

In compliance with the  
Canadian Privacy Legislation  
some supporting forms  
may have been removed from  
this dissertation.

While these forms may be included  
in the document page count,  
their removal does not represent  
any loss of content from the dissertation.

Université de Sherbrooke

**L'angiotensine II et ses récepteurs au niveau des cellules endothéliales  
endocardiques humaines: rôle dans la modulation du calcium intracellulaire**

Par

**Nelly Abdel-Karim Abdel-Malak**

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire  
Université de Sherbrooke  
Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade  
de Maître ès Sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire

Mai 2003



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitions et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
*ISBN: 0-612-86628-9*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 0-612-86628-9*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

**Canada**

*Au souvenir de popa Abbouda,  
À ma mère et ma meilleure amie Nahida,  
À mes adorables sœurs Rola et Rima,  
À ma très chère teta Samira,  
À toute ma famille,*

*Pour la confiance que vous avez en moi,  
Pour votre amour inépuisable,  
Pour vos encouragements continuels  
et votre support,*

*Je vous dédie mon mémoire*



## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
RÉSUMÉ.....	XVII
I. INTRODUCTION.....	1
1.1. Le cœur.....	2
1.1.1. L'endocarde.....	3
1.2. L'endothélium endocardique.....	6
1.2.1. Structure fonctionnelle.....	6
1.2.2. Rôle de l'endothélium endocardique.....	9
1.2.2.1. Relâchement de facteurs cardiogéniques.....	9
1.2.2.1.1. Le monoxyde d'azote.....	12
1.2.2.1.2. L'endothéline-1.....	16
1.2.2.1.3. Les prostaglandines.....	18
1.2.2.2. L'endothélium endocardique est une barrière physico-chimique.....	19
1.3. L'angiotensine II.....	20
1.3.1. Biosynthèse de l'Ang II : systémique et locale.....	21
1.3.2. Les récepteurs à l'Ang II.....	25
1.3.2.1. Le récepteur AT <sub>1</sub> .....	25
1.3.2.1.1. L'Ang II induit l'endocytose du récepteur AT <sub>1</sub> .....	28
1.3.2.1.2. Distribution intracellulaire du récepteur AT <sub>1</sub> .....	29

1.3.2.2. Le récepteur AT <sub>2</sub> .....	30
1.4. Le calcium.....	33
1.4.1. Les canaux calciques.....	34
1.5. Résumé de la littérature et hypothèse et objectifs de travail.....	37
<b>II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>40</b>
2.1. Isolation et culture des cellules endothéliales endocardiques du cœur foetal humain âgé de 20 semaines ainsi que de rat adulte.....	41
2.2. Microscopie confocale.....	42
2.2.1. Principe de base.....	43
2.2.2. Balayage des cellules.....	46
2.3. Chargement des cellules avec la sonde calcique Fluo-3.....	46
2.4. Marquage du noyau.....	49
2.5. Marquage par immunofluorescence.....	51
2.5.1. Marquage de l'Ang II.....	51
2.5.2. Marquage des récepteurs AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub> .....	51
2.5.3. Prétraitement avec l'Ang II.....	52
2.5.4. Technique de l'immunofluorescence indirecte.....	52
2.5.5. Visualisation et quantification du marquage par microscopie confocale.....	53
2.6. Immunobuvardage western.....	54
2.6.1. Extraction des protéines.....	54
2.6.2. Technique de l'immunobuvardage western.....	55
2.6.3. Détection des antigènes.....	58
2.7. Statistiques.....	59

III. RÉSULTATS.....	61
3.1. Présence et distribution des récepteurs à l'angiotensine II dans les cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines.....	62
3.1.1. Localisation et distribution du récepteur AT <sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	62
3.1.2. Localisation et distribution du récepteur AT <sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	68
3.1.3. Présence et distribution du récepteur AT <sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur de rat adulte.....	76
3.1.4. Localisation et distribution de l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	80
3.2. Effet de différentes concentrations d'Ang II sur le niveau basal du [Ca] <sub>c</sub> et du [Ca] <sub>n</sub> des cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	83
3.2.1. L'Ang II extracellulaire augmente d'une façon dose-dépendante le niveau basal soutenu du [Ca] <sub>c</sub> et du [Ca] <sub>n</sub> des CEEDs et des CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.....	88
3.3. Effet de l'administration extracellulaire des antagonistes des récepteurs AT <sub>1</sub> (losartan) et AT <sub>2</sub> (PD123319), sur l'augmentation soutenue du [Ca] <sub>c</sub> et du [Ca] <sub>n</sub> induite par l'Ang II (10 <sup>-12</sup> M) dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	95
3.4. L'Ang II extracellulaire induit la mobilisation de ses récepteurs dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	104

3.4.1. L'Ang II extracellulaire induit la mobilisation du récepteur AT <sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	104
3.4.2. L'Ang II extracellulaire induit la mobilisation du récepteur AT <sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	112
IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	121
4.1. Distribution et expression de l'Ang II et des récepteurs AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub> au niveau des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	123
4.2. Effet de l'Ang II sur les niveaux de [Ca] <sub>c</sub> et de [Ca] <sub>n</sub> des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines et type de récepteur responsable de cet effet.....	132
4.3. Effet de l'Ang II sur la mobilisation des récepteurs AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub> au niveau des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	135
V. REMERCIEMENTS.....	140
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	142

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	L'endocarde, l'endothélium endocardique et la matrice extracellulaire.....4
Figure 2	Effet de l'endothélium endocardique sur la contraction isométrique du muscle cardiaque.....10
Figure 3	Les facteurs libérés par l'endothélium endocardique.....13
Figure 4	Biosynthèse de l'Ang II.....23
Figure 5	Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale.....44
Figure 6	Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale.....47
Figure 7	Marquage immunofluorescent du récepteur AT <sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....64
Figure 8	Densité relative du récepteur AT <sub>1</sub> au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....66
Figure 9	Présence du récepteur AT <sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....69
Figure 10	Marquage immunofluorescent du récepteur AT <sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....72
Figure 11	Densité relative du récepteur AT <sub>2</sub> dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire)

	des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	74
Figure 12	Présence du récepteur AT <sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	77
Figure 13	Marquage immunofluorescent du récepteur AT <sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur de rat adulte.....	81
Figure 14	Marquage immunofluorescent de l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	84
Figure 15	Densité relative de l'Ang II au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....	86
Figure 16	Une expérience représentative de l'effet de différentes concentrations d'Ang II sur les niveaux soutenus du [Ca] <sub>c</sub> et [Ca] <sub>n</sub> des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines étudié en microscopie confocale.....	89
Figure 17	Effet de différentes concentrations d'Ang II sur les niveaux soutenus du [Ca] <sub>c</sub> et du [Ca] <sub>n</sub> des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	92
Figure 18	Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur AT <sub>1</sub> , le losartan, sur l'augmentation soutenue du niveau de [Ca] <sub>c</sub> et de [Ca] <sub>n</sub> induite par l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	97

Figure 19	Effet préventif de l'antagoniste du récepteur AT <sub>1</sub> , le losartan, sur l'augmentation soutenue du [Ca] <sub>c</sub> et du [Ca] <sub>n</sub> induite par l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	99
Figure 20	Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur AT <sub>2</sub> , le PD123319, sur l'augmentation soutenue du niveau de [Ca] <sub>c</sub> et de [Ca] <sub>n</sub> induite par l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	102
Figure 21	Expérience représentative de l'effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT <sub>1</sub> dans les CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	106
Figure 22	Expérience représentative de l'effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT <sub>1</sub> dans les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	108
Figure 23	Effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT <sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	110
Figure 24	Expérience représentative de l'effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT <sub>2</sub> dans les CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	114

Figure 25	Expérience représentative de l'effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT <sub>2</sub> dans les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	116
Figure 26	Effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT <sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	118



**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1	Composition des gels utilisés en immunobuvardage western.....	56
-----------	---	----

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

[Ca] <sub>c</sub>	Concentration de calcium libre cytosolique
[Ca] <sub>i</sub>	Concentration de calcium libre intracellulaire
[Ca] <sub>n</sub>	Concentration de calcium libre nucléaire
°C	Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
AA	Acide arachidonique
ACE	Enzyme de conversion de l'Angiotensine
Ach	Acétylcholine
ADH	Vasopressine
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADPRc	Adénosine diphosphate ribose cyclique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang	Angiotensine
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
Ang O	Angiotensinogène
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger

ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaM	Calmoduline
CAV-1	Cavéoline-1
CEE	Cellules endothéliales endocardiques
CEED	Cellules endothéliales endocardiques isolées à partir du ventricule droit
CEEG	Cellules endothéliales endocardiques isolées à partir du ventricule gauche
CEV	Cellules endothéliales vasculaires
CMLV	Cellules du muscle lisse vasculaire
COX	Cyclooxygénase
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DPPIV	Dipeptidyl peptidase IV
EC <sub>50</sub>	Concentration produisant 50% de la réponse maximale
EE	Endothélium endocardique
ERK	Kinases régulées par signaux extracellulaires
E.S.M	Erreur Standard de la Moyenne
ET-1	Endothéline-1
EV	Endothélium vasculaire
FBS	Sérum de bovin foetal

FITC	Fluorescéine Isothiocyanate
HUVEC	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
IgG	Immunoglobuline G
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate
ir	Immunoréactif
JNK	Kinases à N-terminale c-jun
L-Arg	L-arginine
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
MKP-1	MAP kinase phosphatase 1
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mV	Millivolt
n	Nombre d'expériences
NA	Noradrénaline
NE	Norépinéphrine
NGS	Sérum normal de chèvre
NRS	Sérum normal de lapin
nM	Nanomolaire
NO	Monoxyde d'azote

p	Probabilité
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PBS	Tampon phosphate salin
PG	Prostaglandine
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandine I <sub>2</sub>
PKC	Protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLD	Phospholipase D
PMT	Multiplicateur de photon
PP-2A	Sérine/thréonine phosphatase 2A
PS	Picosiemens
PTP	Phosphotyrosine phosphatase
PTX	Toxine de pertussis
RAS	Système rénine-angiotensine
AT <sub>1</sub>	Récepteur à l'angiotensine II de type AT <sub>1</sub>
AT <sub>2</sub>	Récepteur à l'angiotensine II de type AT <sub>2</sub>
RCPG	Récepteur couplé à la protéine G
RE	Réticulum endoplasmique
rpm	Révolution par minute
SDS	Sulfate de sodium dodécyl
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant
S-MEM	Milieu Essentiel Minimal de Suspension

SP	Substance P
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
vWF	Facteur de Von Willebrand
VIP	polypeptide vasoactif intestinal

**L'angiotensine II et ses récepteurs au niveau des cellules endothéliales  
endocardiques humaines: rôle dans la modulation du calcium intracellulaire**

Par

**Nelly Abdel-Karim Abdel-Malak**

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire  
Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade  
de Maître ès Sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire

**RÉSUMÉ**

L'angiotensine II (Ang II) est un octapeptide qui est le médiateur principal des actions physiologiques du système rénine-angiotensine. Ses effets sur le cerveau, les reins, les glandes surrénales, le muscle cardiaque et les vaisseaux sanguins incluant les cellules endothéliales vasculaires ont été bien étudiés. Cependant, son effet sur l'endothélium endocardique est encore obscur. Chez l'humain, l'Ang II relaie ses effets via 2 types de récepteurs, soient les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Dans la première partie de ce projet de recherche, nous avons étudié l'expression et la distribution de l'Ang II et de ses récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> au niveau des cellules endothéliales endocardiques isolées des ventricules droit (CEEDs) et gauche (CEEGs) du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Nos résultats ont démontré que les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont présents au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et plus particulièrement au niveau du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEDs et des CEEGs. Nous avons observé que la densité des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> est plus élevée au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs et ce au niveau nucléaire pour le récepteur AT<sub>1</sub> et au niveau cytosolique et nucléaire pour le récepteur AT<sub>2</sub>. Nous avons également démontré la présence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau des CEEDs et des CEEGs isolées à partir des cœurs de rats adultes, suggérant que la présence de ce type de récepteur au niveau des CEEs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines n'est pas due à leur stade de développement. En ce qui concerne l'Ang II, sa distribution et sa densité relative sont similaires pour les

CEEDs et les CEEGs; l'Ang II ayant une distribution homogène dans celles-ci. Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons étudié l'effet de l'Ang II sur le niveau basal soutenu du calcium cytosolique ( $[Ca]_c$ ) et du calcium nucléaire ( $[Ca]_n$ ) au niveau des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Nos résultats montrent que l'Ang II induit une augmentation soutenue dose-dépendante de la concentration du  $[Ca]_c$  et  $[Ca]_n$  à la fois dans les CEEDs et les CEEGs. Cependant, les CEEGs sont plus sensibles à l'Ang II que les CEEDs; les  $EC_{50}$  étant de l'ordre de  $10^{-13}$  M et  $10^{-12}$  M respectivement. De plus, nos résultats ont démontré que l'augmentation du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  par l'Ang II est relayé principalement via l'activation du récepteur  $AT_1$  au niveau des CEEDs et des CEEGs. Finalement, nous avons démontré que le prétraitement de nos cellules avec de l'Ang II à différents temps pourrait induire soit une synthèse *de novo* ou une dégradation des récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$ . Plus précisément, au niveau des CEEDs, l'Ang II extracellulaire pourrait induire une synthèse *de novo* des récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  au niveau du cytosol et du noyau. Il est à noter qu'après 60 min de traitement à l'Ang II, l'augmentation des récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  pourrait être associée à un phénomène de dégradation de ces deux types de récepteurs. Au niveau des CEEGs, l'Ang II extracellulaire semble induire une mobilisation du récepteur  $AT_1$  qui est associée à un phénomène de dégradation au niveau du cytosol et du noyau. Après 60 min de traitement, cette diminution des récepteurs  $AT_1$  pourrait être associée à un phénomène de synthèse *de novo* et/ou recyclage et en particulier au niveau du cytosol. Pour le récepteur  $AT_2$ , l'Ang II extracellulaire semble induire une synthèse *de novo* du récepteur qui semble être associée à un phénomène de dégradation et ce surtout au niveau nucléaire. Ces résultats démontrent que non seulement l'Ang II augmente le  $Ca^{2+}$  intracellulaire des CEEs modulant ainsi le couplage excitation-sécrétion de ces cellules, mais aussi montrent qu'il y a une différence entre les CEEDs et les CEEGs non seulement au niveau de la distribution des récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  mais aussi au niveau de la sensibilité à l'Ang II ainsi qu'au niveau du profil, du taux de mobilisation, de dégradation et probablement de synthèse *de novo* de ses récepteurs.



## **I. INTRODUCTION**

### 1.1. Le cœur.

Le cœur est un organe musculaire strié qui pèse 300 g chez un homme adulte et 250 g chez une femme adulte (TURNER, 1994). Il est formé de 4 cavités, 2 oreillettes et 2 ventricules, et joue le rôle de pompe servant à propulser le sang dans tout le corps. Le cœur, lui-même, n'est pas irrigué par le sang qui circule à l'intérieur de ses cavités. Cette fonction est accomplie par les artères coronaires qui sont connectées à l'aorte. Durant une vie moyenne, le cœur bat plus de 2.5 milliards de fois et pompe plus de 7,000 litres de sang par jour (SEVERS, 2000).

Du point de vue structural, la paroi du cœur est composée de 3 couches principales (GAVACHAN, 1998):

- 1- Le péricarde : c'est la couche externe du coeur. Elle est constituée de cellules épithéliales qui forment une membrane qui recouvre le coeur.
- 2- Le myocarde : c'est la couche musculaire médiane du coeur. Elle est formée de cardiomyocytes contractiles qui sont responsables de pomper le sang.
- 3- L'endocarde : c'est la couche interne du cœur. Elle est formée d'une monocouche de cellules endothéliales, nommée endothélium endocardique (EE), qui est en contact direct avec le sang circulant et en continuité avec la couche intima des artères.

Les cardiomyocytes constituent la majorité du tissu cardiaque représentant ~ 75 % du volume total de ce dernier. Cependant, de la totalité des cellules cardiaques, les cardiomyocytes comptent moins de 40 %, la majorité des cellules étant des fibroblastes,

des macrophages, des cellules sanguines, des cellules du muscle lisse vasculaire et des cellules endothéliales (BRUTSAERT, 2003).

### 1.1.1. L'endocarde.

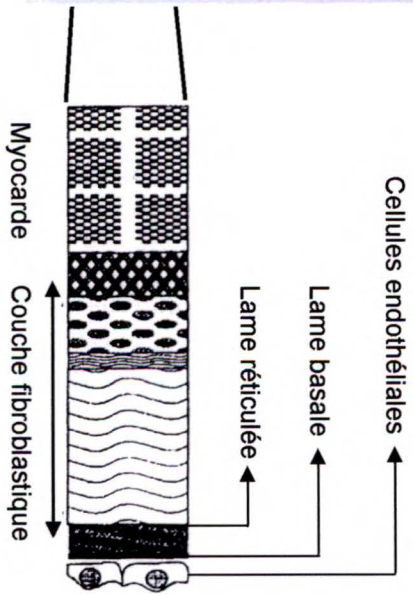
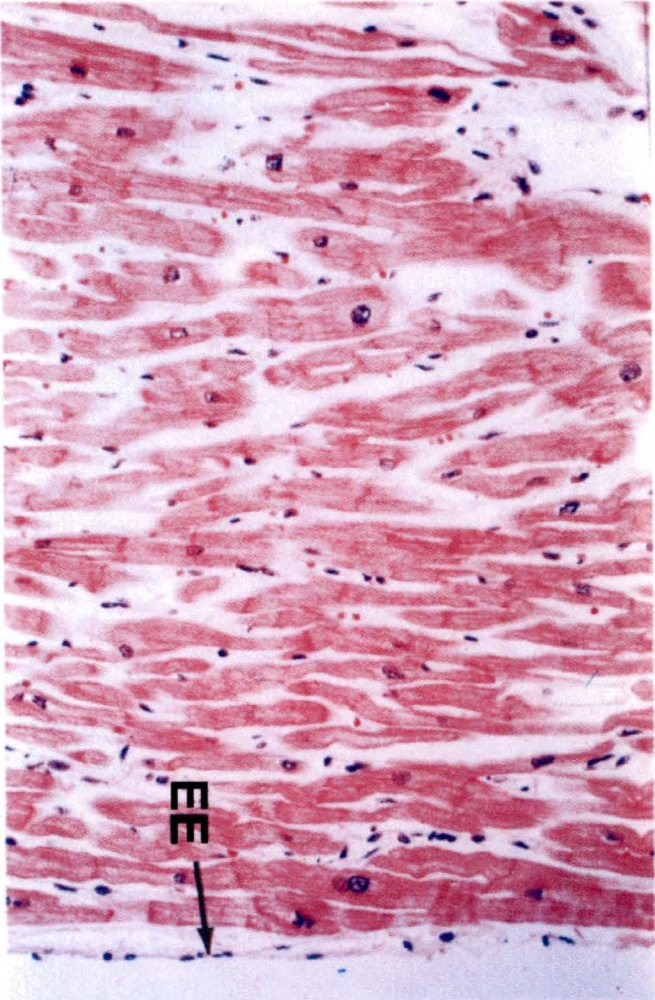
Comme mentionné auparavant, l'endocarde est la couche la plus interne du cœur et son épaisseur varie selon sa localisation. Un endocarde normal est plus épais au niveau des oreillettes qu'au niveau des ventricules, cette différence étant attribuée aux variations de la pression et des forces de cisaillement que subit ce tissu (FISHER *et al.*, 1958; BRUTSAERT *et al.*, 1992).

L'endocarde est divisé en 2 couches : l'endocarde proprement dit et la matrice sous-endothéliale endocardique ou extracellulaire (figure 1) située entre l'endocarde et le myocarde (RHODIN, 1974). Cette dernière est constituée d'une lame basale et d'une lame réticulée contenant des fibres de collagènes ainsi que d'une couche fibroélastique contenant des fibroblastes, des vaisseaux sanguins et un plexus de fibres et de fascicules nerveux dense composé de nerfs autonomes (sympathique et parasympathique) et sensoriels (figure 1) (DE HERT, 1993). Marron *et al.* (1994) ont démontré que les nerfs immunoréactifs pour le neuropeptide Y (NPY) sont les plus abondants. De plus, ces nerfs sont relativement plus marqués du côté droit par rapport au côté gauche du cœur et ce, dans les ventricules par rapport aux oreillettes. Il y a aussi une sous-population de nerfs relativement clairsemée à l'intérieur du plexus nerveux endocardique qui contient le polypeptide vasoactif intestinal (VIP) et la somatostatine (MARRON, *et al.*, 1994). Ceci suggère que les peptides et les neurotransmetteurs relâchés par les fibres nerveuses du

**Figure 1 L'endocarde, l'endothélium endocardique et la matrice extracellulaire.**

L'endothélium endocardique (EE) est la couche la plus interne du cœur et est constitué d'une mono-couche de cellules endothéliales. Entre ces cellules et les cardiomyocytes sous-jacents (couleur rose), il y a une matrice sous-endothéliale endocardique ou extracellulaire qui est constituée d'une lame basale et d'une lame réticulée contenant des fibres de collagènes ainsi que d'une couche fibroblastique contenant des fibroblastes, des vaisseaux sanguins et un plexus nerveux.

*Modifié de RHODIN, 1974.*



plexus nerveux peuvent influencer la contractilité du myocarde modulé par l'EE (MARRON *et al.*, 1994).

## **1.2. L'endothélium endocardique.**

L'endothélium endocardique est une fine monocouche de cellules endothéliales qui recouvre les cavités du cœur, les trabécules et les muscles papillaires cardiaques (RHODIN, 1974). Celui-ci a longtemps été considéré comme étant seulement une barrière entre le sang circulant et le myocarde, sans avoir de fonction particulière. Au fil des années, une fonction mécanique passive lui a été attribuée, celle de prévenir la compression de la vasculature au niveau de la matrice extracellulaire (BECKER, 1964).

Ce n'est qu'en 1986, et suite aux travaux de Brutsaert et de ses collaborateurs, que l'EE a été démontré comme étant une structure qui joue un rôle actif et important dans la régulation de la performance cardiaque (BRUTSAERT, 1986). Dès lors, plusieurs investigateurs se sont intéressés à l'étude de l'EE et à son rôle dans la fonction cardiaque.

