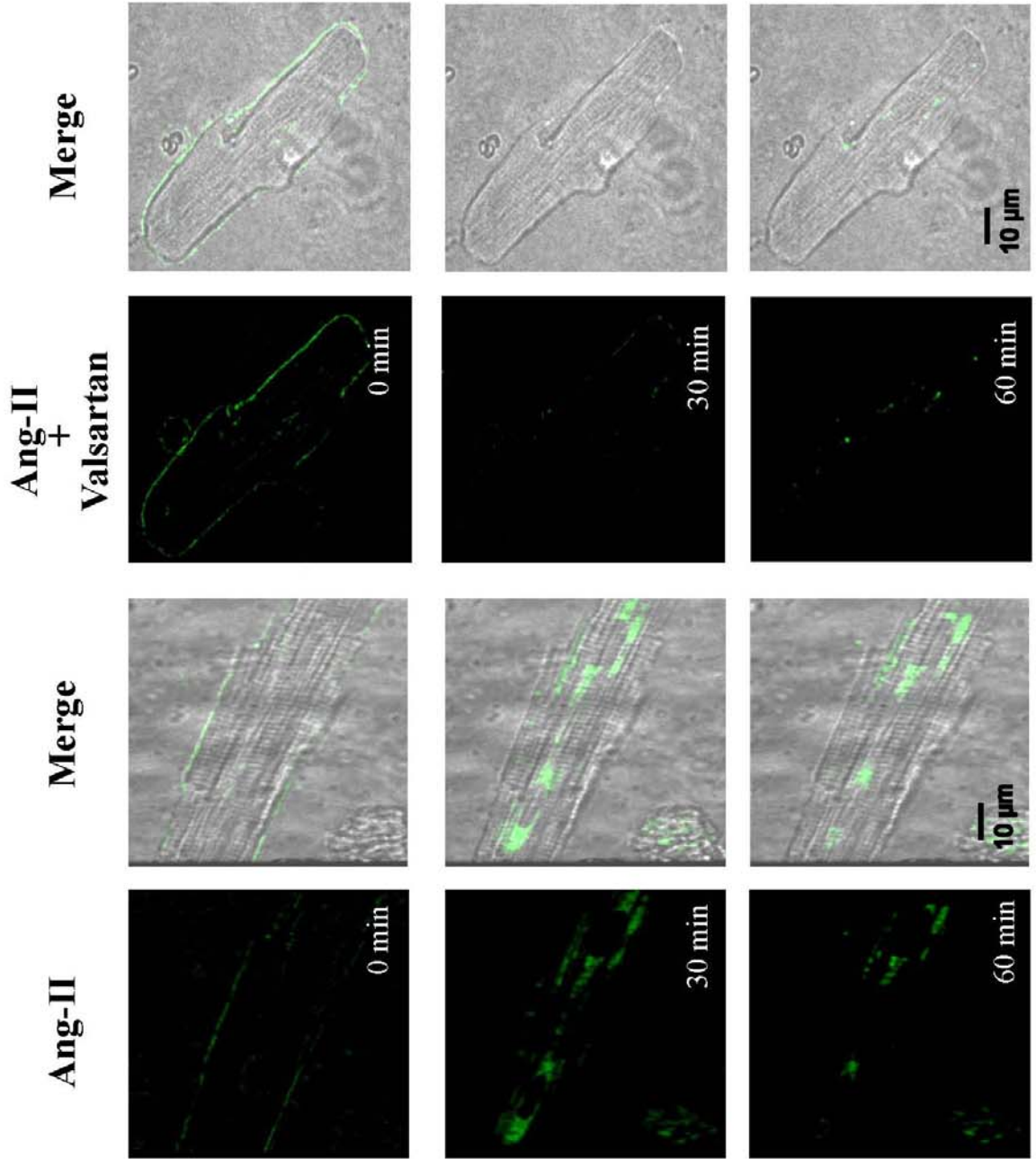
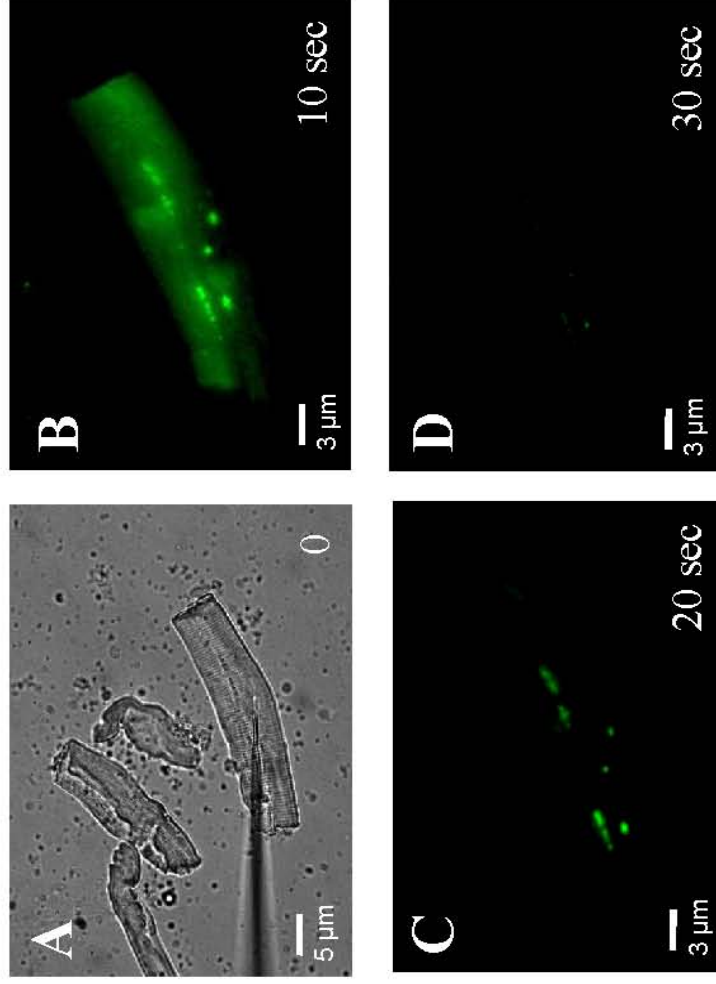


Figure 4



**Figure 5**



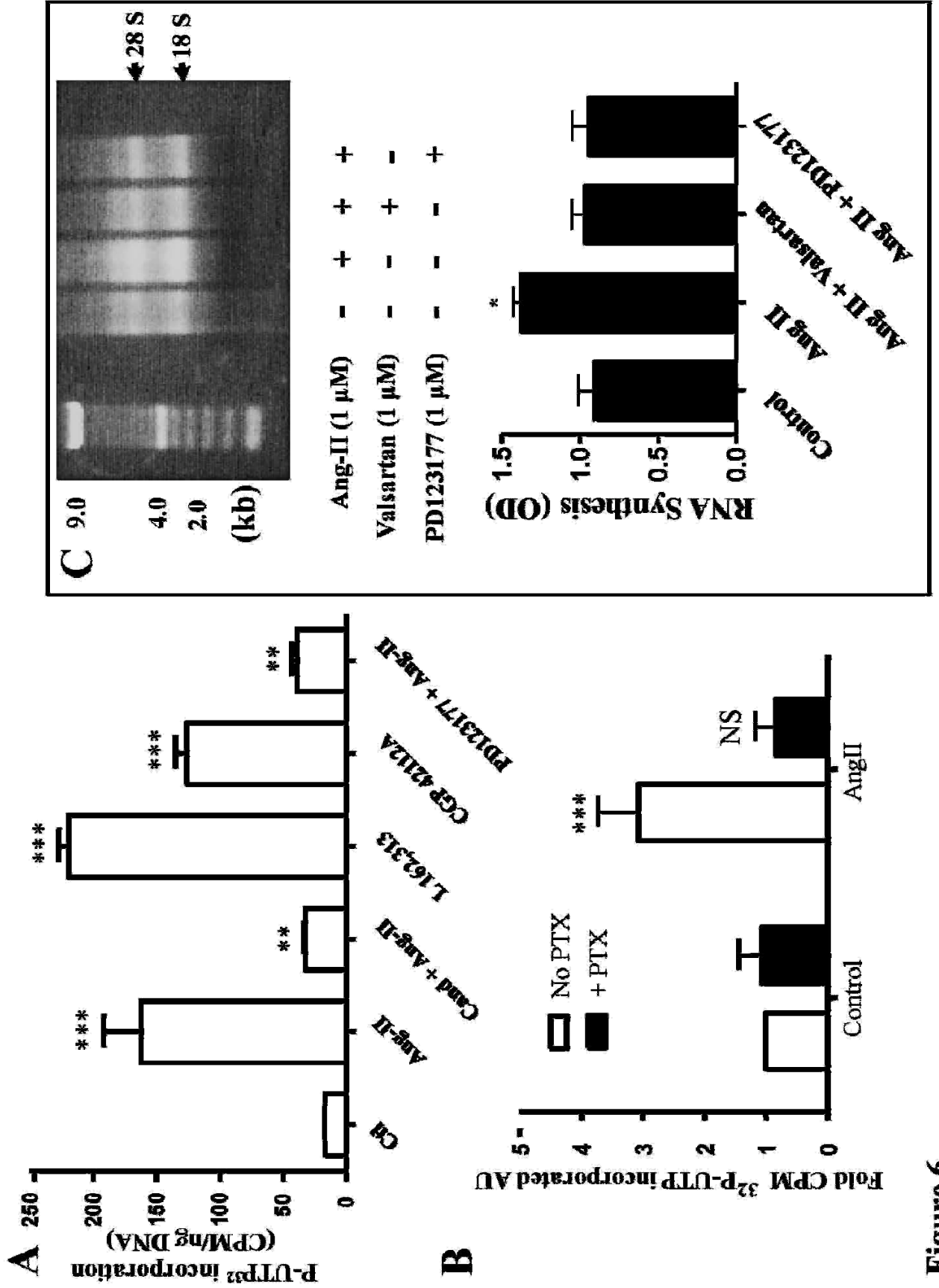


Figure 6

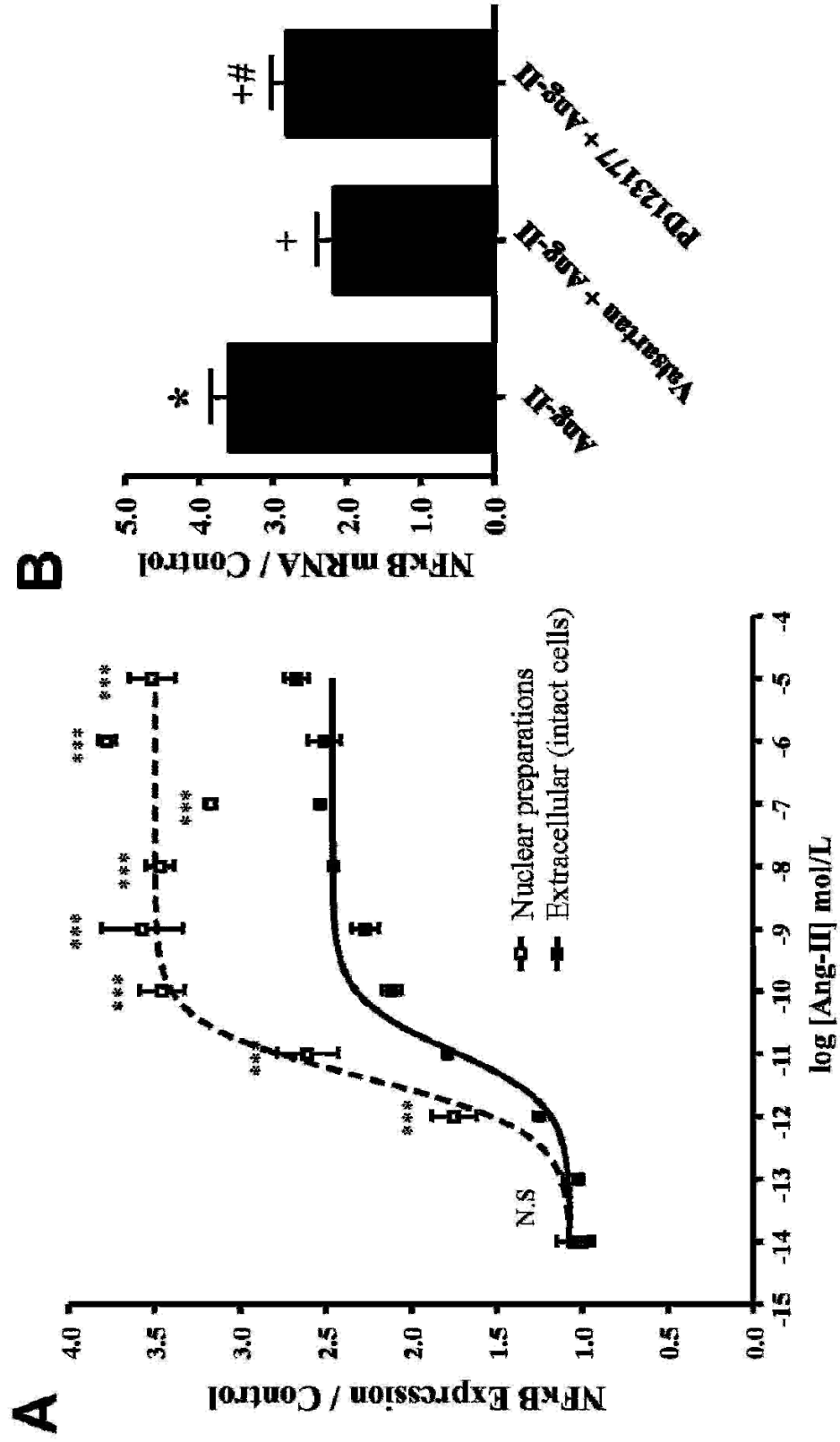


Figure 7

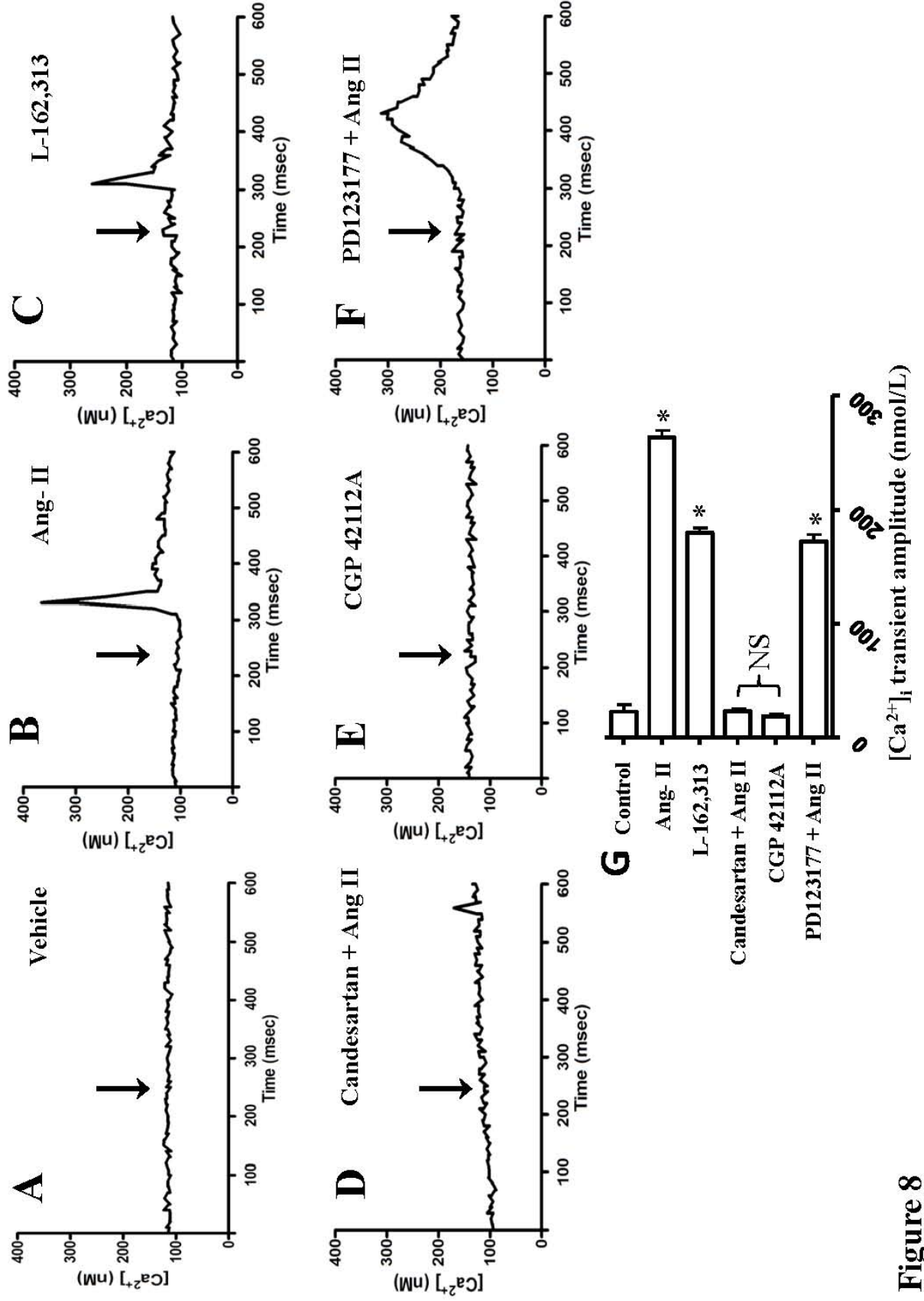


Figure 8

## Antibody Information

<i>Protein</i>	<i>Isotype</i>	<i>Company</i>	<i>Catalog Number</i>	<i>Dilution</i>
GM-130 (130kDa)	Mouse-monoclonal	BD Biosciences	610823	1:250
Calpactin-I (36kDa)	Mouse-monoclonal	BD Biosciences	610068	1:2000
GRP78 (75kDa)	Rabbit-polyclonal	Abcam	Ab21685	1:1000
Nup-62 (62kDa)	Mouse-monoclonal	BD Biosciences	610498	1:1000
AT1 (43kDa)	Rabbit-polyclonal	Alomone labs	ZZR-011-AN01	1:400
AT2(47kDa)	Rabbit-polyclonal	Alomone labs	AAR-012-AN01	1:400