### **1.2.1. Structure fonctionnelle.**

La surface cavitaire complexe de la paroi cardiaque est complètement recouverte par l'endothélium endocardique. Chez les vertébrés, les cellules endothéliales endocardiques (CEE) forment une couche continue de cellules polygonales, très rapprochées et serrées (YAMAUCHI, 1980). Au niveau des ventricules, cette monocouche a une épaisseur de 0.5  $\mu\text{m}$  (RHODIN, 1974). En plus de la vaste superficie

occupée par l'EE, la surface des CEEs présente un grand nombre de microvillosités et d'invaginations membranaires (EDANAGA, 1975; HARASAKI *et al.*, 1975; PEINE et LOW, 1975; SARPHIE et ALLEN, 1978). Cette architecture assure à l'EE une large surface de contact avec le sang circulant facilitant ainsi l'échange entre les CEEs et le sang et conférant à l'EE le rôle de capteur. De cette façon, l'EE peut non seulement sentir et transmettre au myocarde sous-jacent tout changement dans l'homéostasie sanguine, mais aussi participer à l'ajustement de ces changements.

Les CEEs possèdent un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi bien développés (MANDUTEANU *et al.*, 1988; ANDRIES et BRUTSAERT, 1991; ANDRIES, 1994; JACQUES *et al.*, 2003). De plus, ces cellules contiennent un grand nombre de mitochondries qui entourent un large noyau (JACQUES *et al.*, 2003). Toutes ces observations suggèrent que les CEEs sont métaboliquement très actives et possèdent l'arsenal nécessaire pour exécuter la fonction de sécrétion.

Les CEEs, comme les cellules endothéliales vasculaires (CEV), synthétisent le facteur Von Willebrand (vWF). Ce facteur joue un rôle important dans la coagulation sanguine, dans l'agrégation plaquettaire et dans l'adhérence des plaquettes à la matrice extracellulaire (SPORN *et al.*, 1989; PAGE *et al.*, 1992). Le vWF est emmagasiné dans de petites granules, caractéristiques des cellules endothéliales, les corps de Weibel-Palade (KLEIN et BÖCK, 1983; ANDRIES, 1994) qui ont été observés dans les CEEs de chat et de rat à l'aide de la microscopie électronique à transmission et de la microscopie confocale (ANDRIES et BRUTSAERT, 1990).

Le cytosquelette des CEEs joue un rôle dans le transport intracellulaire, la régulation de la forme cellulaire et l'adhésion cellulaire (BRUTSAERT et ANDRIES,

1992). Les filaments d'actine forment une bande périphérique qui est associée à la ceinture d'adhérence et participe à la régulation de la perméabilité entre les CEEs (ROTROSEN et GALLIN, 1986; WYSOLMERSKI et LAGUNOFF, 1988; SCHNITTLER *et al.*, 1990). Également, les CEEs possèdent un grand nombre de fibres de stress ou filaments d'actines. Celles-ci jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium en augmentant l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (GOTLIEB *et al.*, 1991) et en renforçant la surface des cellules endothéliales (WHITE *et al.*, 1983).

Les CEEs sont caractérisées par un chevauchement intercellulaire extensif et par la présence de fentes longues et profondes (MELAX et LEESON, 1967). Chez le rat, ces fentes possèdent des jonctions serrées (PAPPENHEIMER *et al.*, 1951; WARD *et al.*, 1988). De plus, l'espace intercellulaire ou les fentes sont recouvertes d'un glycocalyx chargé négativement. Toutes ces caractéristiques font de l'EE une barrière perméable et hautement sélective pour la diffusion des molécules et permet la régulation du transport entre les cellules (CLAUDE et GOODENOUGH, 1973). Les jonctions de type gap sont présentes en grandes quantités au niveau des fentes entre les CEEs avoisinantes (ANVERSA *et al.*, 1975; BRUTSAERT *et al.*, 1996). Ceci suggère d'une part un couplage électrochimique entre les CEEs (BRUTSAERT *et al.*, 1998) et d'autre part confirme que l'EE joue un rôle de capteur (BRUTSAERT *et al.*, 1996). En effet, ce type de communication permet l'intégration et l'amplification de la réponse suite à la stimulation même d'une seule CEE.



### **1.2.2. Rôle de l'endothélium endocardique.**

En 1988, Brutsaert et ses collaborateurs ont démontré les premières preuves expérimentales que les cellules endothéliales endocardiques influencent la fonction cardiaque. Ils ont étudié la réponse contractile des muscles papillaires de chat en présence et en absence de l'EE. La figure 2 montre une contraction isométrique en fonction du temps en présence et en absence de l'EE. La dénudation des CEEs du muscle papillaire provoque une diminution dans la tension maximale et une abréviation de la durée de contraction due à une relaxation précoce, et ceci d'une façon immédiate et irréversible. Cependant, aucun changement ne se produit dans la phase initiale de la contraction, plus spécifiquement dans la vitesse maximale de développement de la tension (BRUTSAERT *et al.*, 1988).

En 1992, Brutsaert et Andries ont postulé 2 mécanismes pour expliquer l'effet de l'EE sur la modulation de la performance cardiaque: 1- l'EE peut relâcher, suite à des stimuli humoraux et physiques, des facteurs cardiogéniques qui modulent la contraction du muscle cardiaque et 2- l'EE peut jouer le rôle d'une barrière physico-chimique entre le sang circulant et le myocarde, contrôlant ainsi la composition ionique du milieu interstitiel des cardiomyocytes (BRUTSAERT et ANDRIES, 1992).

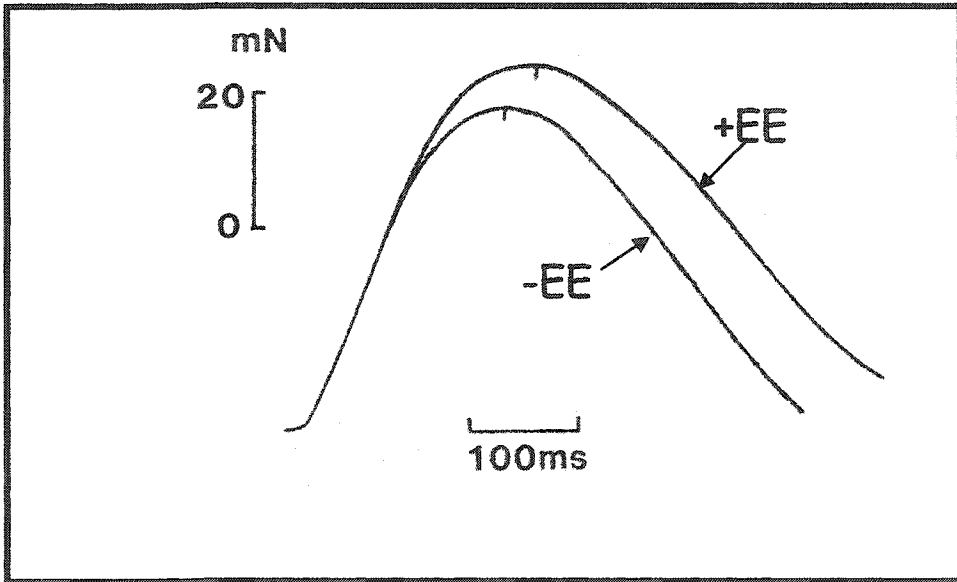
#### **1.2.2.1. Relâchement de facteurs cardiogéniques.**

Suite aux observations faites par Furchgott et Zawadzki montrant que l'endothélium vasculaire contrôle la contraction du muscle lisse vasculaire

**Figure 2 Effet de l'endothélium endocardique sur la contraction isométrique du muscle cardiaque.**

Cette figure montre la force d'une contraction isométrique en fonction du temps, en présence (+EE) et en absence (-EE) de l'EE au niveau d'un muscle papillaire de chat. La dénudation des CEEs induit un changement dans la contraction isométrique, qui se traduit par une relaxation précoce et une diminution de la force contractile, sans aucun changement significatif dans la première phase de la contraction. mN signifie millinewton tandis que ms signifie millisecondes.

*Modifié de BRUTSAERT et al., 1988.*



(FURCHGOTT et ZAWADSKI, 1980), un parallèle a été fait en ce qui a trait au rôle de l'EE vis-à-vis la contraction cardiaque. Comme mentionné plus haut, Brutsaert et ses collaborateurs étaient les premiers à aborder ce sujet en 1988. Suite à leur étude, plusieurs groupes de chercheurs se sont intéressés à ce sujet. Actuellement, l'EE est connu pour être un organe paracrine capable de relâcher ou d'activer une variété de médiateurs chimiques qui influencent directement le métabolisme, la croissance, la contraction et la rythmicité cardiaque (BRUTSAERT, 2003). Dans un cœur normal adulte, les CEEs produisent du monoxyde d'azote (NO) par l'action de la NO synthase constitutive (ecNOS) (SHAH *et al.*, 1991; DISCIGIL *et al.*, 1995), de l'endothéline-1 (ET-1) (WANG *et al.*, 1991; EVANS *et al.*, 1994; PRENDERGAST *et al.*, 1997), des adényl-purines (SHAH *et al.*, 1996), du neuropeptide Y (JACQUES *et al.*, 2003) et des prostaglandines (PG) (MEBAZAA *et al.*, 1993), possèdent une activité kininase permettant la détermination des niveaux locaux de l'Ang II et de la bradykinine et convertissent l'angiotensine I (Ang I) en Ang II par l'action de l'enzyme de conversion de l'Ang II (ACE) qui est localisée sur la membrane plasmique de ces cellules (figure 3) (LANG *et al.*, 1996; SHAH *et al.*, 1996).

#### 1.2.2.1.1. Le monoxyde d'azote.

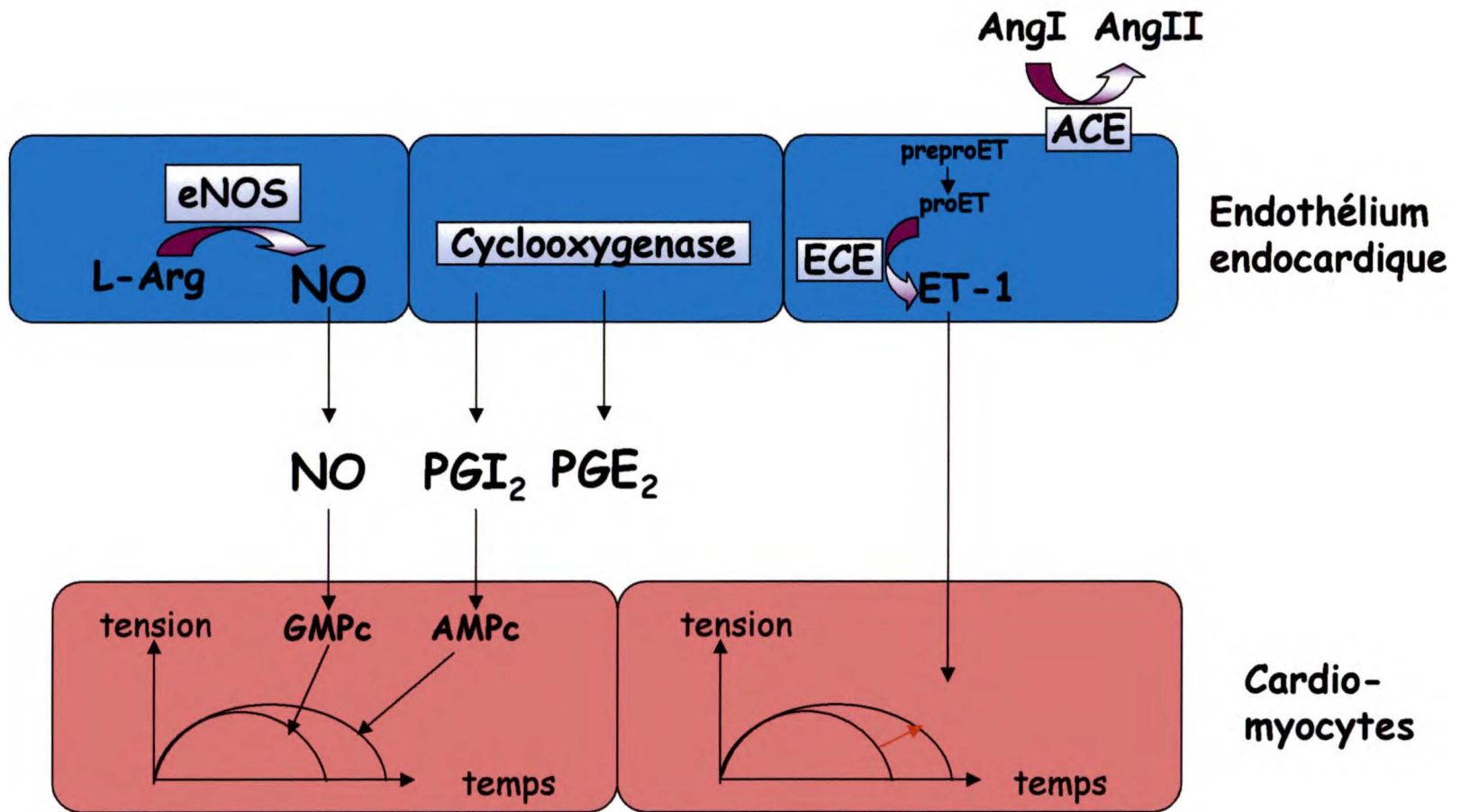
Le NO est produit à partir de la L-arginine suite à l'action des enzymes NO synthases (NOS) (ABU-SOUD et STUEHR, 1993; PALMER *et al.*, 1988). Le NO est impliqué dans le maintien du tonus et de la structure vasculaire (JOANNIDES *et al.*, 1997) et dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et de leur adhésion à la paroi

**Figure 3 Les facteurs libérés par l'endothélium endocardique.**

L'EE produit des facteurs qui peuvent moduler la fonction contractile du muscle cardiaque sous-jacent.

Ang = angiotensine; ACE = enzyme de conversion de l'angiotensine; ET-1 = endothéline-1; L-Arg = L-arginine; NO = monoxyde d'azote; eNOS = NO synthase endothéliale ; PGE<sub>2</sub> = prostaglandine E<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub> = prostaglandine I<sub>2</sub>; ECE= enzyme de conversion de l'endothéline ; preproET= preproendothéline ; proET= proendothéline.

*Modifié de PAULUS, 1994.*



vasculaire (KUBES *et al.*, 1991). Il joue également un rôle important comme neurotransmetteur (BREDT *et al.*, 1990) ainsi que dans la défense de l'organisme contre les microorganismes (HIBBS *et al.*, 1987). Au niveau intracellulaire, le NO active la guanylate cyclase soluble (GCs) (MONCADA *et al.*, 1991). Cet enzyme catalyse la conversion de la guanosine triphosphate en guanosine 3',5' monophosphate cyclique (GMPc) engendrant ainsi une élévation dans les taux de GMPc intracellulaire (MONCADA *et al.*, 1991).

Plusieurs études ont démontré que l'élévation du GMPc dans les cardiomyocytes de rat (SHAH *et al.*, 1994), l'administration du NO exogène ou de la substance P (stimule le relâchement du NO endogène) dans le muscle papillaire isolé de furet (SHAH *et al.*, 1991) ou dans le cœur isolé de cochon d'Inde (GROCOTT-MASON *et al.*, 1994) induisent une relaxation précoce de la contraction isométrique des cardiomyocytes avec une diminution de la force de contraction. Un effet similaire a été rapporté au niveau du cœur humain *in vivo* (PAULUS *et al.*, 1994). D'une façon opposée, d'autres études ont montré que le GMPc peut augmenter le calcium intracellulaire (DOLLINGER et WAHLER, 1994). Ces données contradictoires ont été réconciliées suite aux travaux de Laite-Moreira et ses collaborateurs et de Mohan et ses collaborateurs. Ces 2 groupes ont démontré que la réponse inotrope au NO est biphasique et dose-dépendante. Le NO, à de faibles concentrations correspondant à sa synthèse endogène, exerce une légère action inotrope positive contribuant au maintien de la contraction cardiaque basale dans les conditions physiologiques. Cependant, à des concentrations plus élevées comme dans le cas de l'activation de la NOS inductible et le cas de l'administration de doses

pharmacologiques de donneurs de NO, le NO cause une diminution de la contraction maximale (pour revue voir BRUTSAERT, 2003).

#### 1.2.2.1.2. L'endothéline-1.

L'endothéline-1 est un peptide composé de 21 acides aminés qui est synthétisé et libéré par les cellules endothéliales (YANAGISAWA *et al.*, 1988). L'ET-1 est le vasoconstricteur (YANAGISAWA *et al.*, 1988) et l'agent inotrope positif (LI *et al.*, 1991; MEBAZAA *et al.*, 1993a; McCLELLAN *et al.*, 1994) le plus puissant identifié jusqu'à présent. Son action inotrope ressemble à l'effet inotrope positif induit par l'EE (MEBAZAA *et al.*, 1993a; PRENDERGAST *et al.*, 1997) et elle a été expliquée en partie par une augmentation similaire de l'affinité des protéines contractiles au calcium (WANG *et al.*, 1991) suite à l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  au niveau de la sarcolemme (KRAMER *et al.*, 1991). Au niveau du système cardiovasculaire, des récepteurs à l'ET-1 ont été identifiés dans les cellules du muscle lisse vasculaire, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales (MOODY *et al.*, 1990; MOLENAAR *et al.*, 1993). En plus de son effet vasoconstricteur, l'ET-1 exerce des effets chronotropes et inotropes positifs au niveau du myocarde et peut induire la prolifération du muscle lisse vasculaire et l'hypertrophie cardiaque (YANAGISAWA *et al.*, 1988; SHUBEITA *et al.*, 1990; KRAMER *et al.*, 1992). De plus, les CEEs en culture à l'état non-stimulé expriment l'ARNm de l'ET-1 et relâchent dans le milieu de culture une quantité d'ET-1 suffisante pour causer un effet inotrope positif sur les cardiomyocytes isolés (MEBAZAA *et al.*, 1993a) via le récepteur  $\text{ET}_A$  (MOLENAAR *et al.*, 1993). Alternativement, l'ET-1



peut agir de façon autocrine en se liant directement au récepteur ET<sub>B</sub> sur la surface endothéliale et ainsi stimulant le relâchement du NO et de la prostacycline (DE NUCCI *et al.*, 1988; LUSCHER *et al.*, 1993).

Très récemment, nous avons démontré dans notre laboratoire que l'ET-1 augmente d'une façon dose-dépendante la concentration du calcium cytosolique ( $[Ca]_c$ ) et du calcium nucléaire ( $[Ca^{2+}]_n$ ) dans les CEEs du cœur foetal humain âgé de 20 semaines isolées à partir du ventricule droit (CEEDs) et gauche (CEEGs), avec un EC<sub>50</sub> plus faible au niveau des CEEGs ( $10^{-11}$  M) par rapport au CEEDs ( $10^{-10}$  M) (JACQUES *et al.*, 2000). Cet effet semble être dû principalement à l'activation des récepteurs ET<sub>A</sub>. Cependant, les récepteurs ET<sub>B</sub> semblent être impliqués en partie dans l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CEEDs. Ces résultats suggèrent l'existence d'une différence entre les CEEs isolées du ventricule droit par rapport à celles isolées du ventricule gauche (JACQUES *et al.*, 2000). D'autres groupes ont également démontré la présence des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, au niveau des CEEs humaines et de différentes espèces animales comme le porc et le rat (DAVENPORT *et al.*, 1989).

Il a été rapporté que l'effet inotrope positif de l'ET-1 implique une augmentation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique (VIGNE *et al.*, 1992; MEBAZAA *et al.*, 1993) ainsi que de la sensibilité des myofilaments au Ca<sup>2+</sup> (KELLY *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1991) probablement suite à une augmentation de l'hydrolyse des phosphoinositides (TAKANASHI et ENDOH, 1991; HILAL-DANDAN *et al.*, 1992) contribuant à l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_c$ . Plusieurs mécanismes ont été rapportés incluant une augmentation de l'influx calcique au niveau de la sarcolemme des cellules cardiaques à travers les canaux calciques de type T et L (LAUER *et al.*, 1992; FURUKAWA *et al.*,

1992; CURTIS *et al.*, 1993; BKAILY *et al.*, 1995; 1997), et un relâchement du  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves intracellulaires (VIGNE *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1991). De plus, notre groupe a démontré que l'ET-1 augmente l'influx calcique à travers les canaux calciques voltage dépendant de type R dans plusieurs types cellulaires incluant les cellules cardiaques ventriculaires, les cellules du muscle lisse vasculaire et les cellules endothéliales vasculaires et endocardiques (BKAILY *et al.*, 1995; 1997; JACQUES *et al.*, 2000).

#### 1.2.2.1.3. Les prostaglandines.

Les prostaglandines (PG) sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique (AA) suite à l'action de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) et la cyclooxygénase (COX) faisant partie de la cascade de l'AA. (NUTGEREN, 1966; LANDS et SAMUELSSON, 1968). La COX-1 est exprimée dans toutes les cellules endothéliales au niveau du cœur et confère des effets protecteurs (WODITSCH et SCHROR, 1992). Il a été reporté que la prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sont produites en grandes quantités par les CEEs en culture isolées à partir des ventricules droit et gauche du bovin, la production de la PGI<sub>2</sub> étant 10 fois plus que celle de la PGE<sub>2</sub> (MEBAZAA *et al.*, 1993). La pression transmurale augmente significativement le relâchement de la PGI<sub>2</sub> des cellules endothéliales endocardique de porc en culture, avec des valeurs 3 fois plus élevées au niveau du ventricule gauche par rapport au ventricule droit (NOSAKA *et al.*, 1997). Les effets inotropes des PGs sur la fonction cardiaque ne sont pas certains car les résultats rapportés dans la littérature sont contradictoires. La PGI<sub>2</sub> augmente la contractilité (effet inotrope positif) dans les oreillettes isolées du

cochon d'Inde (FASSINA *et al.*, 1983), n'a aucun effet dans les muscles papillaires isolés de chat (COULTENYE *et al.*, 1985) alors qu'elle diminue la contractilité (effet inotrope négatif) des cardiomyocytes isolés de rat (DAS *et al.*, 1983). Présentement, des preuves biochimiques montrent que des récepteurs à la PGI<sub>2</sub> et la PGE<sub>2</sub> sont présents au niveau des cardiomyocytes et qu'ils sont couplés à la voie du phosphoinositol-adenylate cyclase, suggérant que le mécanisme intracellulaire impliqué dans les effets cardiaques des PGs est relayé via l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Des recherches plus approfondies sont donc nécessaires afin de mieux comprendre l'effet des prostaglandines sur la modulation des fonctions cardiaques (pour revue voir SHAH *et al.*, 1996).