## On-line Table II

## Primers Information

<i>Primers</i>	<i>Description</i>	<i>Sequences</i>	<i>RefSeq mRNA</i>
<b>NFκB1</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	F: CTGCGATACCTTAATGACAGCG R: AATTTGGCTTCCTTTCTTGGCT	XM_342346.3
<b>B2m</b>	Beta-2 microglobulin	F: GAATTCAGTGTGAGCCAGGAT R: CAAGTGTACTCTCGCCATCCA	NM_012512.1
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: TACATGTTCCAGTATGACTC R: TGTGAGGGGAGATGCTCAGTG	NM_017008
<b>Hspcb</b>	Heat shock protein 90kDa alpha, class B member 1	F: TGTTCCTTCACCACCTCCTTGA R: CCTACCTGGTGGCAGAGAAAGT	NM_01004082

## Chapitre 3 : Discussion

### 3.1 Résumé des principaux résultats

Les avancées majeures dans le SRA ont conduit à une meilleure gestion et à une meilleure compréhension d'un large éventail de maladies cardiovasculaires et de troubles métaboliques. Traditionnellement, les effets biologiques reliés à l'Ang-II étaient associés à l'activation des récepteurs couplés à des protéines G se trouvant sur la membrane plasmique. Les résultats de la présente étude démontrent clairement la présence de récepteurs de l'Ang-II fonctionnel au niveau de l'enveloppe nucléaire dans les cellules du myocarde ventriculaire. Ces résultats sont basés sur des observations biochimiques et physiologiques : 1) l'immunoréactivité d'AT1 et d'AT2 a été copurifiée avec un marqueur du complexe nucléaire (nucléoporin 62) et pas avec les marqueurs du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique et ni avec ceux de la membrane de l'appareil Golgi; 2) la microscopie confocale a localisé les récepteurs au niveau de la membrane nucléaire dans les myocytes ventriculaires isolés du cœur de rat; 3) l'injection intracellulaire de l'Ang-II marquée avec une protéine verte fluorescente (GFP) ou Alexa488 s'est répandue rapidement au niveau nucléaire alors que l'injection extracellulaire a causé une internalisation du peptide indépendant du noyau; 4) l'application d'agonistes sélectifs à des noyaux isolés a résulté en une augmentation de la transcription génique en NFκB et en ARN ribosomique et, 5) la concentration nucléaire en  $Ca^{2+}$  a augmenté lors de l'application des agonistes spécifiques à l'AT1. Par conséquent, les noyaux cardiaques

possèdent les récepteurs d'Ang-II qui sont fonctionnels et sont couplés aux mécanismes de signalisation dans la membrane nucléaire qui peuvent être distincts de ceux activés par les récepteurs classiques.

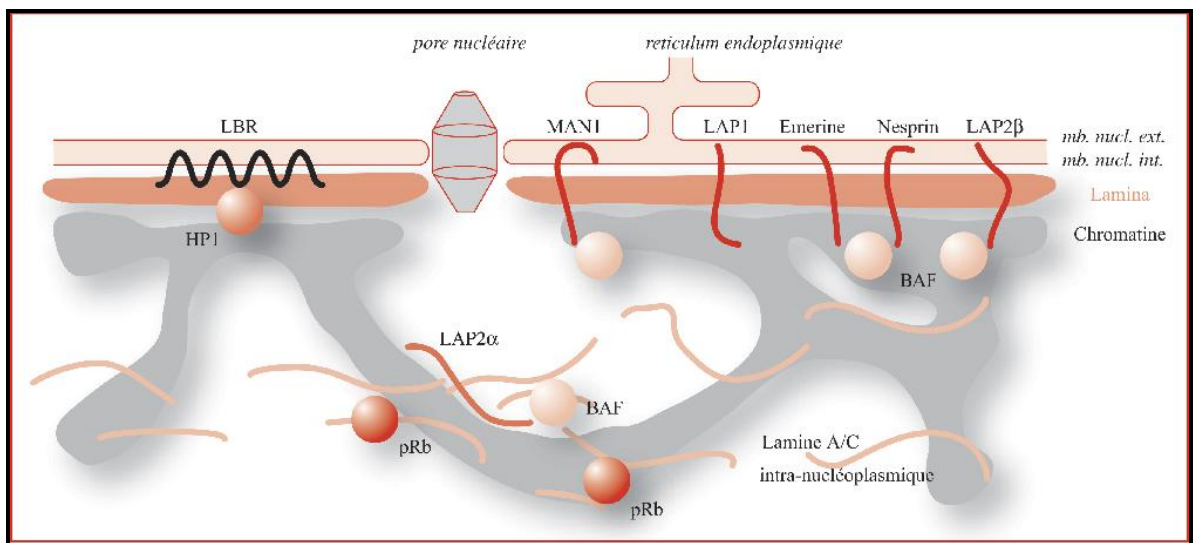
### **3.2 Réactivité et orientation des RCPG sur la membrane nucléaire**