#### **1.2.2.2. L'endothélium endocardique est une barrière physico-chimique.**

Grâce à sa position unique entre le sang et les cardiomyocytes, et à sa perméabilité sélective due aux caractéristiques morphologiques décrites précédemment, l'EE peut réguler finement la composition ionique du liquide interstitiel entourant les cardiomyocytes (MOHAN *et al.*, 1995).

Des études électrophysiologiques récentes ont démontré la présence, sur la membrane de surface des CEEs, d'un grand nombre de canaux ioniques comme par exemple les canaux K<sup>+</sup> entrant retardés, les canaux K<sup>+</sup> activés par le Ca<sup>2+</sup>, les canaux Cl<sup>-</sup> activés par le volume, les canaux cationiques activés par l'étirement, les canaux calcique de type R et la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (LASKEY *et al.*, 1990; HOYER *et al.*, 1994; FRANSEN *et al.*, 1995; 1997; MANABE *et al.*, 1995; JACQUES *et al.*, 2000). Le transport des ions à travers les canaux ioniques et/ou via les pompes peut contribuer au

transport direct des ions du sang vers le liquide interstitiel des cardiomyocytes et vice versa (BRUTSAERT *et al.*, 1998).

Un trait unique de la barrière hémato-encéphalique est sa haute résistance électrique trans-endothéliale ( $1500-2000\Omega\text{cm}^2$ ) qui est beaucoup plus élevée que les autres barrières endothéliales ( $6-20\Omega\text{cm}^2$ ) (BANNON *et al.*, 1995). En 1998, BRUTSAERT et ses collaborateurs ont rapporté que la résistance électrique trans-endothéliale des CEEs isolées de porc est de l'ordre de 50 à 60  $\Omega\text{cm}^2$ . Ces valeurs sont 2 à 5 fois plus élevées que les autres barrières endothéliales suggérant ainsi que l'EE peut jouer le rôle d'une barrière active entre le sang et le liquide interstitiel des cardiomyocytes (BRUTSAERT *et al.*, 1998; 2003). De plus, à part son rôle comme régulateur de la performance cardiaque, l'EE en étant une barrière active entre le sang circulant et les myocytes cardiaques, contribue au maintien de l'homéostasie ionique dans le milieu interstitiel qui entoure les cardiomyocytes et probablement les fibres de Purkinje et le plexus neuronal présents dans la matrice extracellulaire (LINDEN et KAPPAGODA, 1982; YOKOTA, 1984; MARRON *et al.*, 1995 et pour plus de détails voir BRUTSAERT *et al.*, 1998; 2003).

### 1.3. L'angiotensine II.

L'Ang II, un octapeptide, est le médiateur principal des actions physiologiques du système rénine-angiotensine (RAS) qui joue un rôle majeur dans la régulation des systèmes cardiovasculaire et rénal (MORGAN et BAKER, 1991; TIMMERMANS *et al.*, 1992). Les actions biologiques de l'Ang II sont très diverses. Il module la pression

sanguine locale et systémique en induisant la contraction du muscle lisse vasculaire (TIMMERMANS *et al.*, 1992; 1993). De plus, ce peptide stimule la relâche de l'aldostérone de la glande surrénale ainsi que la rétention du sodium et de l'eau dans les tubules rénaux (LEVENS *et al.*, 1981). Il est à noter que l'Ang II est aussi impliqué dans l'hypertrophie des cellules du muscle lisse vasculaire et des cardiomyocytes ventriculaires (TIMMERMANS *et al.*, 1992; 1993). Au niveau des myocytes cardiaques, l'Ang II exerce un effet inotrope positif (DEMPSY *et al.*, 1971; FREER *et al.*, 1976; BAKER et SINGER, 1988), en augmentant la vitesse de l'augmentation de la phase de contraction et en retardant le début de la relaxation (MEULEMANS *et al.*, 1990). Cependant des effets contradictoires de l'Ang II ont été rapportés allant d'un effet inotrope positif, négatif à aucun effet dépendamment de l'espèce animale étudiée et des conditions expérimentales (BRUTSAERT, 2003).

### **1.3.1. Biosynthèse de l'Ang II : systémique et locale.**

La synthèse de l'Ang II se fait en grande partie dans la circulation par des clivages protéolytiques séquentiels de ses précurseurs (ATLAS, 1998). Cette synthèse est initiée par l'action protéolytique de la rénine sur l'angiotensinogène (Ang O), une  $\alpha_2$ -globuline circulante d'origine hépatique (STREATFEILD-JAMES *et al.*, 1998). La rénine est une aspartyl protéase synthétisée principalement par les cellules juxtaglomérulaires rénales (SEALEY *et al.*, 1977). Elle clive le décapeptide en position N-terminale de l'Ang O pour former l'Angiotensine I (Ang I), un précurseur biologiquement inactif (STREATFEILD-JAMES *et al.*, 1998). La conversion de l'Ang I en Ang II, la forme

active de l'hormone, se produit suite à l'action de l'ACE qui retranche à l'Ang I le dipeptide en position C-terminale (figure 4) (PEACH, 1977).

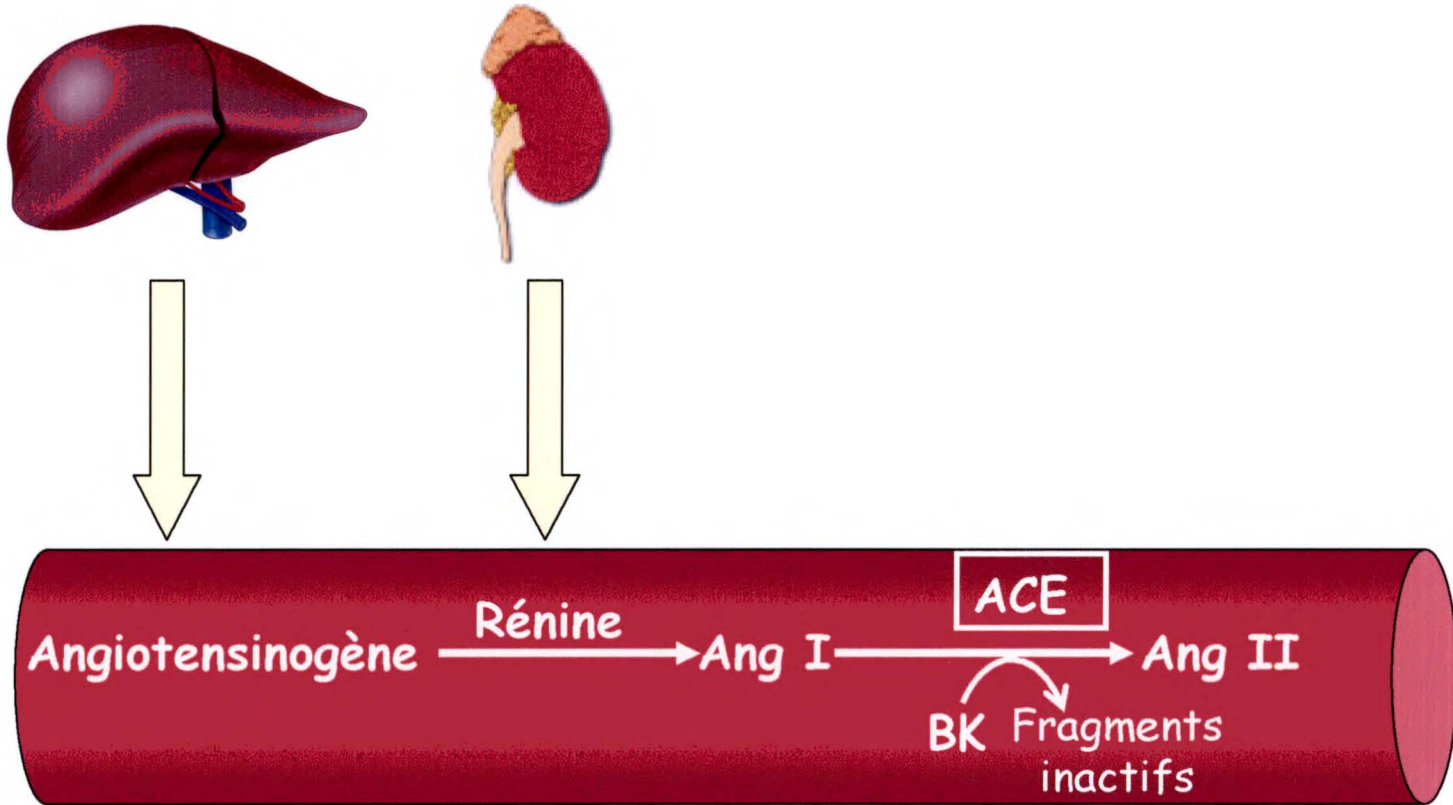
Les composantes du RAS sont présentes au niveau des tissus périphériques comme les vaisseaux (ROSENTHAL *et al.*, 1984), le cerveau (GANTEN et SPECK, 1978; GANONG, 1984), les reins (INGELFINGER et DZAU, 1991), les glandes surrénales (GANTEN *et al.*, 1983) et le cœur (BAKER *et al.*, 1992; SADOSHIMA et IZUMO, 1997). Il est à noter que tous ces tissus sont capables de produire de l'Ang II localement (JAN DANSER, 2003). Plus précisément au niveau des cardiomyocytes, des études moléculaires ont permis l'identification de l'ARNm de la rénine (DZAU *et al.*, 1987; PAUL *et al.*, 1988), de l'Ang O (CAMPBELL et HABENER, 1986; OHKUBO *et al.*, 1986; DZAU *et al.*, 1987) et de l'ACE (PAUL *et al.*, 1992; SCHUNKERT *et al.*, 1990). De plus, la présence de l'Ang II a été démontrée au niveau des oreillettes et des ventricules de chien (LUCHNER *et al.*, 1996), de cochon (DANSER *et al.*, 1994) et de rat (RUZICKA *et al.*, 1995). Pour ce qui est des cellules endothéliales, Kifor et Dzau (1987) ont montré que les cellules endothéliales aortiques de bovin contiennent de la rénine et de l'angiotensinogène et que ces cellules sont capables de synthétiser et de sécréter l'Ang II. De même plus récemment, Xiao *et al.* (2000) ont rapporté dans ce même type cellulaire la présence de la rénine et de son ARNm et la capacité de ces cellules de synthétiser et de sécréter l'Ang II. De plus, l'activité de l'ACE a été démontrée dans plusieurs préparations de cellules endothéliales incluant les cellules endothéliales des microvaisseaux pulmonaires de lapin (CARLEY *et al.*, 1990), des capillaires de cerveau de porc (MEYER *et al.*, 1990), de la veine ombilicale humaine

**Figure 4 Biosynthèse de l'Ang II**

Cette figure montre la voie par laquelle l'Ang II est synthétisée à partir de ses précurseurs.

En plus, toutes les composantes du RAS nécessaires pour la synthèse de l'Ang II sont présentes localement au niveau du cœur.

RAS= système rénine-angiotensine; Ang I= angiotensine I; Ang II= angiotensine II; BK= bradykinine; ACE= enzyme de conversion de l'angiotensine.





(WATANABE *et al.*, 1990) et les cellules endothéliales endocardiques de bovin (LANG *et al.*, 1996).

### 1.3.2. Les récepteurs à l'Ang II.

L'Ang II véhicule ses effets via 2 types de récepteur soient le récepteur AT<sub>1</sub> et le récepteur AT<sub>2</sub> (CHIU *et al.*, 1989; WHITEBREAD *et al.*, 1989; TIMMERMANS *et al.*, 1993). Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G (TIMMERMANS *et al.*, 1993; ZHANG et PRATT, 1996). Le récepteur AT<sub>1</sub> véhicule les effets classiques et stimulatoires de l'Ang II sur la pression sanguine, la rétention de l'eau et du sodium par les reins, la sécrétion de l'aldostérone, la croissance et la prolifération cellulaire alors que le récepteur AT<sub>2</sub> inhibe la prolifération cellulaire (MATSUBARA *et al.*, 1998) et promouvoit l'apoptose (YAMADA *et al.*, 1996). De plus, une accumulation de preuves expérimentales montre que la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> s'oppose aux actions de l'Ang II relayées par le récepteur AT<sub>1</sub> (pour revue, voir GALLIN *et al.*, 2000).

#### 1.3.2.1. Le récepteur AT<sub>1</sub>.

Le récepteur AT<sub>1</sub> a été cloné en 1991 (MURPHY *et al.*, 1991; SASAKI *et al.*, 1991). Chez l'homme, le gène du récepteur AT<sub>1</sub> se trouve sur le chromosome 3 (CURNOW, 1992). Le récepteur AT<sub>1</sub> est présent dans plusieurs tissus adultes tels les vaisseaux sanguins, le cœur, les reins, la glande surrénale, le foie, le cerveau et les poumons (TIMMERMANS *et al.*, 1993). Plusieurs antagonistes peptidiques et non-

peptidiques sélectifs du récepteur AT<sub>1</sub> ont été développés, comme par exemple le losartan, le candesartan, le valsartan, l'ibesartan, le tasosartan, et récemment, plusieurs de ces composés incluant le losartan, le candesartan et le valsartan sont utilisés cliniquement pour le traitement de l'hypertension (BAUER et REAMS, 1995; JOHNSTON, 1995; PITT et KONSTAM, 1998).

Suite à sa stimulation par l'Ang II, le récepteur AT<sub>1</sub> active plusieurs voies de signalisation :

1- Le récepteur AT<sub>1</sub>, par le biais de la protéine Gq à laquelle il est couplé, active la phospholipase C-β (PLC-β) (GRIENGLING *et al.*, 1989; MARRERO *et al.*, 1996) qui véhicule l'hydrolyse des phosphoinositides en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycérol (DAG) (RASMUSSEN et BARRET, 1984; CATT et ABBOT, 1991; SCHELLING *et al.*, 1991). L'IP<sub>3</sub> stimule la relâche du Ca<sup>2+</sup> des réserves intracellulaires (RASMUSSEN et BARRET, 1984; BERRIDGE *et al.*, 1984; BERRIDGE et IRVINE, 1984) tandis que la DAG active la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PKC résulte en la phosphorylation de substrats variés dépendamment du type cellulaire (NISHIZUKA *et al.*, 1984). Par exemple dans les CMLVs, l'augmentation de l'activité de la PKC induit la phosphorylation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK), la modulation de l'IP<sub>3</sub>, et une régulation de la prolifération cellulaire (LEE et SEVERSON, 1994; RASMUSSEN et BARRET, 1984). L'augmentation de l'activité de la PKC régule aussi le flux transmembranaire de Ca<sup>2+</sup> (ROMERO et RECKELHOFF, 1999; RASMUSSEN et BARRET, 1984).

2- La liaison de l'Ang II au récepteur AT<sub>1</sub> cause aussi l'activation de la voie des protéines kinases activées par mitogènes (MAPKs) (GRIENGLING *et al.*, 2000; DUFF *et*

*al.*, 1992; ISHIDA *et al.*, 1992), qui sont divisées en 4 catégories: a) les kinases régulées par signaux extracellulaires (ERK1/2); b) les kinases à N-terminal c-Jun (JNKs); c) les p38 MAPKs (KUSUHARA *et al.*, 1998); et d) la big MAPK-1 (GRIENGLING *et al.*, 2000). Ces MAPKs sont impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaires via l'activation de c-fos, c-myc et c-jun (MEZZANO *et al.*, 2001).

3- La liaison de l'Ang II au récepteur AT<sub>1</sub> cause aussi l'activation de la voie des tyrosine (Tyr) kinases (BERK et CORSON, 1997; MOLLOY *et al.*, 1993). Cette voie de signalisation mène à l'activation de plusieurs substrats, dont la kinase d'adhésion focale (FAK) (BERK et CORSON, 1997; POLTE *et al.*, 1994), la paxilline (BERK et CORSON, 1997; LEDUC et MELOCHE, 1995), la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) (BERK et CORSON, 1997; MARRERO *et al.*, 1995), la Janus kinase-2 (JAK2) ainsi que les activateurs de signal et transducteurs de la transcription-1 (STAT1) (BERK et CORSON, 1997; MARRERO *et al.*, 1995), le c-Src (ISHIDA *et al.*, 1995), la p130 CAS (SAYESKI *et al.*, 1998), JNK (SCHMITZ *et al.*, 1998), et Axl (BERK et CORSON, 1997). Des interactions du récepteur AT<sub>1</sub> avec d'autres récepteurs tels que ceux des facteurs de croissance (TGF $\beta$ , PDGF) ont aussi été suggérées (BERK et CORSON, 1997).

4- La liaison de l'Ang II au récepteur AT<sub>1</sub> active aussi la voie d'Akt (protéine kinase B), qui inhibe la glycogène synthase kinase 3 et stimule p70S6K (GRIENGLING *et al.*, 2000; GIASSON et MELOCHE, 1995).

5- Finalement, il a été rapporté que la liaison de l'Ang II au récepteur AT<sub>1</sub> cause aussi l'activation de la voie de signalisation de la p90RSK (TAKAHASHI *et al.*, 1997).

### 1.3.2.1.1. L'Ang II induit l'endocytose du récepteur AT<sub>1</sub>.

Plusieurs récepteurs au niveau de la membrane de surface sont internalisés suite à la liaison de leurs agonistes (BARAK *et al.*, 1994; MERJAN *et al.*, 2001). L'endocytose du complexe formé par le récepteur AT<sub>1</sub> et son agoniste, l'Ang II, a été démontrée dans plusieurs types cellulaires incluant les cellules du muscle lisse vasculaire (ULLIAN et LINAS, 1989; ANDERSON *et al.*, 1993), les cellules des tubules rénaux (SCHELLING *et al.*, 1992), et les cellules du cortex et de la médulla surrénaux (BIANCHI *et al.*, 1986; 1986a; CROZAT *et al.*, 1986; WANG *et al.*, 1994). Ce mécanisme permet non seulement de contrôler le nombre de récepteurs au niveau de la membrane de surface mais l'endocytose de l'Ang II avec son récepteur et sa dégradation ultérieure dans les lysosomes pourrait aussi servir à éliminer l'Ang II (CROZAT *et al.*, 1986; ANDERSON *et al.*, 1993). Hein *et al.* (1997) ont démontré que suite à l'internalisation et à la séquestration de l'Ang II avec le récepteur AT<sub>1</sub> dans des endosomes, l'Ang II est dirigé vers des lysosomes alors que le récepteur AT<sub>1</sub> est recyclé vers la membrane de surface.

Il a été rapporté que l'internalisation du récepteur AT<sub>1</sub> suite à la liaison de l'Ang II a lieu via des vésicules de clathrine au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire (ANDERSON et PEACH, 1994; CONCHON *et al.*, 1994). Des résultats similaires obtenus par notre groupe ainsi que par d'autres groupes de recherche confirment que cette endocytose est dépendante de la  $\beta$ -arrestine (GABORIK *et al.*, 2001; BKAILY *et al.*, 2003a). Cependant, il existe dans la littérature des preuves montrant que l'internalisation du récepteur AT<sub>1</sub> peut prendre place via la voie de la cavéoline ou via

des vésicules non-enrobées de clathrine (ZHANG *et al.*, 1996). La voie des cavéoles a en effet déjà été décrite dans les CMLVs (ISHIZAKA *et al.*, 1998).

#### 1.3.2.1.2. Distribution intracellulaire du récepteur AT<sub>1</sub>.

En 1971, Robertson et Khairallah ont rapporté la présence de sites de liaison de [<sup>3</sup>H]Ang II au niveau des membranes nucléaires des cellules du muscle lisse et du muscle cardiaque. Un peu plus tard, Anderson et Peach (1994) ont démontré que l'Ang II conjugué à de l'or colloïdal se lie au niveau de la membrane plasmique des cellules du muscle lisse de rat. Par la suite, ils ont observé que l'Ang II s'internalise et se lie à des sites présents au niveau des membranes nucléaires de ces cellules. De plus, il a été rapporté que le récepteur AT<sub>1</sub> est présent au niveau de la membrane nucléaire d'hépatocytes de rat et induit la transcription de l'ARNm de la rénine et de l'Ang O confirmant que ces récepteurs sont fonctionnels (TANG *et al.*, 1992; EGGENA *et al.*, 1993). Au même moment, Booz *et al.* (1992) ont montré la présence de sites de liaison à l'Ang II au niveau des noyaux d'hépatocytes de rat. De plus, il a été rapporté que le récepteur AT<sub>1</sub> nucléaire est différent du récepteur AT<sub>1</sub> présent au niveau de la membrane plasmique. Ces différences sont reliées à la sensibilité au pH, à l'affinité de liaison de l'Ang I et II et à la vitesse de dissociation de l'Ang II des récepteurs des membranes nucléaires par rapport à la membrane plasmique ainsi qu'au niveau de certaines propriétés physico-chimiques (TANG *et al.*, 1992; BOOZ *et al.*, 1992; EGGENA *et al.*, 1993). En 1998, Lu *et al.* ont démontré que le récepteur AT<sub>1</sub> possède une séquence de localisation nucléaire dans sa queue cytoplasmique et que l'Ang II induit la translocation

de ce récepteur au niveau du noyau des neurones (LU *et al.*, 1998). Le Losartan, antagoniste spécifique du récepteur AT<sub>1</sub>, inhibe ce ciblage nucléaire induit par l'Ang II, mais le PD123319, un antagoniste spécifique du récepteur AT<sub>2</sub>, n'a aucun effet sur ce ciblage (LU *et al.*, 1998). L'Ang II semble aussi induire la phosphorylation de p62, une protéine du complexe des pores nucléaires (NPC) (LU *et al.*, 1998). Cette phosphorylation est d'une importance primordiale pour la séquestration nucléaire du récepteur AT<sub>1</sub> (LU *et al.*, 1998). De plus, il a été démontré que l'Ang II injectée dans le cytoplasme se lie à des récepteurs intracellulaires et induit une augmentation de la [Ca]<sub>i</sub> dans les CMLVs (HALLER *et al.*, 1996). Il est à noter que cet effet n'est pas inhibé par un prétraitement extracellulaire avec le candesartan, un antagoniste du récepteur AT<sub>1</sub>, mais plutôt par un prétraitement intracellulaire de cet antagoniste (HALLER *et al.*, 1996). Récemment, il a été démontré que l'Ang II induit aussi l'internalisation et la translocation nucléaire du récepteur AT<sub>1</sub> couplé à la protéine verte fluorescente au niveau des cellules de l'ovaire du hamster chinois (CHEN *et al.*, 2000) et des cellules du muscle lisse vasculaire humain (BKAILY *et al.*, 2003a).

### 1.3.2.2. Le récepteur AT<sub>2</sub>.

Le récepteur AT<sub>2</sub> a été cloné à partir de bibliothèques génomiques de fœtus de rat et de cellules PC12W (MUKOYAMA *et al.*, 1993; KAMBAYASHI *et al.*, 1993; MARTIN *et al.*, 1994; TSUZUKI *et al.*, 1994). C'est une protéine de 362 acides aminés qui appartient à la famille de récepteurs possédant 7 domaines transmembranaires. Le récepteur AT<sub>2</sub> a été défini comme étant le récepteur qui lie de façon spécifique le CGP42112 ainsi qu'une

série de composés PD tels le PD123177 et le PD123319 (TIMMERMANS *et al.*, 1993; MATSUBARA, 1998). Le récepteur AT<sub>1</sub> et le récepteur AT<sub>2</sub> ne partagent que 32-34 % d'homologie au niveau des acides aminés (GALLINAT *et al.*, 2000). Cependant, ils ont une affinité similaire pour l'Ang II (GALLINAT *et al.*, 2000). Chez la souris et l'humain, le gène du récepteur AT<sub>2</sub> est localisé sur le chromosome X et ne contient aucun intron dans sa région codante excluant ainsi la possibilité de plusieurs sous-types de récepteur AT<sub>2</sub> (LAZARD *et al.*, 1994; MATSUBARA, 1998). Le récepteur AT<sub>2</sub> est exprimé de façon abondante dans les tissus fœtaux (GRADY *et al.*, 1991; MILLAN *et al.*, 1991; GRADY et KALINYAK, 1993). Par contre, son expression diminue rapidement après la naissance suggérant que le récepteur AT<sub>2</sub> joue un rôle important à certains stades durant le développement fœtal. Chez l'adulte, le récepteur AT<sub>2</sub> est présent de façon peu abondante dans certains organes comme l'utérus (MATSUMOTO *et al.*, 1996), les ovaires (MATSUMOTO *et al.*, 1996), le cerveau (MILLAN *et al.*, 1991; JOHREN *et al.*, 1996), le cœur (SAMYN *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1998) et les glandes surrénales (BREAULT *et al.*, 1996).

A l'opposé de la plupart des récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur AT<sub>2</sub> ne s'internalise pas suite à la liaison de son ligand endogène, l'Ang II, et ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (HUNYADY *et al.*, 1994; 1999; HEIN *et al.*, 1997). Contrairement au récepteur AT<sub>1</sub>, les voies de transduction employées par le récepteur AT<sub>2</sub> varient selon le type cellulaire (NAHMIAS et STROSBERG, 1995). Par exemple, suite à son activation, le récepteur AT<sub>2</sub>, via la protéine G<sub>i</sub>, stimule la sérine/thréonine phosphatase 2A (PP-2A) dans les neurones en culture (HUANG *et al.*, 1996; 1997) et la MAP kinase phosphatase 1 (MKP-1) dans la lignée cellulaire PC12W (HORIUCHI *et al.*,

1999) engendrant ainsi une diminution dans l'activité des MAP kinases régulées par des signaux extracellulaires ERK1/2. De plus, il a été rapporté que le récepteur AT<sub>2</sub> peut stimuler l'activité de la SHP-1, une phosphotyrosine phosphatase (PTP) soluble, dans les lignées cellulaires PC12W et NIE-115, via un mécanisme indépendant de la protéine G (BRECHLER *et al.*, 1993; BEDECS *et al.*, 1997). Il a été également démontré que la stimulation à court terme (1-10 minutes) du récepteur AT<sub>2</sub> par l'Ang II cause une augmentation de l'activité de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), une augmentation de la relâche de l'AA au niveau des cardiomyocytes de rats nouveau-nés (LOKUTA *et al.*, 1994), de l'épithélium des tubules proximaux de lapin (JACOBS et DOUGLAS, 1996) et au niveau des neurones en culture de cerveaux de rats nouveau-nés (ZHU *et al.*, 1998), ce dernier effet se produisant via une protéine G sensible à la toxine de pertussis (PTX) (ZHU *et al.*, 1998).

De plus, plusieurs études ont montré le rôle proapoptotique du récepteur AT<sub>2</sub>. Par exemple, la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau des cellules PC12W déprivées de sérum induit la mort cellulaire programmée (YAMADA *et al.*, 1996) en augmentant l'activité de la MAP kinase phosphatase 1 (HORIUCHI *et al.*, 1997) qui par la suite inhibe la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (HORIUCHI *et al.*, 1998). De plus, il a été rapporté que la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> par l'Ang II cause l'apoptose via l'activation de la caspase-3, une caspase effectrice (DIMMELER *et al.*, 1997).

Il a été également démontré que la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> potentialise le I<sub>K</sub> dépendant du voltage des neurones isolées de l'hypothalamus et de la médulla de rats nouveaux-nés (MARTENS *et al.*, 1996) et augmente l'activité des canaux Ca<sup>2+</sup> au niveau des cellules NG108 (BUISSON *et al.*, 1992).



#### 1.4. Le calcium.

Le calcium joue un rôle critique dans la régulation des fonctions cellulaires (KATZ, 1969). Il est essentiel au couplage excitation-contraction des cellules musculaires comme les CMLVs et les cardiomyocytes (BOLTON, 1979; BKAILY, 1994c; BKAILY *et al.*, 1996, 1997, 2000) ainsi qu'au couplage excitation-sécrétion des cellules sécrétrices comme les cellules endothéliales (pour détails voir la revue de NILIUS et DROOGMANS, 2001). Il est également requis lors de la croissance cellulaire (MARKS, 1992; BERRIDGE, 1995). Il est généralement accepté que la synthèse et/ou la relâche des pro- et anticoagulants, des facteurs de croissances, et des composés vasoactifs tels le NO et la PGI<sub>2</sub>, par les cellules endothéliales vasculaires, dépendent ou peuvent être modulés par le changement de [Ca]<sub>i</sub> (BUSSE *et al.*, 1991; CARTER et PEARSON, 1992; INAGAMI *et al.*, 1995; NILIUS et CATEELS, 1994; NILIUS *et al.*, 1997). Par exemple, le NO est produit par la eNOS via l'activation d'une voie Ca<sup>2+</sup>/calmoduline (CaM) dépendante qui nécessite un influx calcique à travers la membrane de surface (GRAIER *et al.*, 1992; IOUZALEN *et al.*, 1996; LANTOINE *et al.*, 1998). À l'état de repos, la eNOS est inactive, et ceci est dû à sa liaison à la cavéoline-1 (CAV-1) (PARTON, 1996). L'augmentation du [Ca]<sub>i</sub> favorise la liaison de la eNOS à la CaM et sa dissociation de la CAV-1 et par conséquent, son activation et le relâchement du NO (pour revue, voir les articles de FERON *et al.*, 1997; MICHEL *et al.*, 1997; MICHEL et FERON, 1997; PRABHAKAR *et al.*, 1998). De plus, la synthèse de la PGI<sub>2</sub> nécessite une augmentation du [Ca]<sub>i</sub> et une phosphorylation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (PATEL *et al.*, 1996). L'augmentation du [Ca]<sub>i</sub> favorise la translocation de la PLA<sub>2</sub> du cytosol aux

phospholipides membranaires, surtout au niveau de la membrane de surface et de la membrane nucléaire. Cette translocation se produit grâce à un domaine de liaison au phospholipide présent à son extrémité NH<sub>2</sub>-terminale qui est Ca<sup>2+</sup>-dépendante (CLARK *et al.*, 1995; FREARSON *et al.*, 1995). En résumé, la production des composés vasoactifs nécessite une augmentation du [Ca]; soit par une relâche des réserves intracellulaires du calcium ou soit par un influx calcique à travers la membrane de surface via l'activation des canaux calciques (pour revue, voir NILIUS et DROOGMANS, 2001).

#### 1.4.1. Les canaux calciques.

Il existe deux grandes familles de canaux calciques, les canaux calciques opérés par voltage (VOCC) et les canaux calciques opérés par récepteur (ROCC) (BARRITT, 1999). Les VOCCs sont sensibles à des variations du potentiel de la membrane provoquées par des stimuli électriques ou chimiques tandis que les ROCCs sont seulement sensibles aux stimuli chimiques (BOLTON, 1979; TSIEN *et al.*, 1988)

La littérature rapporte actuellement l'existence de six types de VOCCs, soient les canaux calciques de type P/Q, N, R (résistant aux bloqueurs des canaux calciques connus), L, T et R (repos) (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997; TRIGGLE, 1999; FISHER et BOURQUE, 2001). Tous ces canaux se distinguent par leurs caractéristiques d'ouverture et de fermeture ainsi que par leurs seuils d'activation et leurs distributions dans les tissus (HOSEY et LAZDUNSKI 1988; SPEDDING et PAOLETTI 1992; BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997; TRIGGLE, 1999; FISHER et BOURQUE, 2001).

Les canaux de type P/Q s'activent à partir d'un seuil près de  $-40\text{mV}$  et possèdent une conductance de 10 à 12 pS (LLINAS *et al.*, 1989; REGAN *et al.*, 1991). Ces canaux semblent constituer la majorité des canaux calciques au niveau du cerveau où ils sont responsables, dans certaines régions, de la libération de neurotransmetteurs (HILLMAN *et al.*, 1991). Les canaux calciques de type N s'activent à partir d'un voltage de  $-30\text{ mV}$ . Ces canaux ont une conductance de 12 à 20 pS et ils produisent un courant moyen intermittent (WILLIAMS *et al.*, 1992; FUJITA *et al.*, 1993). Ils sont principalement exprimés dans les neurones et jouent un rôle important dans la libération de neurotransmetteurs (CATTERALL et STRIESSNIG, 1992). Les canaux calciques de type R (résistants) s'activent à partir d'un voltage de  $-30\text{ mV}$  et possèdent une conductance de 15 pS (pour plus de détails voir la revue de TRIGGLE, 1999 et de FISHER et BOURQUE, 2001). Ces canaux sont aussi présents au niveau du cerveau (TAKAHASHI et MOMIYAMA, 1993; REGEHR et MINTZ, 1994; WHEELER *et al.*, 1994; WU et SAGGAU, 1994; MINTZ *et al.*, 1995) et jouent également un rôle dans la libération de neurotransmetteurs (QIAN *et al.*, 1997).

Les canaux calciques de type L et T sont présents dans les cellules cardiaques (FOX *et al.*, 1987). Les canaux calciques de type L possèdent un seuil d'activation élevé ( $\sim -30\text{ mV}$  en présence de  $10\text{ mM Ca}^{2+}$ ) et conduisent un courant lent ayant une large conductance unitaire (25 pS en  $110\text{ mM Ba}^{2+}$ ) (NOWYCKY *et al.*, 1985). Les canaux calciques de type T s'activent et s'inactivent relativement rapidement à partir d'un potentiel de membrane plus négatif et possèdent une petite conductance unitaire (8 pS en  $110\text{ mM Ba}^{2+}$ ) (NOWYCKY *et al.*, 1985; MITRA et MORAD, 1986).

Dans les cellules endothéliales, il ne semble pas exister de canaux calciques de type P/Q, N, R (résistant), L ou T (TAKEDA *et al.*, 1987; NILIUS et RIEMANN, 1990; TAKEDA *et* KLEPPER, 1990). Cependant, il a été rapporté la présence des canaux calciques de type R (repos) dans ces cellules (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997a). L'existence de ces canaux calciques a été initialement suggérée par BAKER *et al.* (1971) qui a montré que ce type de canal permettait l'entrée passive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule pendant une dépolarisation membranaire de longue durée. Ils furent également nommés canaux calciques du potentiel de repos (R) par DIPOLO en 1979. Contrairement aux autres types de canaux calciques dépendants du voltage, les canaux calciques de type R n'ont pas de porte d'inactivation (DIPOLO, 1979; BKAILY, 1991; BKAILY *et al.*, 1997). Ces canaux sont activés lors d'une dépolarisation soutenue de la membrane cellulaire, possèdent une conductance de 24 pS et sont bloqués par l'isradipine (BKAILY, 1991; BKAILY *et al.*, 1997).

Dans les cellules du muscle lisse vasculaire, ces canaux calciques de type R sont responsables des augmentations soutenues de calcium durant la contraction soutenue du muscle lisse par différents agents vasoactifs et proinflammatoires comme le PAF, l'endothéline-1 ainsi que l'insuline (BKAILY *et al.*, 1992, 1993; BKAILY, 1994a, 1994b; TAOUDI-BENCHECROUN *et al.*, 1995). De plus, l'influx de calcium via les canaux calciques de type R est principalement responsable du maintien de la concentration de calcium intracellulaire normale physiologique et du tonus de base du muscle lisse vasculaire (BKAILY *et al.*, 1991). Il a été également rapporté que ces canaux semblent être impliqués dans des phénomènes de sécrétion basale de l'endothélium vasculaire (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997a).

### 1.5. Résumé de la littérature et hypothèse et objectifs de travail.

L'octapeptide Ang II est le médiateur principal des actions physiologiques du système rénine-angiotensine. Chez l'humain, ces effets sont relayés via 2 types de récepteurs, soient les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. La majorité des travaux de recherche portant sur l'Ang II a été effectuée au niveau du cerveau, des reins, des glandes surrénales, du cœur et des vaisseaux sanguins incluant les cellules endothéliales vasculaires. Cependant, aucune étude n'a démontré l'effet de l'Ang II sur l'endothélium endocardique (EE) qui tapisse les cavités cardiaques et qui joue un rôle très important dans la régulation de la performance cardiaque. Des études récentes montrent que l'Ang II est sécrété par les cellules endothéliales vasculaires (KIFOR et DZAU, 1987; KUSAKA *et al.*, 2000; XIAO *et al.*, 2000) et que l'enzyme de conversion de l'Ang II est présent à la surface des cellules endothéliales endocardiques (CEEs) (BRUTSAERT, 2003). Cependant, aucune étude n'a démontré la présence de l'Ang II et de ses récepteurs au niveau de l'EE. Dans notre laboratoire, nous avons développé des cultures primaires de cellules endothéliales endocardiques isolées à partir du ventricule droit et gauche du cœur foetal humain âgé de 20 semaines. Nous avons récemment démontré que ces cellules possèdent des récepteurs au neuropeptide Y (NPY) ainsi que le NPY lui-même et qu'il existe des différences entre les CEEDs et les CEEGs en ce qui a trait à leurs distributions et à leurs contributions à la modulation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire des CEEs (SADER, 2002). De plus, nous avons rapporté que les CEEs possèdent les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> et que le récepteur ET<sub>B</sub> participe à l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire par l'ET-1 seulement au niveau des CEEDs (JACQUES *et al.*, 2000). Nous avons également démontré dans cette même étude

que l'ET-1 induit une augmentation dose-dépendante du calcium cytosolique et nucléaire avec des valeurs d' $EC_{50}$  plus faibles au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs (JACQUES *et al.*, 2000). La littérature a également rapporté des études qui montrent l'existence de quelques différences entre les CEEDs et les CEEGs dans d'autres espèces (BRUTSAERT, 2003). Par exemple, il a été rapporté que les CEEs isolées à partir du ventricule gauche du cœur de porc adulte libèrent plus de  $PGI_2$  lorsque la pression transmurale est augmentée par rapport aux CEEs isolées du ventricule droit (NOSAKA *et al.*, 1997) tandis que l'expression et les sites de liaison au peptide natriurétique sont plus abondants au niveau des CEEs isolées à partir du ventricule droit du cœur de rat adulte par rapport aux CEEs isolées du ventricule gauche (KIM *et al.*, 1999). Dans ce mémoire, nous avons voulu tester l'hypothèse que comme le NPY et l'ET-1, l'Ang II et ses récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  sont présents au niveau des CEEs du cœur foetal humain âgé de 20 semaines. De plus, leurs densités, distributions ainsi que leurs effets sur le  $Ca^{2+}$  intracellulaire sont différents dans les CEEs isolées à partir du ventricule droit (CEEDs) par rapport aux CEEs isolées du ventricule gauche (CEEGs). Le traitement des CEEDs et des CEEGs âgées de 20 semaines avec de l'Ang II peut induire la mobilisation de ses récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  de façon différente au niveau de celles-ci. Afin de tester ces hypothèses, nous proposons de répondre aux questions suivantes :

- 1- Est-ce que les cellules endothéliales endocardiques contiennent de l'Ang II?
- 2- Est-ce que les cellules endothéliales endocardiques possèdent des récepteurs à l'Ang II?
- 3- Est-ce que ces récepteurs sont localisés préférentiellement sur la membrane de surface et/ou nucléaire?

- 4- Est-ce qu'il existe une différence entre les CEEDs et les CEEGs en terme de densité et de distribution de l'Ang II et des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>?
- 5- Est-ce que la stimulation des récepteurs à l'Ang II module le [Ca]<sub>c</sub> et [Ca]<sub>n</sub> au niveau des CEEDs et des CEEGs?
- 6- Est-ce que le traitement des CEEDs et des CEEGs avec de l'Ang II induit la mobilisation de ses récepteurs?

Afin de répondre à ces questions nous avons utilisé des CEEs isolées à partir des ventricules droit et gauche des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Les techniques utilisées sont l'immunofluorescence indirecte, l'immunobuvardage western et la méthode de mesure du [Ca]<sub>c</sub> et [Ca]<sub>n</sub> en utilisant la sonde calcique le Fluo-3/AM, ainsi que l'imagerie tridimensionnelle générée par la microscopie confocale.

## **II. MATÉRIEL ET MÉTHODES**



## **2.1. Isolation et culture des cellules endothéliales endocardiques du cœur foetal humain âgé de 20 semaines ainsi que de rat adulte.**

Les cellules endothéliales endocardiques sont isolées à partir du ventricule droit et gauche (CEEDs et CEEGs, respectivement) du cœur foetal humain âgé de 20 semaines et de rat adulte en utilisant la trypsine et des méthodes mécaniques (JACQUES *et al.*, 2000; BKAILY *et al.*, 1997). La procédure est en accord avec les recommandations du comité de l'utilisation des matériaux humains.

Les cœurs foetaux humains sont prélevés dans des conditions aseptiques. Ils sont immédiatement déposés dans un bêcher contenant une solution stérile de S-MEM (Milieu Essentiel Minimal de Suspension) ayant la composition suivante: NaCl (120 mM), KCl (5 mM), MgSO<sub>4</sub> (0.8 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM) (Gibco BRL; Burlington, ON) et supplémentée de Penicilline-G-Potassium (Ayerst; Montréal, QC). Par la suite, les ventricules sont disséqués et nettoyés du sang avec du milieu M199 (Gibco BRL, Burlington, Ont.) stérile, contenant de la Pénicilline et de la Streptomycine (Gibco BRL; Burlington, Ont.). Afin d'isoler les CEEDs et les CEEGs, les ventricules ouverts sont placés dans un pétri de culture avec leur face luminale dirigée vers le haut, et sont par la suite exposés à la trypsine (0.05%) (Whittaker; Walkerville, MD) pour 5 minutes. L'endothélium endocardique des deux côtés ventriculaires est ensuite gratté délicatement avec la lame d'un scalpel. Les cellules grattées sont lavées avec du milieu M199 (Gibco BRL; Burlington, Ont) supplémenté de 10% FBS (sérum bovin foetal) (Gibco BRL, Burlington, Ont). Après une centrifugation de 10 min à 1000 rpm (révolution par min), le milieu de culture est éliminé et le culot de cellules est suspendu dans un milieu M199

supplémenté de FBS (10%). Par la suite, les cellules sont dispersées dans des pétris (JACQUES *et al.*, 2000). Pour les études sur des cellules fraîchement isolées, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre disposées dans des boîtes de pétris de 35 mm de diamètre, ou bien directement dans des boîtes de pétris de 100 mm (BKAILY *et al.*, 1992), et elles sont incubées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Pour produire des cultures cellulaires primaires, les CEEDs et les CEEGs sont cultivées dans des flacons de culture (GibcoBRL, Burlington, Ont.) et incubées comme ci-haut mentionné. À confluence, les cellules sont détachées par trypsinisation et recultivées dans du milieu M199 supplémenté de FBS (10%) (JACQUES *et al.*, 2000; BKAILY *et al.*, 1997).

Une vérification de la qualité et de la pureté des CEEDs et des CEEGs est faite en utilisant une sonde fluorescente spécifique aux résidus  $\alpha$ -fucose présents dans le glycocalyx des cellules endothéliales. Cette sonde est la "Lectin Ulex Europeans Agglutinin" conjuguée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (6 $\mu$ g/ml pour 2 heures à la température de la pièce; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) (JACQUES *et al.*, 2000; BKAILY *et al.*, 1997). Les CEEDs et CEEGs se caractérisent par la présence d'un réseau bien développé de réticulum endoplasmique et d'un grand nombre de mitochondries qui entourent un noyau assez volumineux (BKAILY *et al.*, 1999; JACQUES *et al.*, 2000). Ces cellules possèdent aussi un canal calcique de type R fonctionnel, insensible à la nifédipine mais sensible à l'isradipine (JACQUES *et al.*, 2000).

## **2.2. Microscopie confocale.**

La microscopie confocale offre plusieurs avantages significatifs sur la microscopie à fluorescence conventionnelle: elle permet la génération d'images optiques sériées par élimination de la lumière hors foyer (BKAILY *et al.*, 1997; NIGGLI et LEDERER, 1991) et offre une résolution d'environ 30% supérieure au microscope conventionnel. Elle permet entre autre un sectionnement non-invasif d'échantillons biologiques ainsi que leur reconstruction en trois dimensions sous n'importe quel angle ou plan de coupe (NIGGLI *et al.*, 1994). Le système confocal utilisé au cours de cette étude est un Multi Probe 2001 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) muni d'un laser à argon équipé d'un microscope à épifluorescence à phase inverse (Diaphot Nikon) et d'un objectif achromat (Nikon Oil Plan) de 60 X.