La plupart des études ont détecté la présence de récepteurs couplés à une protéine G dans ou sur le noyau d'une manière constituante suggérant que leur trafic est essentiellement indépendant des agonistes. On peut déduire alors que ces récepteurs opèrent directement sur la membrane nucléaire à la suite de leur biosynthèse et assemblage dans le réticulum endoplasmique. En effet, des preuves récentes indiquent que l'ensemble du complexe de signalisation incluant le récepteur, la protéine G hétérotrimérique et les effecteurs sont assemblés avant leur ciblage vers la membrane plasmique.<sup>72, 73</sup> Il est possible qu'il y ait une série d'événements qui déterminent leur cible dans la cellule. D'ailleurs, l'élimination de sites de glycosylation sur les récepteurs prostaglandines conduit à leur accumulation dans un compartiment périnucléaire.<sup>74</sup> L'ensemble de modifications post-traductionnelles semble être importante pour la destination finale de ces récepteurs intracellulaires. Sans doute, il est également possible que les RCPG soient victimes d'internalisation, opérant ainsi à la membrane nucléaire à la suite d'une stimulation par des agonistes. Nos résultats montrent que les récepteurs AT1 et AT2 existent dans les membranes nucléaires cardiaques indépendamment des stimuli et de plus sans aucune modification de taille puisqu'il n'y avait aucune différence au niveau des

masses moléculaires qui ont été observées pour AT1/AT2 liés à la membrane plasmique par rapport à ceux liés aux noyaux. De plus, les récepteurs extracellulaires semblent être aussi internalisés à la suite de l'application de l'Ang-II néanmoins sans aucune orientation claire vers les noyaux. La notion de l'internalisation d'Ang-II avec ses récepteurs peut avoir un effet direct au niveau nucléaire. Il est ainsi possible qu'une augmentation accrue de l'internalisation et de la translocation de l'Ang-II-AT1 peut permettre un transport plus élevé d'Ang-II avec ses récepteurs dans le cytosol et le noyau. Un tel phénomène permettrait à l'Ang-II de stimuler ses récepteurs au niveau nucléaire.

Une autre question qui reste ouverte concerne l'orientation des RCPG nucléaires sur la membrane. S'ils maintiennent la topologie adoptée dans le réticulum endoplasmique au cours de leur biosynthèse, le site de liaison du ligand se situerait dans l'espace intramembranaire nucléaire et orienté vers l'extérieur ou l'intérieur de la membrane (Figure 1.6). Subséquemment, selon leur conformation structurelle les signaux vont être envoyés au cytosol ou dans le noyau. Il est probable aussi, comme pour plusieurs protéines nucléaires périphériques ou transmembranaires, que le trafic de l'intérieur à l'extérieur des membranes implique des pores nucléaires.<sup>75, 76</sup> En effet, certains RCPG, dont le récepteur de la bradykinine B2, du CysLT1, de l'apelin, ou de l'endothéline, contiennent des séquences de localisation nucléaire qui semblent être impliquées dans le tri des récepteurs entre deux membranes nucléaires.<sup>77-79</sup> La question de leur orientation est essentielle, car elle permettrait de déterminer la direction dans laquelle le signal est transmis (c'est-à-dire, vers le noyau ou vers le cytoplasme). Pour les récepteurs de l'Ang-II nucléaire, il semble

qu'ils sont orientés vers le noyau car les noyaux isolés des cardiomyocytes régulent des processus de transcription d'ARN, de gènes d'intérêt (ex. NFkB) en plus de participer à l'homéostasie calcique. Toutefois, il faudrait des outils encore plus novateurs afin d'investiguer plus précisément leur orientation structurale.



**Figure 1.6 : La membrane nucléaire**

La membrane nucléaire externe est reliée à la fois au réticulum endoplasmique et à la membrane nucléaire interne (INM), y étant attachée au niveau du complexe des pores nucléaires (NPC).

### 3.3 Mécanisme de régulation de la transcription génique par les RCPG

Une des principales fonctions nucléaires implique la transcription des gènes. Le calcium nucléaire joue un rôle essentiel dans de nombreux processus dans le noyau comme l'import des protéines, l'apoptose et la régulation des gènes.<sup>80</sup> Les mécanismes moléculaires par lesquels les RCPG, y compris les récepteurs à l'Ang-II, modulent la



transcription des gènes sont partiellement connus. Récemment des mécanismes pour expliquer les effets induits par les ligands extracellulaires des RCPG (endothéline et muscarinic) ont été attribués à l'activation des tyrosine kinases. Un autre mécanisme établi pour les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques comprend la formation de complexes  $\beta$ -arrestine-c-Src qui, au cours de l'internalisation du récepteur permet de recruter d'autres molécules de signalisation afin de phosphoryler les MAPK.<sup>81</sup> Alternativement, les RCPG nucléaires peuvent aussi réguler la transcription des gènes. En effet, afin de déterminer le rôle physiologique des récepteurs nucléaires de l'Ang-II par rapport aux récepteurs classiques, l'incubation des cellules cardiaques pures et des noyaux isolés avec des concentrations similaires d'Ang-II a démontré une augmentation significative de la transcription de gènes proinflammatoires dépendants du noyau. La localisation distincte des RCPG peut ainsi dicter des mécanismes différents pour le même récepteur qui peuvent être responsables de diverses fonctions. En particulier, les récepteurs de la membrane nucléaire peuvent ainsi causer des réponses aiguës, tandis que les récepteurs de la membrane plasmique peuvent être responsables des effets chroniques via la régulation de la transcription des gènes. Ce nouveau concept offre donc de nouvelles perspectives dans la compréhension et la régulation des gènes impliqués dans les pathophysiologies cardiaques.

### **3.4 Mécanismes de régulation du $\text{Ca}^{2+}$ intranucléaire par les RCPG**

Les signaux calciques dans le noyau contrôlent un certain nombre de fonctions, y compris la transcription génique, la synthèse et la réparation de l'ADN et le transport

protéique.<sup>80</sup> Les signaux calciques nucléaires sont produits non seulement par le transport du calcium de l'espace nucléoplasmique, mais aussi de l'enveloppe nucléaire. Les signaux calciques cytosoliques et nucléaires sont régulés différemment et sont largement indépendants les uns des autres.<sup>82</sup> À l'état de repos, les concentrations nucléaires en calcium sont inférieures à celles dans le cytosol (~ 50 à 100 nM contre ~ 400 nM)<sup>83</sup>, mais au cours des processus cellulaires et à la stimulation directe nucléaire, les niveaux de calcium dans le noyau augmentent nettement au-delà de ceux détectés dans le cytosol.<sup>84, 85</sup> La stimulation des récepteurs d'Ang-II nucléaires cause une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cisterne nucléaire ou le nucléoplasme. La régulation du calcium nucléaire est régie par un certain nombre de récepteurs et de canaux, notamment par les récepteurs  $\text{IP}_3$  et  $\text{IP}_4$ , les pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase et les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .<sup>86-88</sup> Un certain nombre de protéines liant le calcium comme la calmoduline, la calreticuline et les calpaïnes ont été identifiées dans le noyau, et peuvent à leur tour activer des kinases, qui serviront à décoder les signaux calciques dans le noyau par le contrôle de l'expression génique ou par le biais de la phosphorylation des principaux facteurs de transcription.<sup>80, 89</sup> En plus des effets de normalisation atténués par le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le nucléoplasme, le remplissage de la cisterne nucléaire affecte aussi l'état conformationnel du complexe nucléaire empêchant la diffusion à travers l'enveloppe nucléaire et par conséquent le contrôle du transport des molécules entre le cytosol et le nucléoplasme.