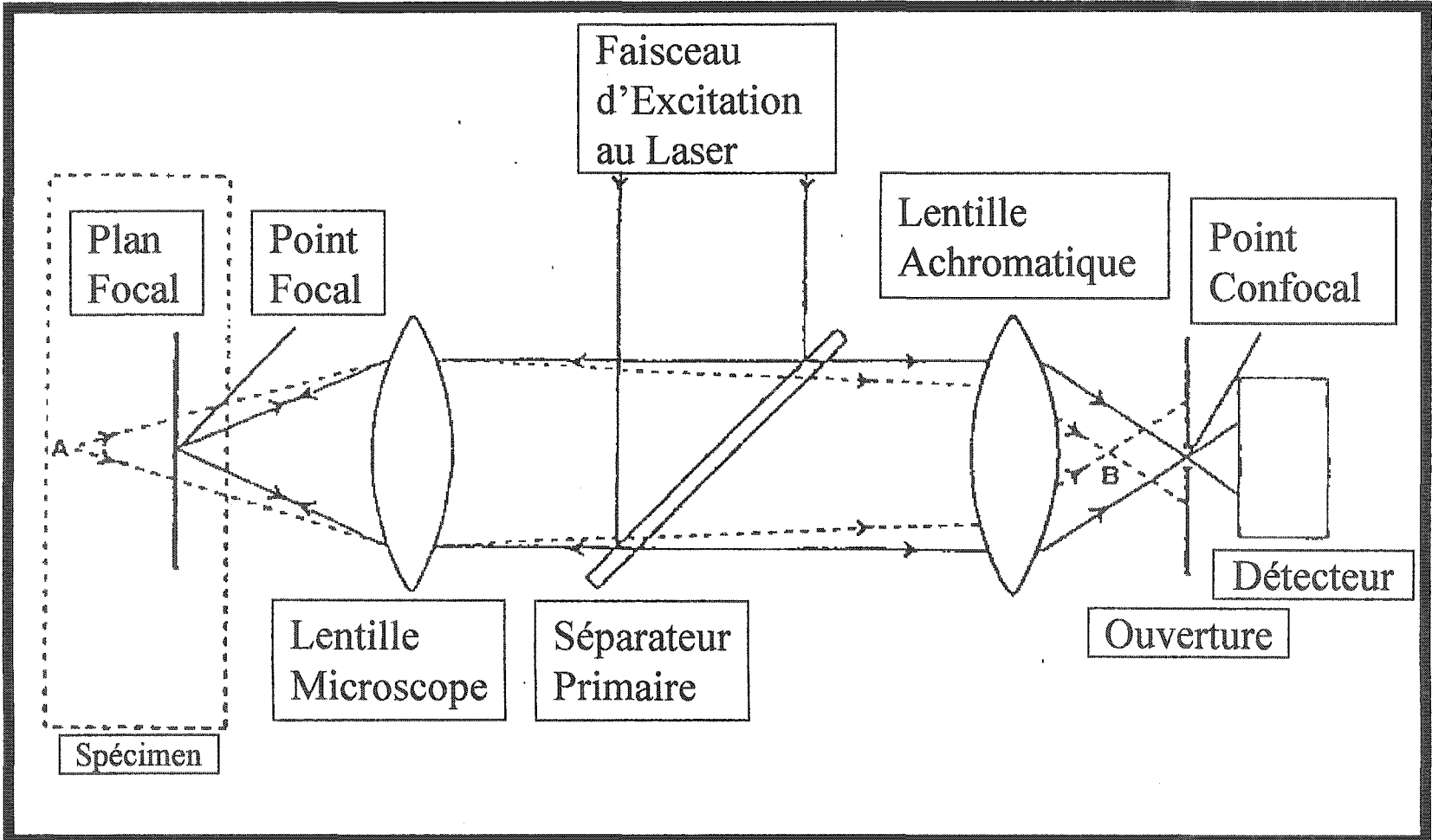
### **2.2.1. Principe de base.**

Dans le système confocal, la lentille du microscope dirige le faisceau de lumière laser vers un point donné de l'échantillon, appelé le point focal (figure 5). La lumière émise (ou réfléchi) par ce point reprend le même chemin à travers le microscope. Les compartiments optiques du microscope focalisent la lumière de ce point vers un deuxième point, appelé le point confocal. Un système de volets ou ouvertures, positionnés au point confocal, ne laisse passer que la lumière provenant du point focal de se rendre au détecteur. Toute lumière incidente provenant de points au-dessus ou en dessous du plan focal, et par conséquent hors foyer, est rejetée par l'ouverture confocale (Manuel d'utilisation du microscope Multi probe 2001).

**Figure 5      Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale.**

Dans le système de la microscopie confocale, la lumière d'excitation venant du laser passe par un séparateur primaire et est convergée par les lentilles du microscope au point focal de l'échantillon. Une faible quantité de lumière du laser converge sur d'autres points du plan focal. La fluorescence provenant de l'échantillon repasse par le séparateur primaire afin de séparer la fluorescence émise de celle qui est reflétée. La fluorescence émise est convergée par la lentille achromatique au point confocal et est enregistrée par le détecteur. Tout rayon frappant l'ouverture à des points autres que le point confocal n'est pas détecté.

*(modifié du manuel d'utilisation du microscope Multi Probe 2001).*



### 2.2.2. Balayage des cellules.

Le laser d'argon (9.0 mV), à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm, est dirigé sur l'échantillon via un filtre dichroïque primaire de 510 nm et est atténué avec un filtre de densité neutre de 1-3% afin de réduire la défluorescence. L'ouverture confocale est de 100  $\mu\text{m}$ .

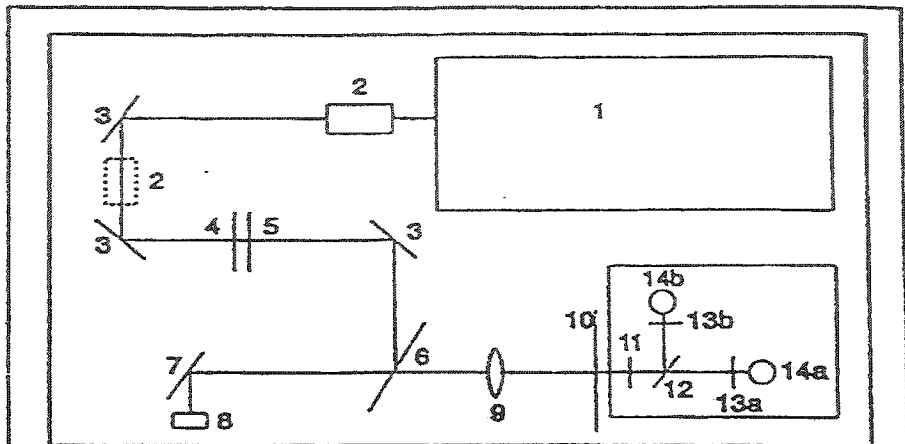
Pour toutes les expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34  $\mu\text{m}$ . L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales (figure 6). Les cellules sont balayées le long de l'axe Z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise de mesures du niveau basal de l'intensité de fluorescence ainsi que de la réponse cellulaire suite à l'ajout de différents agents, dans le cytosol aussi bien que dans le noyau (BKAILY *et al.*, 1997).

### 2.3. Chargement des cellules avec la sonde calcique Fluo-3.

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre qui conviennent à leur montage dans une chambre de 1 ml. Les cellules sont lavées trois fois avec 2 ml d'une solution de Tyrode (Sigma, St Louis, Mo, E.U.A) ayant comme composition HEPES 5 mM, NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.9 mM, glucose 5.6 mM, pH 7.4 ajusté avec du Tris base, le tout supplémenté de 0.1% de BSA

**Figure 6 Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale.**

*(Modifié du manuel d'utilisation du microscope Multi Probe 2001)*



1. Laser
2. Extenseur de faisceau
3. Miroirs
4. Roulette de filtres d'émission
5. Roulette de filtres d'atténuation
6. Séparateur de faisceau primaire
7. Miroir à balayage lent
8. Miroir à balayage rapide
9. Lentilles achromatiques
10. Roulette d'ouverture confocale
11. Filtre de barrière
12. Séparateur de faisceau dichroïque secondaire
- 13 a) Filtre détecteur 1
- 13 b) Filtre détecteur 2
- 14 a) Détecteur PMT 1
- 14 b) Détecteur PMT 2



(albumine de sérum bovin) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). L'osmolarité de la solution de Tyrode avec ou sans BSA est ajustée à 310 mOsm avec du sucrose à l'aide d'un osmomètre (Advanced Instruments Inc., MA).

La sonde calcique, Fluo-3/AM (Molecular Probes, Eugene, OR), est diluée dans une solution de Tyrode contenant du BSA à partir d'une solution stock congelée de 1 mM: la concentration finale de la sonde utilisée est de 13 $\mu$ M (BKAILY *et al.*, 1997).

Les cellules sont incubées, suivant la méthode de lamelle renversée, en présence de 100  $\mu$ l de sonde diluée placée sur une plaque de verre enveloppée de parafilm, pendant 60 minutes. L'incubation se fait, à l'abri de la lumière, dans un environnement humide afin de minimiser l'évaporation de la sonde calcique (BKAILY *et al.*, 1997).

Après la période d'incubation, les lamelles sont récupérées et les cellules sont lavées deux fois dans la solution Tyrode-BSA puis deux fois dans la solution Tyrode seule. Les cellules chargées sont ensuite laissées dans la solution Tyrode pour 15 min afin de s'assurer de l'hydrolyse totale des groupements acétoxyméthyls esters et de se débarrasser ainsi de la forme estérifiée de la sonde calcique (forme AM de la sonde Fluo-3/AM) qui est incapable de lier le Ca<sup>2+</sup> libre (BKAILY *et al.*, 1997).

#### **2.4. Marquage du noyau.**

À la fin de chaque expérience, le noyau est marqué avec le Syto-11, un marqueur des acides nucléiques (Molecular Probes, Eugene, OR), à une concentration de 100 nM. Les cellules sont balayées par sections sériées immédiatement après le développement du marquage (8-10 min). La position, le nombre de sections ainsi que l'incrément entre ces

dernières sont maintenus identiques à ceux utilisés au cours de l'expérience. Une reconstruction en trois dimensions du noyau est réalisée afin de délimiter le calcium nucléaire du calcium cytosolique (BKAILY *et al.*, 1997).

Les images balayées sont transférées à une station d'analyse Indy de Silicon Graphics équipée d'un logiciel d'analyse et de reconstruction "Imagespace" de Molecular Dynamics. La reconstruction des images en 3D est présentée en projections d'intensité maximale générant une série d'images montrant l'intensité maximale des unités voxels (BKAILY *et al.*, 1997).

Les images des cellules chargées au Fluo-3 sont représentées en pseudo-couleur suivant une échelle d'intensité allant de 0 à 255 où le noir indique l'intensité zéro et le blanc l'intensité maximale. Les mesures de calcium dans le noyau sont effectuées sur des images individuelles et sur des reconstructions en 3D (sections sériées). La région du noyau, marquée au Syto-11, est isolée du reste de la cellule en fixant un seuil inférieur d'intensité afin de délimiter les pixels de cet espace. Une série d'images binaires du volume nucléaire est générée en 3D pour chaque cellule en utilisant les mêmes paramètres pour les positions x, y, et z que ceux utilisés pendant les mesures calciques. En appliquant ces images binaires aux cellules chargées avec la sonde calcique, une nouvelle projection en 3D est créée montrant les niveaux d'intensité de fluorescence exclusivement dans le noyau (BKAILY *et al.*, 1996; 1997).

En isolant le noyau de la région cytosolique environnante, il est donc possible de mesurer les valeurs d'intensité moyenne du volume nucléaire en éliminant toute contribution possible du calcium périnucléaire.

## **2.5. Marquage par immunofluorescence.**

### **2.5.1. Marquage de l'Ang II.**

La localisation et la distribution de l'Ang II au niveau des CEEDs et des CEEGs sont effectuées en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte avec un anticorps polyclonal de chèvre spécifique dirigé contre l'Ang II humaine (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Cet anticorps est utilisé à une dilution de 5µg/ml. L'anticorps secondaire est un anti-IgG de chèvre conjugué à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) qui est utilisé à une dilution de 5µg/ml. Il est à noter que l'anti-Ang II n'a pas de réaction croisée avec l'angiotensinogène.

Pour déterminer la spécificité de l'immunoréactivité obtenue, des contrôles négatifs sont réalisés en préabsorbant l'anticorps primaire avec le peptide contrôle (20µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), peptide contre lequel l'anticorps primaire a été dirigé et en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul.

### **2.5.2. Marquage des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>.**

La localisation ainsi que la distribution des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> au niveau des CEEDs et des CEEGs sont réalisées avec la technique d'immunofluorescence indirecte. Des anticorps polyclonaux dirigés contre l'extrémité N-terminale du récepteur AT<sub>1</sub> (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (dilution de 1:250), et contre l'extrémité C-terminale du récepteur AT<sub>2</sub> (Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ) (dilution de

5 µg/ml) sont utilisés. L'anticorps secondaire pour les deux sous-types de récepteurs est un anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) qui est utilisé à une dilution de 1 µg/ml.

Pour déterminer la spécificité de l'immunoréactivité obtenue, des contrôles négatifs sont réalisés en utilisant les peptides contrôles contre lesquels l'antisérum AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ont été dirigés et en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul.

### **2.5.3. Prétraitement avec l'Ang II.**

Ces expériences ont été effectuées afin de vérifier l'effet de l'Ang II (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) sur l'internalisation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>.

Les CEEDs et les CEEGs mises en culture sur des lamelles sont exposées à 10<sup>-9</sup> M d'Ang II pour une période de 5, 15, 30 et 60 min à 37°C. L'Ang II est ensuite lavée, et les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (4%). La localisation des récepteurs est déterminée par immunofluorescence indirecte et visualisée à l'aide de la microscopie confocale.

### **2.5.4. Technique de l'immunofluorescence indirecte.**

La technique utilisée a été modifiée de BRISMAR *et al.* (1998). En bref, les CEEDs et les CEEGs mises en culture sur des lamelles de 25 mm sont fixées pendant 10 min dans une solution de paraformaldéhyde 4% (Cedarlane, Homby, ON) et sont ensuite

lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS 1X, pH 7.4. Les cellules à étudier sont ensuite incubées pendant 10 min dans une solution de sodium borohydrure (2mg/ml) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) afin de neutraliser les groupements aldéhydes, et sont lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS. Afin de perméabiliser les cellules et de bloquer les sites de liaison non-spécifique, les cellules sont incubées pendant 30 min dans une solution de Triton 0.1% contenant 7% de sérum normal de chèvre (NGS) ou de lapin (NRS) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) et 5% de lait écrémé en poudre (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) à la température de la pièce. Par la suite, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire à 4°C pendant toute la nuit dans une solution de Triton 0.1% contenant 1.4 % de NGS ou de NRS et 1 % de lait écrémé en poudre. Les préparations sont ensuite lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS et sont incubées pendant une heure à la température de la pièce et à l'obscurité avec un anticorps secondaire fluorescent dans une solution de Triton 0.1% contenant 1.4 % de NGS ou de NRS et 1 % de lait écrémé en poudre (BRISMAR *et al.*, 1998). Finalement, les cellules sont visualisées en utilisant la microscopie confocale.

#### **2.5.5. Visualisation et quantification du marquage par microscopie confocale.**

Pour la visualisation et la quantification de l'intensité de fluorescence par microscopie confocale, les cellules sont mises en culture sur des lamelles de 25 mm de diamètre qui conviennent à la chambre d'expérimentation de 1ml de solution tampon (PBS). Pour toutes les expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34µm. L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la

configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales. Les échantillons sont balayés le long de l'axe Z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise de mesures du niveau de l'intensité de fluorescence (BKAILY *et al.*, 1997).

Les paramètres utilisés pour la visualisation et la mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde FITC par microscopie confocale sont les mêmes que les paramètres utilisés pour les mesures du  $\text{Ca}^{2+}$  avec le complexe Fluo-3- $\text{Ca}^{2+}$ . L'ouverture confocale est toujours de 100  $\mu\text{m}$ . Les mesures de l'intensité de fluorescence sont exprimées soit en valeurs absolues selon l'échelle de pseudocouleur allant de 0 à 255, soit en pourcentage par rapport au contrôle.

## **2.6. Immunobuvardage western.**

### **2.6.1. Extraction des protéines.**

Pour les analyses d'expression des protéines des récepteurs  $\text{AT}_1$  et  $\text{AT}_2$  de l'Ang II au niveau des CEEDs et des CEEGs, les cellules sont mises en culture dans des boîtes de Pétri de 100 mm. Une fois à confluence, les cellules traitées sont lysées dans du tampon Laemmli 1X ( Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, sulfate de sodium dodécyl (SDS) 2%, glycérol 10%, phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM, bleu de bromophénol 0.005 %, 2- $\beta$ -mercaptoéthanol 5%).

Les lysats cellulaires de la préparation sont par la suite bouillis pendant 5 min, soniqués puis bouillis à nouveau pour 5 min. Les concentrations protéiques de chacun des

lysats sont déterminées en utilisant le "Bicinchoninic acid protein assay reagent" (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Une courbe standard est établie avec l'albumine de sérum bovin (BSA) effectuée en parallèle pour chaque dosage. Il est à noter que tous les échantillons sont dosés en duplicata.

### **2.6.2. Technique de l'immunobuvardage western.**

Des quantités équivalentes de protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10 %) (Tableau 1).

Le gel de séparation est recouvert d'une solution protectrice lors de la polymérisation, qui peut être de l'eau bidistillée ou du butanol. Cette couche, en isolant le gel de l'air, permet une polymérisation homogène.

Les échantillons (70 µg) sont bouillis pendant 5 min avant d'être chargés dans les puits. La migration des protéines dure environ 4 heures. Le poids moléculaire des protéines est déterminé par une comparaison avec la migration d'un marqueur du poids moléculaire (15 à 200 kD; Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON).

Le transfert des protéines est effectué sur une membrane de nitrocellulose (Amersham-Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe, QC) pendant 2 heures à une puissance de 200 watts dans un tampon de transfert ayant la composition suivante: Tris-base 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1 %. À la fin du transfert, la membrane est récupérée et les protéines sont colorées au rouge Ponceau (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) pour visualiser les bandes et s'assurer du succès du transfert. Par la suite, ces bandes sont décolorées par 2 ou 3 lavages

**Tableau 1** Composition des gels utilisés en immunobuvardage western.



Produits	Gel d'entassement (4% acrylamide)	Gel de séparation
Acrylamide	1.33 mL	7.5 mL
Tampon de migration 4X	-	7.5 mL
Tampon d'entassement 4X	2.5 mL	-
SDS 10%	0.1 mL	0.3 mL
Eau bidistillée	6.0 mL	14.6 mL
Ammonium persulfate 10%*	50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
TEMED*	5 $\mu$ L	10 mL

\* Ces deux produits de polymérisation sont ajoutés au mélange au moment de couler le gel entre les plaques.

TEMED: N, N, N', N'- Tetraméthyléthylènediamine.

successifs avec de l'eau (DESCHÈNES *et al.*, 2001).

### 2.6.3. Détection des antigènes.

Pour bloquer les sites antigéniques non spécifiques, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant au moins 2 heures à 25°C dans du TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0) ou du PBS (1X: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, pH 7.4), contenant 5% de lait écrémé en poudre et 0.05% de Tween-20. La membrane est ensuite incubée pour toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires pour le récepteur AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub> qui sont dilués dans la solution de blocage à une dilution de 1/200 et une concentration de 10 µg/mL, respectivement.

Après trois rinçages de 10 minutes avec 0.05% TBS-Tween ou 0.05% PBS-Tween, la membrane est incubée pour environ une heure à la température ambiante et en présence de l'anticorps secondaire, un anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe, QC). Il est à noter que celui-ci est dilué dans la solution de blocage dans un rapport de 1:5000. Par la suite, la membrane est lavée 2 fois pendant 10 minutes avec 0.05 % de TBS-Tween ou 0.05 % PBS-Tween. Elle est ensuite lavée une fois avec du TBS ou PBS sans Tween. Par la suite, les complexes immuns sont détectés par chemiluminescence (ECL, Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN). L'énergie dégagée sous forme de lumière est visualisée par exposition sur film d'autoradiographie de type BIOMAX MR (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) (DESCHÈNES *et al.*, 2001).

Pour chaque western, et afin de s'assurer que les quantités de protéines chargées dans les puits sont équivalentes, un contrôle est réalisé avec l' $\alpha$ -actine selon la méthode suivante: la membrane contenant les anticorps primaires et secondaires utilisés pour détecter la bande du récepteur AT<sub>1</sub> ou du récepteur AT<sub>2</sub>, est hydratée avec de l'eau distillée, lavée 3 fois avec de la glycine (0.1M pH 2.9) et incubée avec celle-ci pendant 30 min. La membrane est ensuite lavée 3 fois avec du TBS (1X) ou PBS (1X), puis incubée avec du TBS (1X) ou PBS (1X) contenant 5% de lait écrémé en poudre et 0.05% de Tween-20 à la température ambiante pour 3 heures, période durant laquelle les anticorps utilisés pour le récepteur AT<sub>1</sub> ou le récepteur AT<sub>2</sub> se détachent de la membrane. Celle-ci est alors marquée comme décrit précédemment pour la bande du récepteur AT<sub>1</sub> et du récepteur AT<sub>2</sub>, mais cette fois en utilisant un anticorps primaire monoclonal de souris (Abcam Limited, UK) dirigé contre l' $\alpha$ -actine, à une dilution de 1/20000. L'anticorps secondaire utilisé est un IgG anti-souris conjugué à la peroxidase développé chez la chèvre et purifié par affinité (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Cet anticorps est utilisé à une dilution de 1/1000. La bande de l' $\alpha$ -actine est détectée par chemiluminescence comme décrit précédemment pour s'assurer que les quantités de protéines dans chaque puits sont équivalentes.

## 2.7. Statistiques.

Les niveaux d'intensité du calcium libre cytosolique et nucléaire ainsi que du marquage de l'Ang II et des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, sont représentés comme des valeurs moyennes d'intensité relative de fluorescence ou comme pourcentage d'augmentation ou

de diminution par rapport au contrôle. Tous les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  E.S.M (Erreur Standard de la Moyenne) pour un nombre varié d'expériences indépendantes ( $n$ ). Le nombre minimum d'expériences pour chaque protocole est de 3. La signification statistique est déterminée en utilisant le test ANOVA des mesures répétées pour les valeurs partielles suivi du test Tukey-Kramer ou du test de Student-Newman-Keuls avec la comparaison multiple pour établir la valeur statistique des résultats. Les valeurs de probabilité (P) inférieures à 0.05 (intervalle de confiance de 95%) sont considérées comme étant significatives.

### **III. RÉSULTATS**

### **3.1. Présence et distribution des récepteurs à l'angiotensine II dans les cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines.**

Dans ces séries d'expériences, nous avons étudié la présence et la distribution des récepteurs à l'Ang II dans les cellules endothéliales endocardiques (CEEs) fœtales humaines âgées de 20 semaines en utilisant les techniques d'immunofluorescence indirecte, d'immunobuvardage western ainsi que la microscopie confocale en 3-dimension (3-D).

#### **3.1.1. Localisation et distribution du récepteur AT<sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.**

La présence du récepteur AT<sub>1</sub> a été déjà confirmée dans plusieurs types de cellules endothéliales vasculaires (CEVs) et plus précisément au niveau des cellules endothéliales de l'artère coronaire de rat (STOLL *et al.*, 1995), de l'aorte de rat (PUEYO *et al.*, 1996), de l'aorte de bovin (MONTON *et al.*, 1997) et de la veine ombilicale humaine (DIMMELER *et al.*, 1997). Nous avons donc voulu vérifier la présence et la distribution de ce type de récepteur dans les CEEs isolées du ventricule gauche (CEEGs) et du ventricule droit (CEEDs) des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte et un anticorps spécifique pour le récepteur AT<sub>1</sub> (dilution 1:250). Le marquage est observé par la microscopie confocale qui nous permet de visualiser en trois dimensions la distribution du récepteur AT<sub>1</sub> au niveau de nos

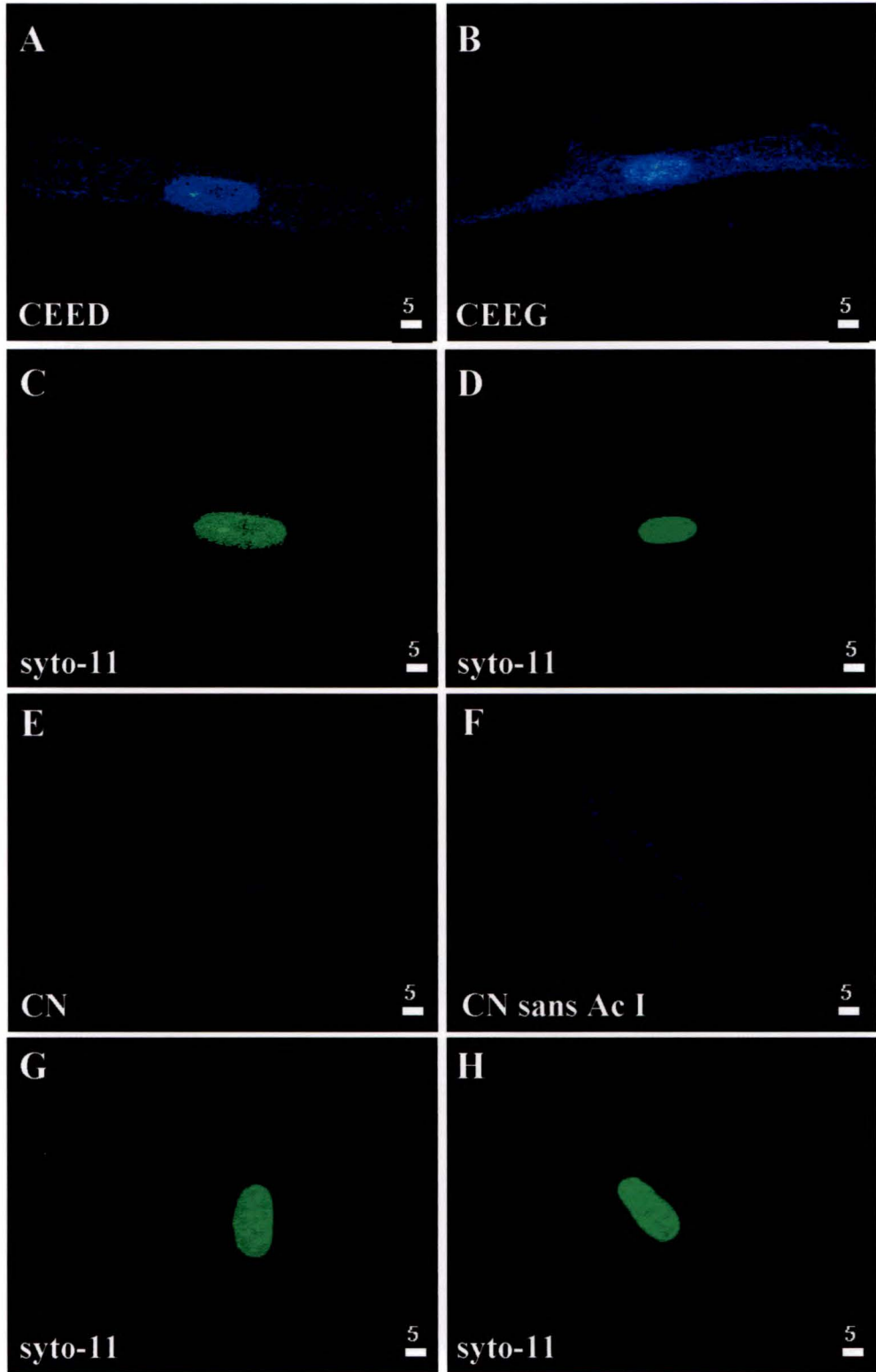
cellules ainsi que d'évaluer d'une façon semi-quantitative l'intensité de fluorescence de l'antisérum du récepteur AT<sub>1</sub>. Il est à noter que des contrôles négatifs sont effectués en parallèle en préincubant l'anticorps primaire avec une concentration élevée du peptide contrôle (dilution 1/50) et en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul..

La figure 7 montre un exemple de l'image en 3-D (vue de haut) de la distribution et la densité relative du récepteur AT<sub>1</sub> d'une CEED et d'une CEEG. Bien que le marquage au niveau du cytosol est faible d'une façon apparente (due à la faible intensité et à l'impression sur papier), le récepteur AT<sub>1</sub> semble être présent non seulement au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau du cytosol et du noyau, avec une immunoréactivité bien marquée au niveau du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. Par la suite, et à l'aide du programme de mesure "Image Space" de "Molecular Dynamics", nous avons pris des mesures semi-quantitatives de l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur AT<sub>1</sub> (conjugué à l'Alexa Fluor 488) au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs. Les valeurs d'intensité de fluorescence au niveau des deux compartiments cellulaires sont calculées à partir de la distribution tridimensionnelle du récepteur AT<sub>1</sub> dans nos cellules. La figure 8 résume les résultats. Comme on peut voir dans cette figure, nos analyses statistiques des mesures semi-quantitatives suggèrent une différence dans la densité du récepteur AT<sub>1</sub> dans les deux compartiments cellulaires, aussi bien au niveau des CEEDs ( $p < 0.0001$ ) que des CEEGs ( $p < 0.002$ ). Pour les CEEDs, la moyenne de l'intensité de fluorescence de l'Alexa Fluor conjugué à l'anticorps du récepteur AT<sub>1</sub> est de  $3.23 \pm 0.28$  dans le cytosol et de  $7.79 \pm 0.79$  dans le noyau ( $n=6$ ). Pour les CEEGs, la moyenne de

**Figure 7** Marquage immunofluorescent du récepteur AT<sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Reconstruction en 3-D (vue de haut) d'une CEED (A) et d'une CEEG (B) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines montrant l'immunoréactivité du récepteur AT<sub>1</sub>. (E) contrôle négatif (CN) effectué en incubant les cellules avec le peptide contrôle fourni par la compagnie (dilution 1: 50) en présence de l'anticorps primaire. (F) contrôle négatif effectué en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul. Les panneaux C, D, G et H représentent le marquage du noyau en utilisant la sonde des acides nucléiques, le syto-11, des cellules dans les panneaux A, B, E et F, respectivement. Ce récepteur est présent au niveau de la membrane plasmique et du cytosol avec une intensité de fluorescence plus élevée au niveau du noyau et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur AT<sub>1</sub> allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en  $\mu\text{m}$ . A, B, E et F sont quatre cellules différentes de quatre expériences différentes.

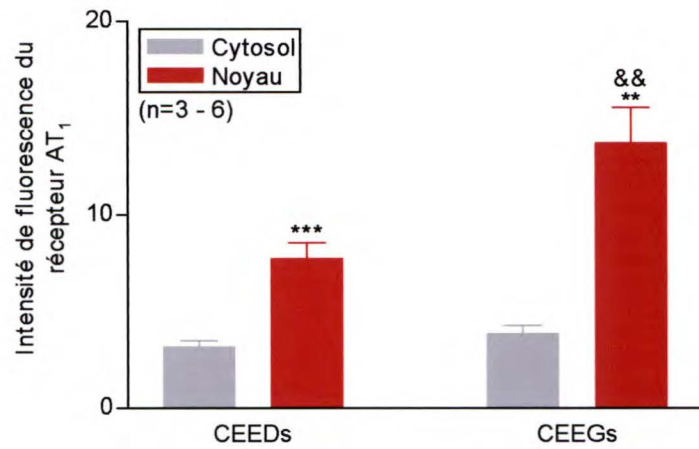




**Figure 8** Densité relative du récepteur AT<sub>1</sub> au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Cet histogramme montre la densité du récepteur AT<sub>1</sub> dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyennes  $\pm$  erreur standard de la moyenne. (\*) comparaison du noyau vs le cytosol au niveau des CEEDs et des CEEGs (\*\*p<0.0001 et \*\*p<0.002, respectivement). (&) comparaison du noyau des CEEGs vs CEEDs (&& p<0.005). «n» est le nombre d'expériences indépendantes.

**Densité relative du récepteur AT<sub>1</sub> dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.**



l'intensité de fluorescence est de  $3.90 \pm 0.39$  dans le cytosol et de  $13.73 \pm 1.80$  dans le noyau ( $n=3$ ).

De plus, nos résultats suggèrent que la densité du récepteur  $AT_1$  est plus élevée au niveau du cytosol et du noyau des CEEGs par rapport aux CEEDs et ceci plus particulièrement au niveau nucléaire ( $p<0.005$ ).

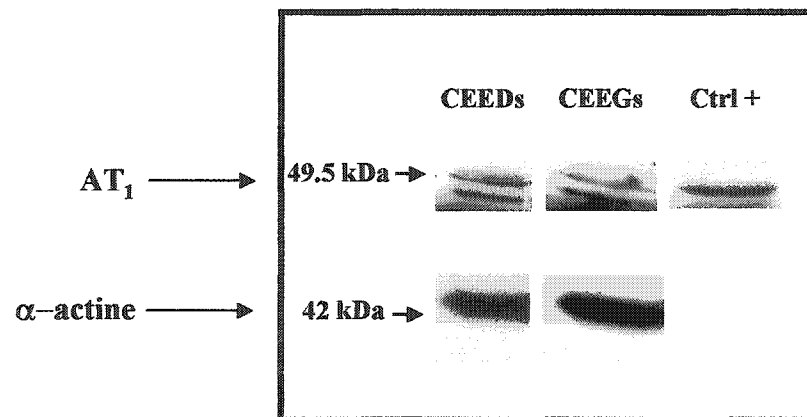
Dans une deuxième série d'expérience, nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage western pour démontrer l'expression du récepteur  $AT_1$ . Nous avons donc extrait et ensuite dosé les protéines totales des CEEDs et des CEEGs une fois à confluence en culture. 70  $\mu$ g de protéines de ces cellules ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE (10%) et ont été ensuite analysés par immunobuvardage avec le même anticorps  $AT_1$  (dilution 1: 200) que celui qui a été utilisé pour les expériences d'immunofluorescence. La figure 9 montre un exemple de cette série d'expériences ( $n=3$ ), «n» correspondant au nombre d'extraits protéiques vérifiés par Western. Comme on peut le voir, l'analyse de la bande de  $\sim 50$  kDa correspondante aux récepteurs  $AT_1$  montre la présence de ce dernier au niveau des CEEDs et des CEEGs.

### **3.1.2. Localisation et distribution du récepteur $AT_2$ dans les CEEDs et les CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.**

Dans la littérature, il a été rapporté que le récepteur  $AT_2$  est présent dans plusieurs types de CEVs telles les cellules endothéliales de l'artère coronaire de rat (STOLL *et al.*, 1995), de l'aorte de bovin (MONTON *et al.*, 1997) et de la veine ombilicale humaine (DIMMELER *et al.*, 1997). Nous avons voulu vérifier la présence et la distribution du

**Figure 9**      **Présence du récepteur AT<sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains agés de 20 semaines.**

Autoradiographie montrant les protéines totales des CEEDs et des CEEGs analysées par immunobuvardage avec l'anticorps AT<sub>1</sub> (1/200). L'analyse de la bande de ~ 50 kDa correspondante au récepteur AT<sub>1</sub> montre la présence de ce type de récepteur au niveau des CEEDs et des CEEGs. Le contrôle positif est un lysat de cellules totales de la lignée PC-12.



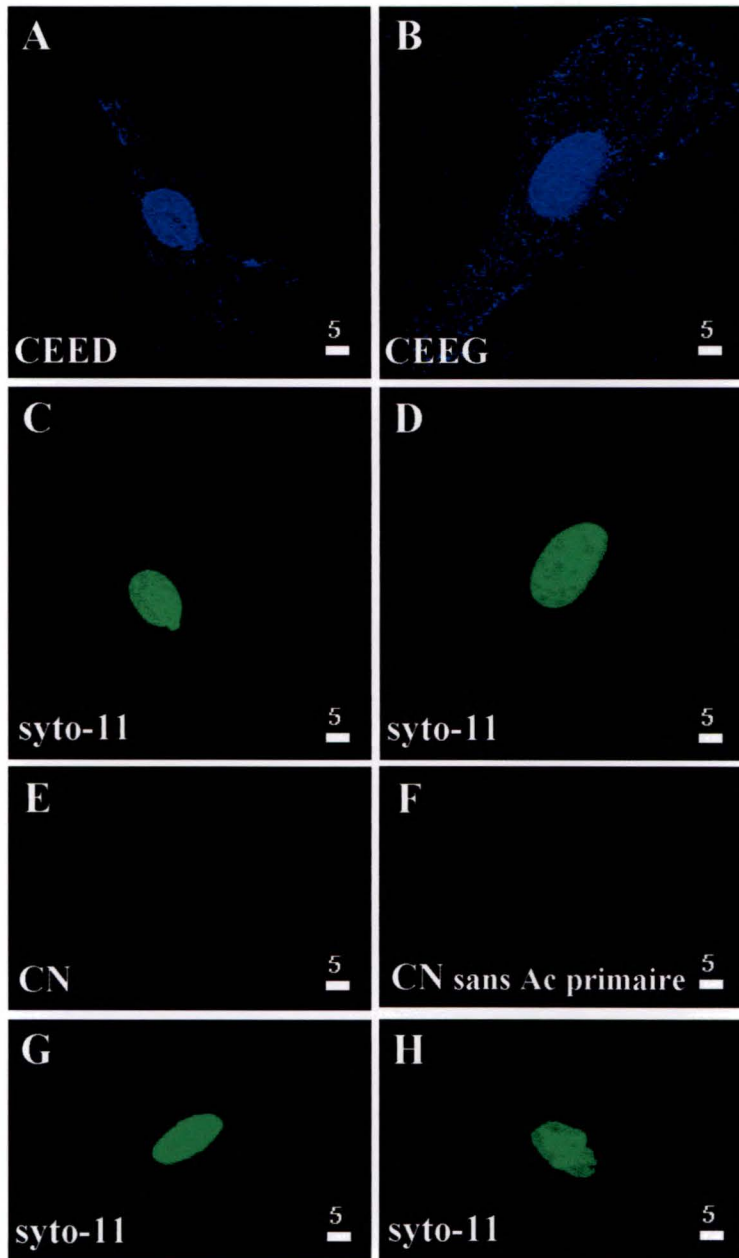
récepteur AT<sub>2</sub> dans les CEEGs et les CEEDs des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines en utilisant les techniques d'immunofluorescence indirecte, d'immunobuvardage western et de microscopie confocale en 3-D.

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte et un anticorps spécifique pour le récepteur AT<sub>2</sub> (dilution 5 µg/ml). Des contrôles négatifs sont effectués en parallèle en préincubant l'anticorps primaire avec une concentration élevée du peptide contrôle (dilution 20 µg/ml) et en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul. Le marquage est visualisé à l'aide de la microscopie confocale qui nous permet de déterminer en 3-D la distribution du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau de nos cellules ainsi que de mesurer d'une façon semi-quantitative l'intensité de fluorescence de l'anticorps AT<sub>2</sub> (couplé à l'Alexa Fluor 488). La figure 10 montre un exemple de l'image en 3-D (vue de haut) de la distribution et la densité du récepteur AT<sub>2</sub> d'une CEED et d'une CEEG. Bien que le marquage au niveau du cytosol est d'une façon apparente faible (due à la faible densité et à l'impression sur papier), le récepteur AT<sub>2</sub> est présent non seulement au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau du cytosol avec une immunoréactivité bien marquée au niveau du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. Les valeurs d'intensité de fluorescence au niveau des deux compartiments cellulaires sont calculées à partir de la distribution tridimensionnelle du récepteur AT<sub>2</sub> dans nos cellules. La figure 11 résume les résultats. Cette figure montre une différence dans la densité du récepteur AT<sub>2</sub> dans les deux compartiments cellulaires, aussi bien au niveau des CEEDs que des CEEGs. Pour les CEEDs, la moyenne de l'intensité de fluorescence de l'Alexa Fluor 488 conjugué à l'anticorps du récepteur AT<sub>2</sub>

**Figure 10** Marquage immunofluorescent du récepteur AT<sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Reconstruction en 3-D (vue de haut) d'une CEED (A) et d'une CEEG (B) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines montrant l'immunoréactivité du récepteur AT<sub>2</sub>. (E) contrôle négatif (CN) effectué en incubant les cellules avec le peptide contrôle fourni par la compagnie (dilution 20 µg/ml) en présence de l'anticorps primaire. (F) contrôle négatif effectué en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul. Les panneaux C, D, G et H montrent le marquage du noyau en utilisant la sonde des acides nucléiques, le syto-11, des cellules dans les panneaux A, B, E et F, respectivement. Ce récepteur est présent au niveau de la membrane plasmique et du cytosol avec une intensité de fluorescence plus élevée au niveau du noyau et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur AT<sub>2</sub> allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en µm. A, B, E et F sont quatre cellules différentes de quatre expériences différentes.

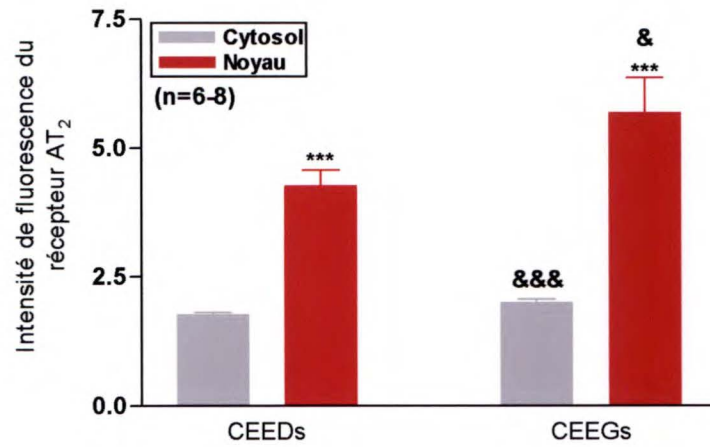




**Figure 11** Densité relative du récepteur AT<sub>2</sub> dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Cet histogramme montre la densité du récepteur AT<sub>2</sub> dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyennes  $\pm$  erreur standard de la moyenne. (\*) comparaison noyau vs cytosol au niveau des CEEDs et des CEEGs (\*\*p<0.0001 pour les deux types cellulaires). (&) comparaison cytosol et noyau des CEEGs vs CEEDs (&&& p<0.001 et & p<0.05, respectivement). «n» est le nombre d'expériences indépendantes.

**Densité relative du récepteur AT<sub>2</sub> dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.**



est de  $1.79 \pm 0.03$  dans le cytosol et de  $4.28 \pm 0.31$  dans le noyau ( $n=8$ ). Nos études statistiques montrent que la différence est hautement significative ( $p<0.0001$ ) entre le cytosol et le noyau. Pour les CEEGs, la moyenne de l'intensité de fluorescence est de  $2.00 \pm 0.06$  dans le cytosol et de  $5.70 \pm 0.67$  dans le noyau ( $n=6$ ). Nos études statistiques suggèrent également que la différence est hautement significative ( $p<0.0001$ ) entre le cytosol et le noyau (figure 11).

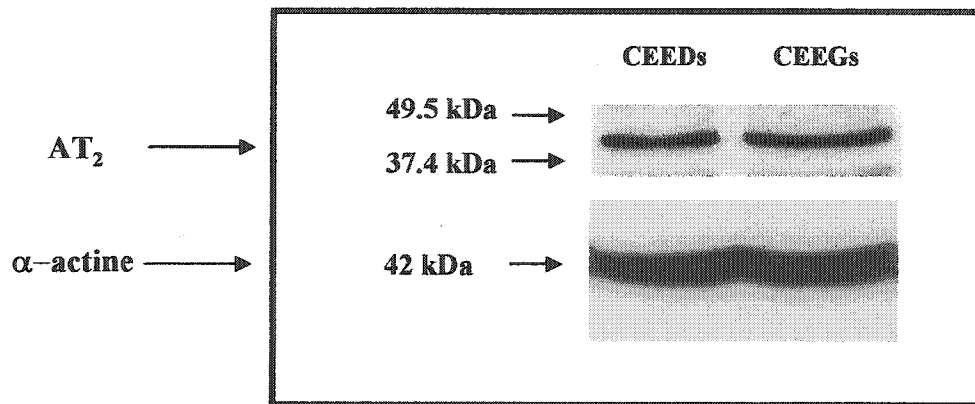
De plus, nos résultats suggèrent aussi que la densité du récepteur  $AT_2$  est significativement plus élevée dans le cytosol et le noyau au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs ( $p<0.001$  et  $p<0.05$ , respectivement).

Dans une deuxième série d'expérience, et comme pour le récepteur  $AT_1$ , nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage western pour confirmer les résultats que nous avons obtenus en immunofluorescence indirecte. Suite à l'extraction et au dosage des protéines totales des CEEDs et des CEEGs, 70  $\mu\text{g}$  de protéines ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE (10%) et ont été ensuite analysés par immunobuvardage avec le même anticorps  $AT_2$  (dilution 10  $\mu\text{g/ml}$ ) que celui qui a été utilisé pour les expériences d'immunofluorescence. La figure 12 montre un exemple de cette série d'expériences ( $n=3$ ). Comme on peut le voir, l'analyse de la bande de  $\sim 45$  kD correspondante au récepteur  $AT_2$  montre la présence de ce dernier au niveau des CEEDs et des CEEGs.