### 3.5 Perspectives cliniques

Des éléments essentiels du SRA intracellulaire, en particulier le SRAi dans les myocytes cardiaques, incluant la synthèse dépendante de la chymase de l'Ang-II ainsi que ses actions ne sont pas bloquées par les antagonistes d'AT1. Ces caractéristiques suggèrent que les inhibiteurs d'ECA et les bloqueurs de récepteurs de l'Ang-II seraient partiellement efficaces dans les conditions pathologiques qui activent la SRA intracellulaire. Il a été montré récemment que l'activation du SRAi est accompagnée par une augmentation de l'apoptose des myocytes cardiaques, du stress oxydatif et de la fibrose cardiaque.<sup>90</sup> Dans ces conditions, les inhibiteurs de la rénine ont été plus efficaces que le candesartan (bloqueur AT1) ou l'inhibiteur d'ECA. Les effets partiels de ces inhibiteurs sont dus probablement à leur incapacité d'agir intracellulairement. Les inhibiteurs de l'ECA et les bloqueurs de récepteurs améliorent le pronostic chez les patients atteints de néphropathie diabétique et de cardiomyopathie. Toutefois, la monothérapie avec l'une de ces deux catégories de bloqueurs du SRA atténue, mais ne supprime pas, la protéinurie ou n'empêche pas totalement la progression de l'insuffisance rénale ou cardiaque.<sup>91-93</sup> Il est de plus en plus vrai que l'inhibition du SRA par les bloqueurs de récepteurs et les inhibiteurs de l'ECA ne fournissent pas autant de bénéfice cardiovasculaire que prévu.<sup>94, 95</sup> La thérapie combinée de ces deux bloqueurs est sous étude; toutefois, il est peu probable que ça puisse améliorer à long terme les effets thérapeutiques à cause de l'activation du SRA intracellulaire. En fait, l'utilisation d'un inhibiteur de la rénine, en monothérapie ou en association avec les autres classes de médicaments, pourrait être plus efficace.

### **3.6 Conclusion**

Le concept de la signalisation intracellulaire de divers ligands a gagné beaucoup d'intérêt aux cours de dernières années. La découverte de récepteurs fonctionnels de l'Ang-II ouvre de nouvelles voies dans la biologie des récepteurs à sept domaines transmembranaires, notamment dans la manière avec laquelle ils contrôlent la transcription des gènes à la suite de l'activation par des hormones endogènes qui peuvent avoir accès à l'espace cytosolique et se lier à des sites nucléaires. Des études plus approfondies sont nécessaires afin de caractériser leur rôle biologique dans les conditions physiologiques et pathologiques, ce qui pourrait aboutir au développement de nouveaux médicaments thérapeutiques et conduire à un changement du traitement médical classique.

## Bibliographie

1. Marks LS, Maxwell MH. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. *Hypertension*. 1979; 1(4):384-388.
2. Glodny B, Glodny DE. John Loesch, discoverer of renovascular hypertension, and Harry Goldblatt: two great pioneers in circulation research. *Ann Intern Med*. 2006; 144(4):286-295.
3. Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest*. 1987; 79(1):1-6.
4. Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*. 2001; 37(4):1047-1052.
5. Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*. 1998; 32(3):387-392.
6. Inagami T, Kawamura M, Naruse K, Okamura T. Localization of components of the renin-angiotensin system within the kidney. *Fed Proc*. 1986;45(5):1414-1419.
7. Yamada H, Fabris B, Allen AM, Jackson B, Johnston CI, Mendelsohn AO. Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart. *Circ Res*. 1991; 68(1):141-149.
8. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(3):415-472.
9. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*. 1990; 265(36):22348-22357.
10. Chappel MC, Ferrario CM. ACE and ACE2: their role to balance the expression of angiotensin II and angiotensin-(1-7). *Kidney Int*. 2006; 70(1):8-10.

11. Valdes G, Neves LA, Anton L, Corthorn J, Chacon C, Germain AM, Merrill DC, Ferrario CM, Sarao R, Penninger J, Brosnihan KB. Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta*. 2006; 27(2-3):200-207.
12. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*. 2006; 47(3):515-521.
13. Gallagher PE, Chappell MC, Ferrario CM, Tallant EA. Distinct roles for ANG II and ANG-(1-7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 290(2):C420-426.
14. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*. 1998; 78(3):583-686.
15. Hirata Y, Kanno K, Eguchi S, Kano H. Effect of an AT1 receptor antagonist (CV-11974) on angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Blood Press Suppl*. 1994; 5:84-88.
16. Ju H, Zhao S, Jassal DS, Dixon IM. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 1997;35(2):223-232.
17. Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT1 angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997; 30(1):75-83.
18. Weerackody RP, Chatterjee PK, Mistry SK, McLaren J, Hawksworth GM, McLay JS. Selective antagonism of the AT1 receptor inhibits the effect of angiotensin II on DNA and protein synthesis of rat proximal tubular cells. *Exp Nephrol*. 1997; 5(3):253-262.
19. Yang BC, Phillips MI, Zhang YC, Kimura B, Shen LP, Mehta P, Mehta JL. Critical role of AT1 receptor expression after ischemia/reperfusion in isolated rat hearts: beneficial effect of antisense oligodeoxynucleotides directed at AT1 receptor mRNA. *Circ Res*. 1998; 83(5):552-559.