### **3.1.3. Présence et distribution du récepteur $AT_2$ dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur de rat adulte.**

**Figure 12** Présence du récepteur AT<sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Autoradiographie montrant les protéines totales des CEEDs et des CEEGs analysées par immunobuvardage avec l'anticorps AT<sub>2</sub> (10 µg/ml). L'analyse de la bande de ~ 45 kDa correspondante au récepteur AT<sub>2</sub> montre la présence de ce type de récepteur au niveau des CEEDs et des CEEGs.



Il a été rapporté dans la littérature que le récepteur AT<sub>2</sub> est principalement exprimé durant le développement foetal et plus spécifiquement au niveau du mésenchyme non-différencié de l'intestin et de l'estomac, du tissu conjonctif, du diaphragme, de la langue, du mésenchyme adjacent au cartilage en développement (GRADY *et al.*, 1991), du derme, de l'épiderme (GRADY et KALINYAK, 1993), ainsi que dans la glande surrénale, l'aorte, le rein et dans certaines régions du cerveau telles le cervelet, l'olive inférieure, et le locus coeruleus (DE GASPARO, 2002). Cependant, son expression diminue rapidement après la naissance (GRADY *et al.*, 1991; MATSUBARA, 1998; HORIUCHI *et al.*, 1999; DE GASPARO, 2002), suggérant que le récepteur AT<sub>2</sub> joue un rôle important durant le développement foetal. Chez le mammifère adulte, ce récepteur est exprimé dans certains tissus tels le cerveau (MILLAN *et al.*, 1991; JOHREN *et al.*, 1996), le cœur (SAMYN *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1998), les reins et les glandes surrénales (BREAULT *et al.*, 1996). Notre groupe a démontré que les cardiomyocytes isolés du cœur foetal humain âgé de 19 et 20 semaines sont du point de vue électrophysiologique et pharmacologique très semblables aux cardiomyocytes isolés du cœur adulte de différentes espèces (BKAILY *et al.*, 1995). De plus, nous avons récemment observé que le neuropeptide Y (NPY) augmente de façon dose-dépendante le calcium cytosolique et nucléaire des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines avec des valeurs de EC<sub>50</sub> identiques à celles observées au niveau des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur de rat adulte (SADER, 2002; JACQUES *et al.*, 2003). Afin de montrer que la présence du récepteur AT<sub>2</sub> n'est pas due au stade de développement embryonnaire des CEEs, nous avons vérifié si les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur de rat adulte possèdent le récepteur AT<sub>2</sub>. Le cœur de rat adulte a été

choisi dû au fait qu'il nous est impossible d'obtenir du cœur humain adulte. Nous avons donc utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte et un anticorps spécifique pour le récepteur AT<sub>2</sub> (dilution 5 µg/ml) et avons observé le marquage par la microscopie confocale. Comme le montre la figure 13, la distribution du récepteur AT<sub>2</sub> dans les CEEs isolées du cœur de rat adulte est similaire à celle observée au niveau des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Comme on peut le voir, le récepteur AT<sub>2</sub> semble être présent non seulement au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau du cytosol et du noyau des CEEDs et des CEEGs de rat adulte. Ces résultats suggèrent donc que la présence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau des CEEDs et des CEEGs d'origine fœtale humaine de 20 semaines ne serait pas due à leur stade de développement embryonnaire. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer avec certitude que les CEEs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines sont des cellules électrophysiologiquement et pharmacologiquement semblables aux CEEs adultes.

#### **3.1.4. Localisation et distribution de l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.**

Il est bien connu que les cardiomyocytes contiennent toutes les composantes du système rénine-angiotensine et qu'ils sont capables de synthétiser localement de l'Ang II (DZAU *et al.*, 1987; PAUL *et al.*, 1988; PAUL *et al.*, 1990). De plus, il a été rapporté que les CEEs possèdent l'enzyme de conversion de l'Ang II (ACE) (LANG *et al.*, 1996).

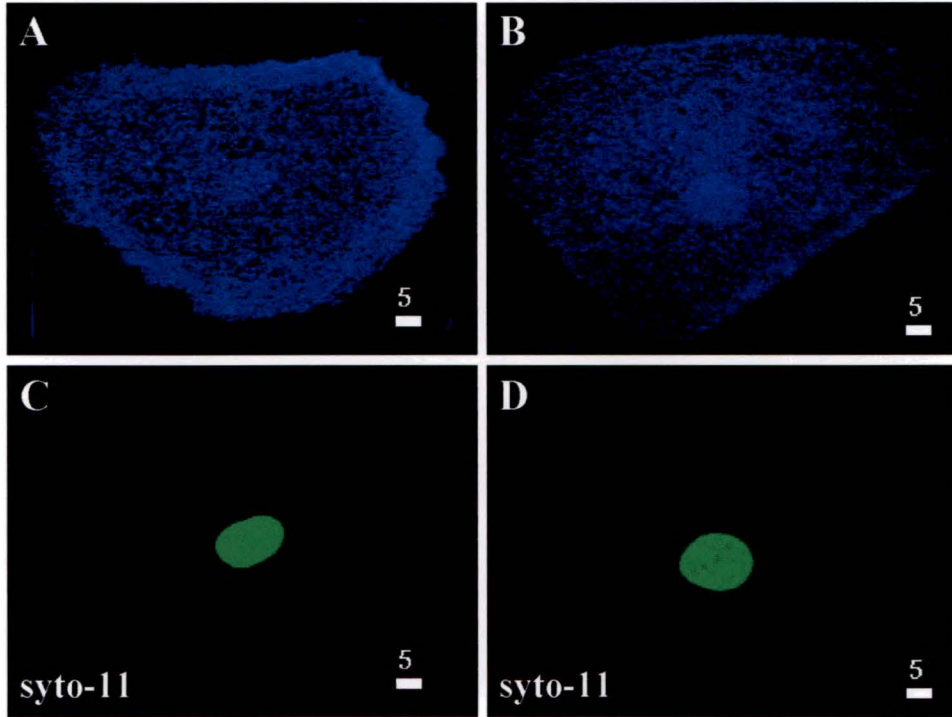


**Figure 13** Marquage immunofluorescent du récepteur AT<sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur de rat adulte.

Reconstruction en 3-D (vue de haut) d'une CEED (A) et d'une CEEG (B) isolées du cœur de rat adulte montrant l'immunoréactivité du récepteur AT<sub>2</sub>. Les panneaux C et D représentent le marquage du noyau en utilisant la sonde qui marque les acides nucléiques, le syto-11, des cellules dans les panneaux A et B respectivement. Ce récepteur est présent au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau avec une intensité de fluorescence plus élevée au niveau de la membrane plasmique et du noyau et ceci dans les CEEDs et dans les CEEGs. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur AT<sub>2</sub> allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en  $\mu\text{m}$ .

**CEED**

**CEEG**



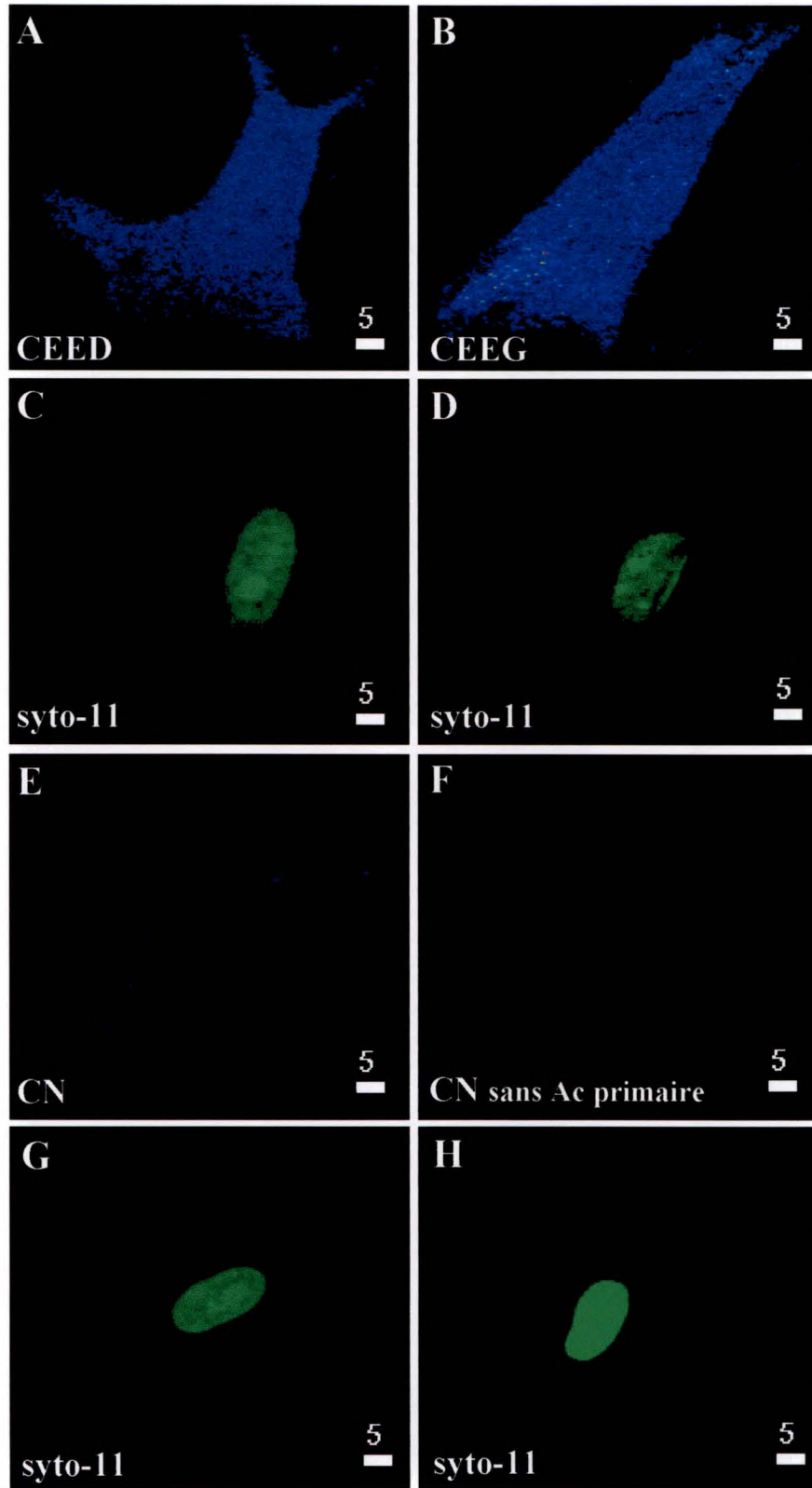
Dans cette série d'expériences, nous avons donc voulu vérifier si les CEEDs et les CEEGs des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines contiennent de l'Ang II en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte et un anticorps spécifique pour l'Ang II (dilution 5 µg/ml). Par la suite, le marquage est observé à l'aide de la microscopie confocale qui nous permet de déterminer en trois dimensions la distribution de l'Ang II au niveau de nos cellules ainsi que de mesurer d'une façon semi-quantitative, l'intensité de fluorescence de l'anticorps de l'Ang II (couplé à l'Alexa Fluor 488). Comme on peut le remarquer dans la figure 14, l'Ang II est distribué de façon homogène dans les CEEDs et les CEEGs avec une intensité de fluorescence comparable au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire). Nos mesures semi-quantitatives et nos études statistiques (figure 15) montrent qu'il n'existe pas de différence significative dans la distribution de l'Ang II entre les CEEDs et les CEEGs et ceci autant au niveau du cytosol qu'au niveau du noyau. Il est à noter que des contrôles négatifs sont effectués en parallèle en incubant les cellules avec l'anticorps primaire en présence d'une concentration élevée de peptide contrôle (20 µg/ml) et en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul.

### **3.2. Effet de différentes concentrations d'Ang II sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines âgées de 20 semaines.**

Dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si l'ajout de différentes concentrations d'Ang II extracellulaire module le niveau basal du calcium cytosolique

**Figure 14 Marquage immunofluorescent de l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.**

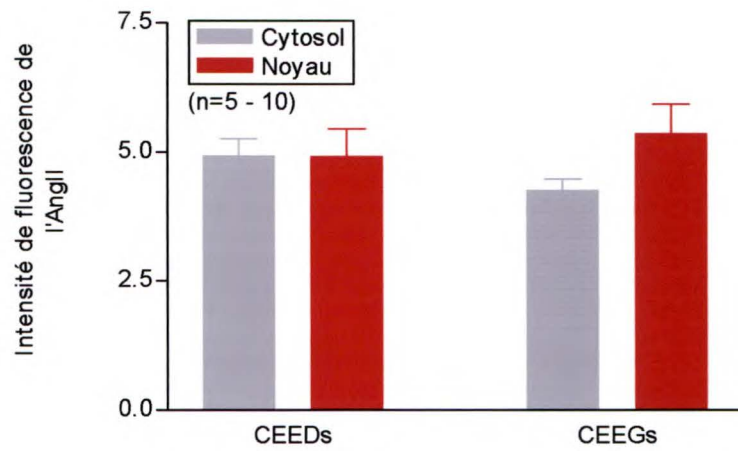
Reconstruction en 3-D (vue de haut) d'une CEED (A) et d'une CEEG (B) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines montrant l'immunoréactivité de l'Ang II. (E) contrôle négatif (CN) effectué en incubant les cellules avec le peptide contrôle (20 µg/ml) en présence de l'anticorps primaire. (F) contrôle négatif effectué en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul. Les panneaux C, D, G et H représentent le marquage du noyau des cellules des panneaux A, B, E et F, respectivement, en utilisant la sonde des acides nucléiques, le syto-11. L'Ang II est présent d'une façon homogène au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) et ceci dans les CEEDs et dans les CEEGs. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps de l'Ang II allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en µm. A, B, E et F sont quatre cellules différentes de quatre expériences différentes.



**Figure 15** Densité relative de l'Ang II au niveau du cytosol (incluant la membrane plasmique) et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Cet histogramme montre la densité de l'Ang II dans le cytosol et le noyau (incluant l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyennes  $\pm$  erreur standard de la moyenne. «n» est le nombre d'expériences indépendantes.

**Densité relative de l'Ang II dans le cytosol (incluant la membrane plasmique) et le noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire) des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.**



( $[Ca]_c$ ) et de calcium nucléaire ( $[Ca]_n$ ) des cellules endothéliales endocardiques isolées à partir des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

### 3.2.1. L'Ang II extracellulaire augmente d'une façon dose-dépendante le niveau basal soutenu du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des CEEDs et des CEEGs fœtales humaines âgées de 20 semaines.

Dans cette série d'expériences, nous avons étudié l'effet de concentrations croissantes d'Ang II extracellulaire ( $10^{-17}$  à  $10^{-6}$  M) sur le niveau calcique basal soutenu cytosolique et nucléaire des CEEDs et des CEEGs isolées à partir des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

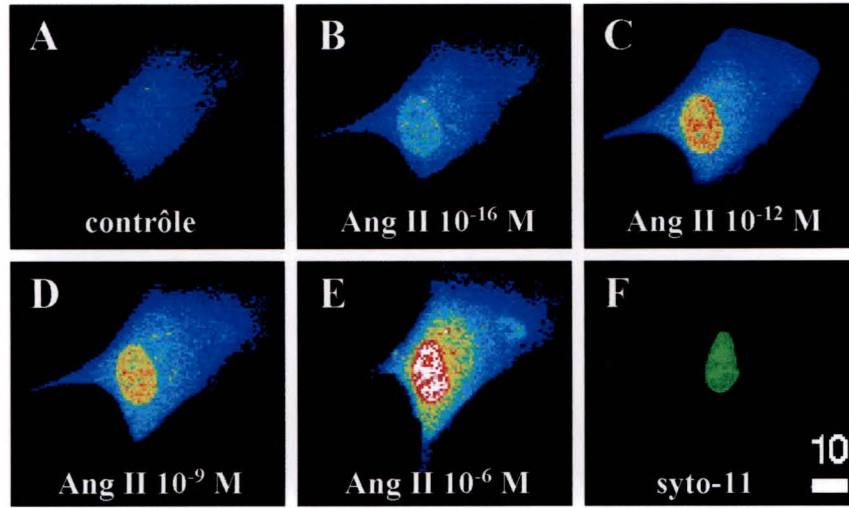
La figure 16 montre un exemple de l'effet dose-dépendant de l'Ang II sur le  $[Ca]_c$  et  $[Ca]_n$  d'une CEED (panneaux A à E) et d'une CEEG (panneaux G à K). L'enregistrement est fait après que chaque concentration d'Ang II a induit un effet soutenu. Nous pouvons distinguer dans cette figure, la distribution calcique soutenue cytosolique et nucléaire au niveau contrôle et suite à la stimulation par l'Ang II à des concentrations de  $10^{-16}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-6}$  M. Au niveau contrôle et suite à l'ajout des différentes concentrations d'Ang II, le  $Ca^{2+}$  libre est plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol. Il est à noter que l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3/ $Ca^{2+}$  est indiquée selon une échelle en pseudo-couleur, où la couleur noire représente l'intensité zéro de la concentration du  $Ca^{2+}$ , alors que la couleur blanche représente l'intensité maximale. À la fin de chaque expérience, le noyau des cellules est marqué par la sonde des acides nucléiques, le syto-11, (figures 16 F et L) afin de déterminer l'attribu-



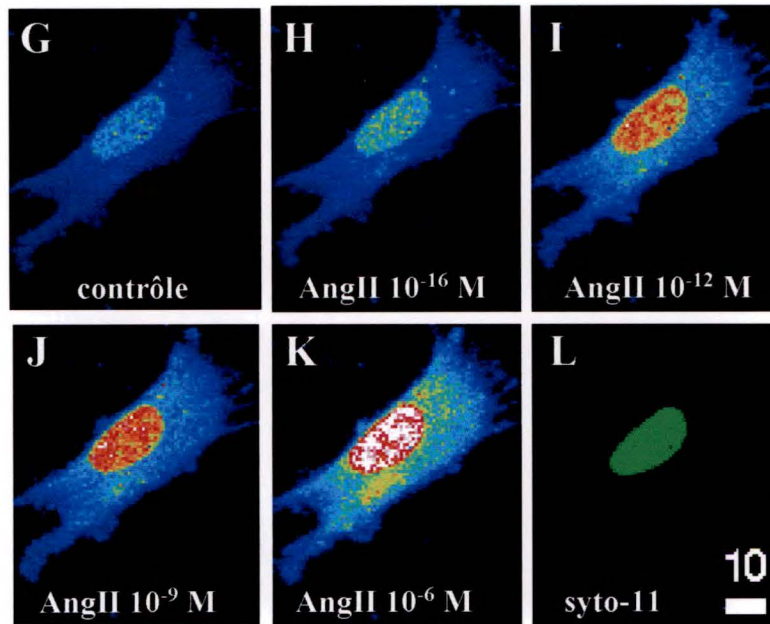
**Figure 16** Une expérience représentative de l'effet de différentes concentrations d'Ang II sur les niveaux soutenus du  $[Ca]_c$  et  $[Ca]_n$  des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines étudié en microscopie confocale.

Distribution et intensité de fluorescence en 3-D (vue de haut) basale soutenue cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3/ $Ca^{2+}$  en absence d'Ang II dans une CEED (A) et une CEEG (G) isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Les panneaux B, C, D et E représentent la distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire soutenue du complexe Fluo-3/ $Ca^{2+}$  d'une CEED en présence de différentes concentrations d'Ang II i.e  $10^{-16}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-6}$  M, respectivement. Les panneaux H, I, J et K représentent la distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire soutenue du complexe Fluo-3/ $Ca^{2+}$  d'une CEEG en présence de différentes concentrations d'Ang II i.e  $10^{-16}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-6}$  M, respectivement. (F et L) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le syto-11. L'échelle de pseudo-couleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3/ $Ca^{2+}$  de 0 à 255. La couleur dans les panneaux F et L n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en  $\mu m$ .

### CEEDs



### CEEGs



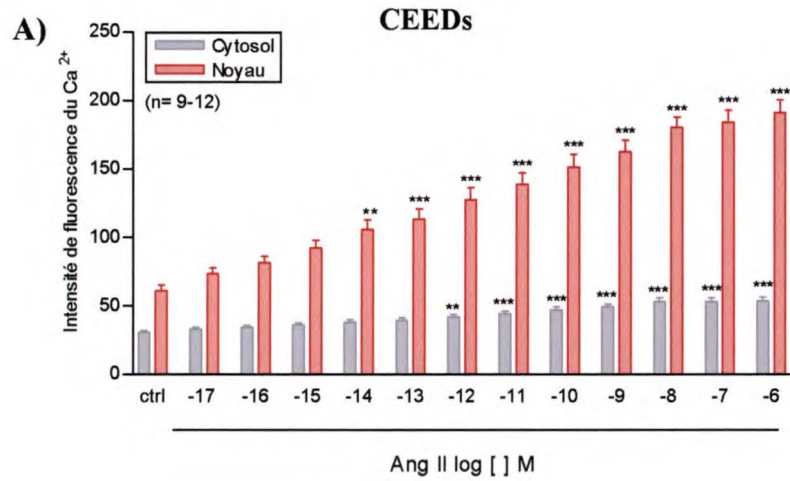
tion de la réponse calcique au niveau nucléaire. De plus, ce marquage permet par la suite d'analyser le niveau de calcium libre à l'intérieur du noyau. Il est à noter que les mesures d'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3/  $\text{Ca}^{2+}$  sont obtenues grâce à l'analyse de la distribution tridimensionnelle effectuée à partir d'images optiques sériées générées par la microscopie confocale.