20. Sandberg K. Structural analysis and regulation of angiotensin II receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 1994; 5(1):28-35.
21. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(9):1001-1015.
22. Mattiazzi A. Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> or changes in myofilament Ca<sup>2+</sup> responsiveness? *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1997; 37(4):205-214.
23. Menne J, Park JK, Agrawal R, Lindschau C, Kielstein JT, Kirsch T, Marx A, Muller D, Bahlmann FH, Meier M, Bode-Boger SM, Haller H, Fliser D. Cellular and molecular mechanisms of tissue protection by lipophilic calcium channel blockers. *FASEB J.* 2006; 20(7):994-996.
24. Kaibara M, Mitarai S, Yano K, Kameyama M. Involvement of Na(+)-H+ antiporter in regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel current by angiotensin II in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 1994; 75(6):1121-1125.
25. Oriji GK, Keiser HR. Protein kinase C mediates angiotensin II-induced contractions and the release of endothelin and prostacyclin in rat aortic rings. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1997; 57(2):135-141.
26. Yao SK, Ober JC, Krishnaswami A, Ferguson JJ, Anderson HV, Golino P, Buja LM, Willerson JT. Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. *Circulation.* 1992; 86(4):1302-1309.
27. Axmann A, Seidel D, Reimann T, Hempel U, Wenzel KW. Transforming growth factor-beta1-induced activation of the Raf-MEK-MAPK signaling pathway in rat lung fibroblasts via a PKC-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249(2):456-460.
28. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1):C82-97.

29. Malloy LG, Sauro MD. Tyrosine kinase inhibition suppresses angiotensin contraction in hypertensive and normotensive small resistance arteries. *Life Sci.* 1996; 58(19):PL317-324.
30. Touyz RM, Schiffrin EL. Tyrosine kinase signaling pathways modulate angiotensin II-induced calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) transients in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1996; 27(5):1097-1103.
31. Hughes AD. Molecular and cellular mechanisms of action of angiotensin II (AT1) receptors in vascular smooth muscle. *J Hum Hypertens.* 1998; 12(5):275-281.
32. Mendis S, Lindholm LH, Mancia G, Whitworth J, Alderman M, Lim S, Heagerty T. World Health Organization (WHO) and International Society of Hypertension (ISH) risk prediction charts: assessment of cardiovascular risk for prevention and control of cardiovascular disease in low and middle-income countries. *J Hypertens.* 2007; 25(8):1578-1582.
33. Dzau V, Braunwald E. Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement. *Am Heart J.* 1991; 121(4 Pt 1):1244-1263.
34. Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1998; 40(2):352-363.
35. Zhu YC, Zhu YZ, Gohlke P, Stauss HM, Unger T. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1 receptor antagonism on cardiac parameters in left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 1997; 80(3A):110A-117A.
36. Rizzoni D, Muiesan ML, Porteri E, Salvetti M, Castellano M, Bettoni G, Tiberio G, Giulini SM, Monteduro C, Garavelli G, Agabiti-Rosei E. Relations between cardiac and vascular structure in patients with primary and secondary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32(4):985-992.
37. Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol.* 1998; 82(8A):2N-9N.



38. Wattigney WA, Mensah GA, Croft JB. Increasing trends in hospitalization for atrial fibrillation in the United States, 1985 through 1999: implications for primary prevention. *Circulation*. 2003; 108(6):711-716.
39. Verdecchia P, Reboldi G, Gattobigio R, Bentivoglio M, Borgioni C, Angeli F, Carluccio E, Sardone MG, Porcellati C. Atrial fibrillation in hypertension: predictors and outcome. *Hypertension*. 2003; 41(2):218-223.
40. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*. 1997; 96(4):1180-1184.
41. Boos CJ, Anderson RA, Lip GY. Is atrial fibrillation an inflammatory disorder? *Eur Heart J*. 2006; 27(2):136-149.
42. Goette A, Arndt M, Rocken C, Spiess A, Staack T, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation*. 2000; 101(23):2678-2681.
43. Turnbull F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet*. 2003; 362(9395):1527-1535.
44. Groth W, Blume A, Gohlke P, Unger T, Culman J. Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J Hypertens*. 2003; 21(11):2175-2182.
45. Li J, Culman J, Hortnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U, Unger T. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J*. 2005; 19(6):617-619.
46. Rogg H, de Gasparo M, Graedel E, Stulz P, Burkart F, Eberhard M, Erne P. Angiotensin II-receptor subtypes in human atria and evidence for alterations in patients with cardiac dysfunction. *Eur Heart J*. 1996; 17(7):1112-1120.
47. Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal

- phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(12):6391-6396.
48. Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, Baker KM. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; 29(11):2893-2902.
  49. Luvara G, Pueyo ME, Philippe M, Mandet C, Savoie F, Henrion D, Michel JB. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18(9):1408-1416.
  50. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation*. 1997; 96(5):1593-1597.
  51. Kohagura K, Arima S, Endo Y, Chiba Y, Ito O, Abe M, Omata K, Ito S. Involvement of cytochrome P450 metabolites in the vascular action of angiotensin II on the afferent arterioles. *Hypertens Res*. 2001; 24(5):551-557.
  52. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest*. 1995; 95(2):651-657.
  53. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL. Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest*. 1996; 98(2):418-425.
  54. Smits JF, van Krimpen C, Schoemaker RG, Cleutjens JP, Daemen MJ. Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992; 20(5):772-778.
  55. Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab*. 2007; 18(5):208-214.

56. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:C82–C97.
57. Reudelhuber TL, Bernstein KE, Delafontaine P. Is angiotensin II a direct mediator of left ventricular hypertrophy? Time for another look. *Hypertension* 2007; 49:1196–1201.
58. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:17985–17990.
59. Re RN. Mechanisms of disease: local renin–angiotensin–aldosterone systems and the pathogenesis and treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2004; 1:42–47
60. Danser AH. Local renin–angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:759–768.
61. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, et al. Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension* 2006; 47:894–900.
62. Kang N, Walther T, Tian XL, et al. Reduced hypertension-induced end-organ damage in mice lacking cardiac and renal angiotensinogen synthesis. *J Mol Med* 2002; 80:359–366.
63. Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, et al. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin–angiotensin system. *Hypertension* 1998; 31:1324–1330.
64. Vidotti DB, Casarini DE, Cristovam PC, Leite CA, Schor N, Boim MA. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(6):F1039-1045.

65. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, Bernstein KE. Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol* 2004; 165:1019–1032.
66. Turnbull F, Neal B, Pfeffer M, Kostis J, Algert C, Woodward M, Chalmers J, Zanchetti A, MacMahon S. Blood pressure-dependent and independent effects of agents that inhibit the renin–angiotensin system. *J Hypertens* 2007; 25:951–958.
67. Lavrentyev EN, Estes AM, Malik KU. Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2007; 101(5):455-464.
68. Yamamoto K, Masuyama T, Sakata Y, Mano T, Nishikawa N, Kondo H, Akehi N, Kuzuya T, Miwa T, Hori M. Roles of renin-angiotensin and endothelin systems in development of diastolic heart failure in hypertensive hearts. *Cardiovasc Res.* 2000; Aug;47(2):274-83.
69. Graiani G, Lagrasta C, Migliaccio E, Spillmann F, Meloni M, Madeddu P, Quaini F, Padura IM, Lanfrancone L, Pelicci P, Emanuelli C. Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage. *Hypertension.* 2005 Aug;46(2):433-40.
70. Pilati M, Cicoira M, Zanolla L, Nicoletti I, Muraglia S, Zardini P. The role of angiotensin-converting enzyme polymorphism in congestive heart failure. *Congest Heart Fail.* 2004; Mar-Apr;10(2):87-93.
71. Walther T, Schubert A, Falk V, Binner C, Walther C, Doll N, Fabricius A, Dhein S, Gummert J, Mohr FW. Left ventricular reverse remodeling after surgical therapy for aortic stenosis: correlation to Renin-Angiotensin system gene expression. *Circulation.* 2002 Sep 24; 106(12 Suppl 1):I23-6.
72. Rebois RV, Robitaille M., Gales C, Dupre DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M, Hebert TE. Heterotrimeric Gproteins form stable complexes with

adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *Journal of Cell Science* 2006; 119, 2807-2818.

73. Dupre DJ, Robitaille M, Ethier N, Villeneuve L R, Mamarbachi AM, Hebert TE. Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:45, 34561-34573.
74. Boer U, Neuschafer-Rube F, Moller U, Puschel GP. Requirement of N-glycosylation of the prostaglandin E2 receptor EP3&b.beta; for correct sorting to the plasma membrane but not for correct folding. *The Biochemical Journal* 2002; 350, 839-847.
75. Mattaj IW. Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004; 5:1, 65-69.
76. Lusk CP, Blobel G, King MC. Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:5, 414-420.
77. Lee DK, Lanca AJ, Cheng R, Nguyen T, Ji X D, Gobeil F J, Chemtob S, George S. Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, bradykinin B2 receptors. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:9, 7901-7908.
78. Lu D, Yang H, Shaw G, Raizada MK. Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons. *Endocrinology* 1998; 139:1, 365-375.
79. Nielsen CK, Campbell JI, Ohd J F, Morgelin M, Riesbeck K, Landberg, G, Sjolander A. A novel localization of the G-protein-coupled CysLT1 receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65:3, 732-742.
80. Malviya AN, Rogue PJ. Tell me where is calcium bred: Clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* 1998; 92, 17-23.
81. Pierce KL, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 2001; 20, 1532-1539.

82. Badminton MN, Kendall JM, Rembold CM, Campbell AK. Current evidence suggests independent regulation of nuclear calcium. *Cell Calcium* 1998; 23, 79-86
83. Himpens B, De Smedt H, Casteels R. Kinetics of nucleocytoplasmic Ca<sup>2+</sup> transients in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *American Journal of Physiology* 1992; 263, C978-C985.
84. Birch BD, Eng DL, Kocsis JD. Intranuclear Ca<sup>2+</sup> + Transients During Neurite Regeneration of an Adult Mammalian Neuron. *PNAS* 1992; 89, 7978-7982.
85. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Inositol tetrakisphosphate (IP<sub>4</sub>)- and inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>)-dependent Ca<sup>2+</sup> influx in cortical neuronal nuclei of newborn piglets following graded hypoxia. *Neurochemical Research* 2004; 29, 391-396.
86. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH. Calcium transport pathways in the nucleus. *European Journal of Physiology* 1996; 432, 1-6.
87. Malviya AN, Rogue P, Vincendon G. Stereospecific inositol 1,4,5-[<sup>32</sup>P]triphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol triphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *PNAS* 1990; 87 9270-9274.
88. Xie X, Wu G, Lu ZH, Ledeen RW. Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *Journal of Neurochemistry* 2002; 81, 1185-1195.
89. Heist EK, Schulman H. The role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases within the nucleus. *Cell Calcium* 1998; 23, 103-114.
90. Singh VP, Bao L, Khode R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes* 2008; 57:3297–3306.
91. Parving HH, Persson F, Lewis JB. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2008; 358:2433–2446.

92. Boccara F, Cohen A. Interplay of diabetes and coronary heart disease on cardiovascular mortality. *Heart* 2004; 90:1371–1373.
93. Okin PM, Devereux RB, Gerds E. Impact of diabetes mellitus on regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy and the prediction of outcome during antihypertensive therapy: the Losartan Intervention For Endpoint (LIFE) Reduction in Hypertension Study. *Circulation* 2006; 113:1588–1596.
94. Turnbull F, Neal B, Algert C. Effects of different blood pressure-lowering regimens on major cardiovascular events in individuals with and without diabetes mellitus: results of prospectively designed overviews of randomized trials. *Arch Intern Med* 2005; 165:1410–1419.
95. Weber MA, Giles TD. Inhibiting the renin-angiotensin system to prevent cardiovascular diseases: do we need a more comprehensive strategy? *Rev Cardiovasc Med* 2006; 7:45–54