Les panneaux A et C de la figure 17 montrent la compilation des résultats obtenus en microscopie confocale de l'effet de l'ajout des doses croissantes d'Ang II extracellulaire sur les niveaux calciques libres soutenus cytosolique et nucléaire dans les CEEDs (figure 17A) et les CEEGs (figure 17C) du cœur âgé de 20 semaines. Les figures 17 B et D montrent les courbes dose-réponses de l'effet de l'Ang II sur le niveau du calcium soutenu cytosolique et nucléaire dans les CEEDs (figure 17B) et les CEEGs (figure 17D) isolées du cœur fœtal âgé de 20 semaines. Comme nous pouvons le remarquer sur la figure 17A, le niveau du  $\text{Ca}^{2+}$  libre nucléaire basal ( $[\text{Ca}]_n$ ) soutenu en absence d'Ang II ( $60.9 \pm 4.3$ ;  $n=12$ ) est supérieur à celui du calcium libre cytosolique ( $[\text{Ca}]_c$ ) ( $30.5 \pm 1.3$ ;  $n=12$ ). Il est à noter que cette différence est maintenue en présence de toutes les concentrations d'Ang II utilisées. Des concentrations d'Ang II de  $10^{-17}$  M,  $10^{-16}$  M et  $10^{-15}$  M n'affectent pas de façon significative les niveaux du  $[\text{Ca}]_c$  et du  $[\text{Ca}]_n$  par rapport au contrôle (cytosol  $10^{-17}$  M:  $33.0 \pm 1.3$ , noyau  $10^{-17}$  M:  $73.4 \pm 4.5$ ; cytosol  $10^{-16}$  M:  $34.2 \pm 1.4$ , noyau  $10^{-16}$  M:  $81.7 \pm 4.6$ ; cytosol  $10^{-15}$  M:  $36.1 \pm 1.6$ , noyau  $10^{-15}$  M:  $92.2 \pm 5.7$ ;  $n=12$ ). Une concentration de  $10^{-14}$  M et de  $10^{-13}$  M d'Ang II induit une augmentation significative du  $[\text{Ca}]_n$  (noyau  $10^{-14}$  M:  $105.8 \pm 7.1$ ;  $p < 0.01$ , noyau  $10^{-13}$  M:  $113.2 \pm 7.8$ ;  $p < 0.001$ ) mais pas du  $[\text{Ca}]_c$  (cytosol  $10^{-14}$  M:  $38.1 \pm 1.8$ , cytosol  $10^{-13}$  M:  $39.4 \pm 2.0$ );  $n=12$ . L'ajout d'Ang II à une concentration de  $10^{-12}$  M, induit une augmentation

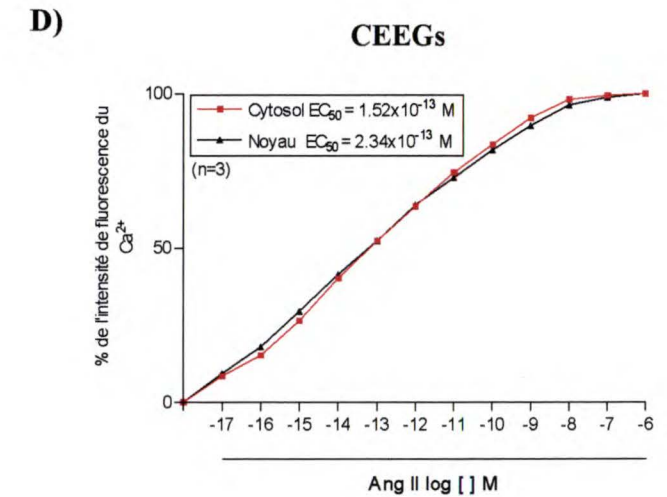
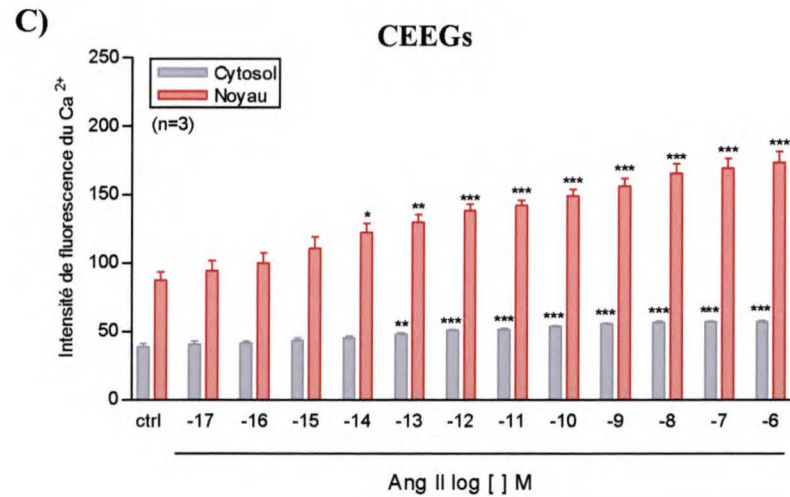
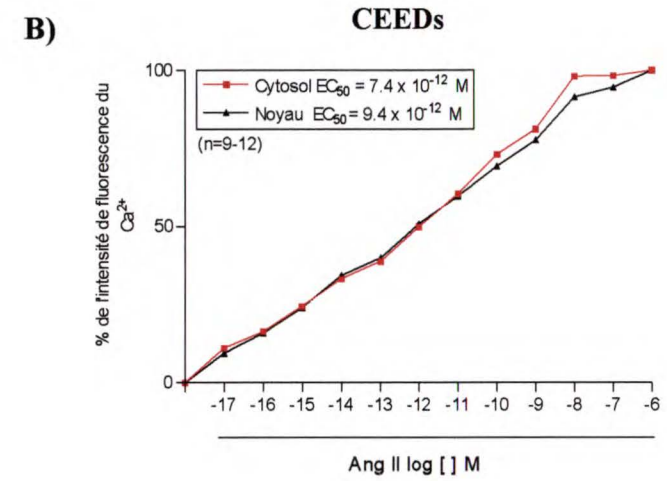
**Figure 17** Effet de différentes concentrations d'Ang II sur les niveaux soutenus du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.

Dans les panneaux A et B, l'Ang II à des concentrations entre  $10^{-17}$  M et  $10^{-6}$  M induit une augmentation dose-dépendante du  $[Ca]_c$  et  $[Ca]_n$  libre dans les CEEDs du cœur foetal humain âgé de 20 semaines. (A) Une augmentation significative du niveau  $[Ca]_n$  est obtenue à une concentration de  $10^{-14}$  M. À partir d'une concentration de  $10^{-12}$  M, l'augmentation devient significative dans le cytosol et le noyau. L'augmentation soutenue des niveaux du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  libre atteint un maximum à une concentration de  $10^{-6}$  M d'Ang II. (B) Les valeurs de  $EC_{50}$  sont de  $7.4 \times 10^{-12}$  M pour le cytosol et de  $9.4 \times 10^{-12}$  M pour le noyau. Dans les panneaux C et D, l'Ang II à des concentrations entre  $10^{-17}$  M et  $10^{-6}$  M induit une augmentation dose-dépendante du  $[Ca]_c$  et  $[Ca]_n$  libre dans les CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines. (C) Une augmentation significative du niveau  $[Ca]_n$  est obtenue à une concentration de  $10^{-14}$  M. À partir d'une concentration de  $10^{-13}$  M, l'augmentation devient significative dans le cytosol et le noyau. L'augmentation soutenue des niveaux du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  libre atteint un maximum à une concentration de  $10^{-6}$  M d'Ang II. (D) Les valeurs de  $EC_{50}$  sont de  $1.5 \times 10^{-13}$  M pour le cytosol et de  $2.3 \times 10^{-13}$  M pour le noyau. Les valeurs sont présentées comme moyennes  $\pm$  erreur standard de la moyenne de 3 à 12 expériences. «n» est le nombre d'expériences. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ .

**Effet de concentrations croissantes d'Ang II sur le niveau soutenu du  $[Ca]_c$  et  $[Ca]_n$  des CEEDs (A) et CEEGs (C) isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.**



**Courbe dose-réponse de l'effet de l'Ang II sur le niveau calcique soutenu des CEEDs (B) et des CEEGs (D) isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.**



significative du  $[Ca^{2+}]_c$  (cytosol  $10^{-12}$  M:  $41.9 \pm 2.0$ ;  $p < 0.01$ ) et hautement significative du  $[Ca]_n$  (noyau  $10^{-12}$  M:  $127.4 \pm 8.8$ ;  $p < 0.001$ );  $n=12$ . L'ajout d'une concentration de  $10^{-11}$  M d'Ang II induit une augmentation hautement significative du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  (cytosol  $10^{-11}$  M:  $44.3 \pm 2.0$ , noyau  $10^{-11}$  M:  $138.9 \pm 8.3$ ;  $p < 0.001$ ,  $n=12$ ). L'effet maximal au niveau cytosolique est observé à une concentration près de  $10^{-8}$  M. À  $10^{-6}$  M d'Ang II, le niveau du  $[Ca]_c$  est de  $53.3 \pm 2.7$  et du  $[Ca]_n$  est de  $191.4 \pm 9.0$ ;  $n=9$ .

La figure 17C montre l'effet des doses croissantes d'Ang II sur les niveaux calciques soutenus cytosolique et nucléaire des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Les niveaux de  $[Ca]_n$  basal soutenu en absence d'Ang II ( $87.6 \pm 6.0$ ;  $n=3$ ) sont supérieures à ceux du  $[Ca]_c$  ( $38.6 \pm 2.5$ ;  $n=3$ ). Cette différence est maintenue en présence de toutes les concentrations d'Ang II utilisées. Des concentrations aussi faibles que  $10^{-17}$  M,  $10^{-16}$  M et  $10^{-15}$  M d'Ang II n'affectent pas de façon significative les niveaux du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  par rapport au contrôle (cytosol  $10^{-17}$  M:  $40.4 \pm 2.3$ , noyau  $10^{-17}$  M:  $94.5 \pm 7.3$ ; cytosol  $10^{-16}$  M:  $41.6 \pm 1.7$ , noyau  $10^{-16}$  M:  $100.2 \pm 7.1$ ; cytosol  $10^{-15}$  M:  $43.6 \pm 1.6$ , noyau  $10^{-15}$  M:  $111.0 \pm 8.2$ ;  $n=3$ ). L'Ang II à une concentration de  $10^{-14}$  M induit une augmentation significative du  $[Ca]_n$  ( $122.6 \pm 6.6$ ;  $p < 0.05$ ) mais pas du  $[Ca]_c$  ( $45.5 \pm 1.3$ );  $n=3$ . L'ajout d'Ang II à une concentration de  $10^{-13}$  M, induit une augmentation significative du  $[Ca^{2+}]_c$  ( $48.0 \pm 0.9$ ;  $p < 0.01$ ) et du  $[Ca]_n$  ( $130.0 \pm 5.5$ ;  $p < 0.01$ );  $n=3$ . À partir d'une concentration de  $10^{-12}$  M, l'Ang II induit une augmentation hautement significative du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  (cytosol  $10^{-12}$  M:  $51.2 \pm 0.2$ , noyau  $10^{-12}$  M:  $138.5 \pm 4.5$ ,  $p < 0.001$ ;  $n=3$ ). L'effet maximal est observé à une concentration de  $10^{-8}$  M. À  $10^{-6}$  M d'Ang II où le niveau du  $[Ca]_c$  est de  $57.2 \pm 0.8$  et du  $[Ca]_n$  est de  $173.5 \pm 8.1$ ;  $n=3$ .

Les panneaux B et D de la figure 17 montrent les courbes dose-réponses de l'effet de l'Ang II sur les niveaux soutenus du calcium cytosolique et nucléaire dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal âgé de 20 semaines. Comme nous pouvons constater, l'Ang II à des concentrations de  $10^{-17}$  M à  $10^{-8}$  M, induit une augmentation dose-dépendante du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$ . La valeur de l' $EC_{50}$  pour les CEEDs est de  $7.4 \times 10^{-12}$  M pour le cytosol et  $9.4 \times 10^{-12}$  M pour le noyau ( $n=9-12$ ), alors que pour les CEEGs, l' $EC_{50}$  est de  $1.5 \times 10^{-13}$  M pour le cytosol et de  $2.3 \times 10^{-13}$  M pour le noyau ( $n=3$ ).

En conclusion, ces résultats montrent que l'Ang II induit une augmentation concentration-dépendante du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  au niveau des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines avec des  $EC_{50}$  de l'ordre de  $10^{-12}$  M (cytosol et noyau) et de  $10^{-13}$  M (cytosol et noyau) pour les CEEDs et les CEEGs, respectivement. De plus, l'augmentation soutenue du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  induite par l'Ang II extracellulaire est bloquée par l'application extracellulaire du chélateur calcique, l'EGTA (résultats non-montrés). Ces résultats suggèrent donc qu'au niveau de ces cellules, l'augmentation calcique soutenue nucléaire induite par l'Ang II extracellulaire est due en grande partie à l'augmentation de l'influx calcique à travers la membrane de surface.

**3.3. Effet de l'administration extracellulaire des antagonistes des récepteurs  $AT_1$  (losartan) et  $AT_2$  (PD123319), sur l'augmentation soutenue du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  induite par l'Ang II ( $10^{-12}$  M) dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.**

Dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si l'augmentation soutenue du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  induite par l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs du cœur foetal âgé de 20 semaines est relayée via l'activation des récepteurs  $AT_1$  et/ou  $AT_2$ . La concentration d'Ang II choisie pour effectuer ces expériences est de  $10^{-12}$  M, concentration équivalente à l' $EC_{50}$  pour les CEEDs et très près de l' $EC_{50}$  des CEEGs. Il est à noter que cette concentration est capable de produire une augmentation soutenue statistiquement significative mais non saturante du calcium cytosolique et nucléaire.

En utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte et la microscopie confocale, nous avons démontré la présence du récepteur  $AT_1$  dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines. Afin d'étudier le rôle de ce récepteur dans la réponse calcique induite par l'Ang II, nous avons utilisé le losartan, un antagoniste spécifique du récepteur  $AT_1$  (TIMMERMANS *et al.*, 1993).

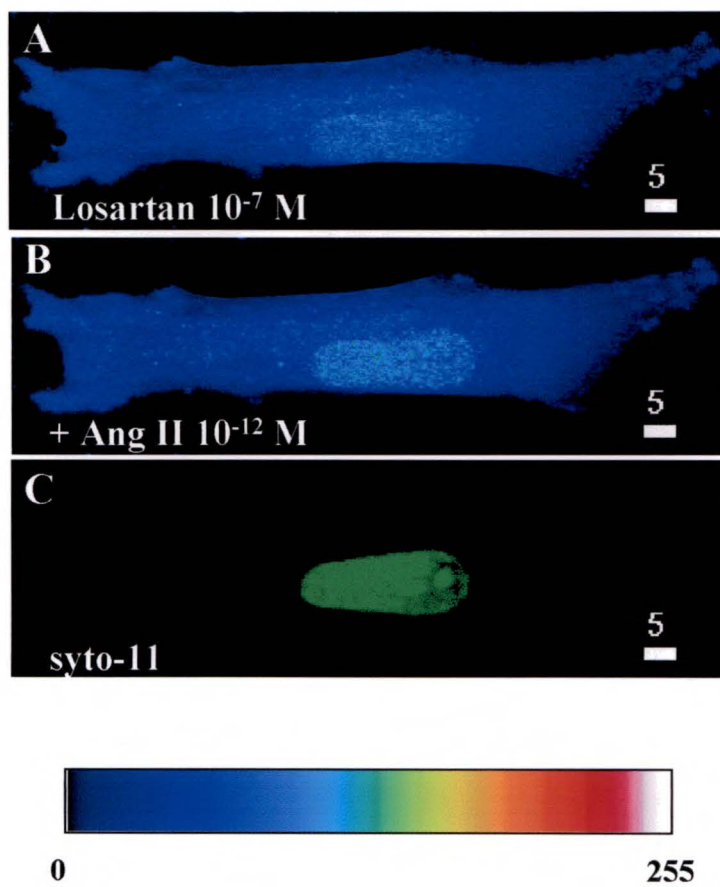
Dans cette série d'expériences, en utilisant la microscopie confocale et la sonde Fluo-3/AM sensible au calcium, nous avons testé l'effet du prétraitement des CEEDs et des CEEGs avec le losartan sur l'augmentation soutenue du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  induite par l'Ang II. La figure 18 montre un exemple typique du niveau de  $[Ca]_c$  et de  $[Ca]_n$  des CEEDs (panneaux A et B) et des CEEGs (panneaux D et E) isolées des cœurs foetaux humains âgés de 20 semaines. Les panneaux A et B de la figure 19 illustrent la moyenne des mesures des niveaux du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  des CEEDs (n=7) (figure 19A) et des CEEGs (n=3) (figure 19B). Les CEEDs et les CEEGs sont incubées pendant 15 minutes en présence de  $10^{-7}$  M de losartan, une concentration connue pour complètement bloquer le récepteur  $AT_1$  (SHAO *et al.*, 1998). Pour les CEEDs et comme l'illustre la figure 19A, en présence du losartan, le niveau de  $[Ca]_c$  est de  $28.2 \pm 1.3$  tandis que le niveau de  $[Ca]_n$



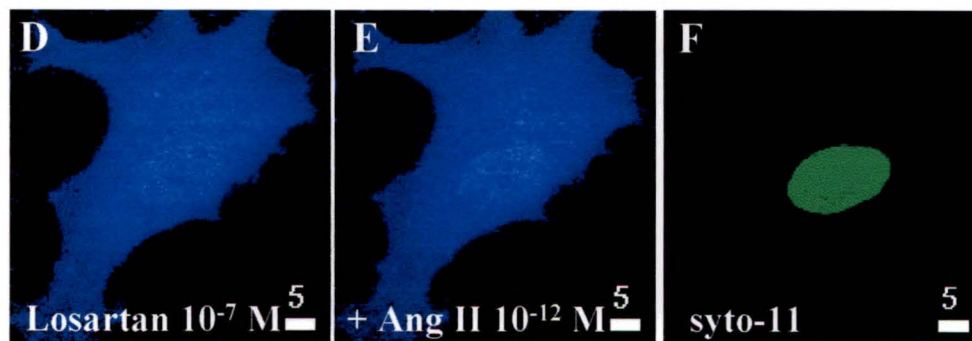
**Figure 18** Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur  $AT_1$ , le losartan, sur l'augmentation soutenue du niveau de  $[Ca]_c$  et de  $[Ca]_n$  induite par l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

En présence du losartan ( $10^{-7}$  M), les CEEDs (A) et les CEEGs (D) montrent un niveau de  $[Ca]_i$  soutenu légèrement plus élevé dans le noyau en comparaison avec le cytosol. En présence du losartan, l'addition de l'Ang II à une concentration de  $10^{-12}$  M, n'affecte pas les niveaux du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  des CEEDs (B) et des CEEGs (E). (C et F) Délimitation du noyau à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le syto-11. La représentation des images est indiquée selon une échelle de pseudo-couleur représentant l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3/ $Ca^{2+}$  allant de 0 à 255. La couleur des panneaux C et F n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en  $\mu m$ .

## CEEDs



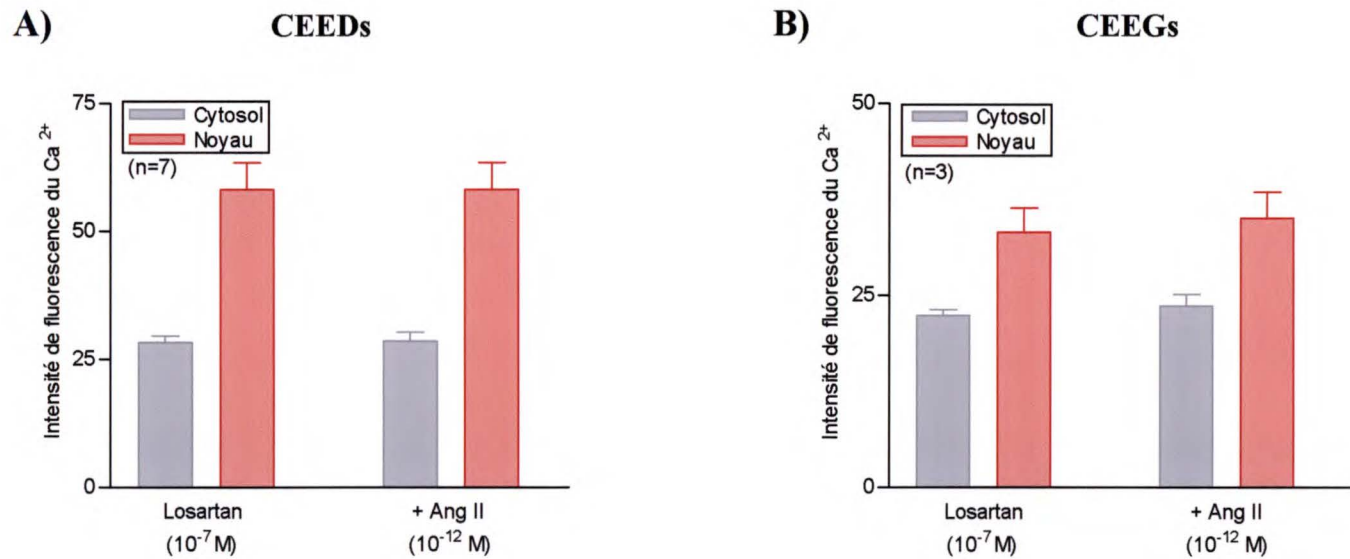
## CEEGs



**Figure 19** Effet préventif de l'antagoniste du récepteur AT<sub>1</sub>, le losartan, sur l'augmentation soutenue du [Ca]<sub>c</sub> et du [Ca]<sub>n</sub> induite par l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Ces histogrammes représentent la mesure de l'intensité de fluorescence du [Ca]<sub>c</sub> et du [Ca]<sub>n</sub> des CEEDs (A) et des CEEGs (B) isolées du cœur fœtal âgé de 20 semaines. En présence de l'antagoniste du récepteur AT<sub>1</sub>, le losartan, l'addition de l'Ang II (10<sup>-12</sup> M) n'induit pas une augmentation du [Ca]<sub>c</sub> et du [Ca]<sub>n</sub> au niveau des CEEDs (A) et des CEEGs (B). Les valeurs sont représentées comme moyennes ± erreur standard de la moyenne avec le nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. Pour les mesures du calcium en 3-D, les valeurs de l'intensité de fluorescence calcique cytosolique et nucléaire sont obtenues à partir de cellules reconstruites en 3-D, suite à l'enregistrement d'images optiques sériées.

**Effet préventif de l'antagoniste du récepteur AT<sub>1</sub>, le losartan, sur l'augmentation soutenue du [Ca]<sub>c</sub> et du [Ca]<sub>n</sub> induite par l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.**



est de  $58.1 \pm 5.3$  ( $n=7$ ). L'addition d'Ang II à une concentration de  $10^{-12}$  M n'affecte pas le niveau de  $[Ca]_c$  et de  $[Ca]_n$  (cytosol:  $28.5 \pm 1.7$ ; noyau:  $58.2 \pm 5.2$ ;  $n=7$ ). Pour les CEEGs, comme on peut le remarquer dans la figure 19B, en présence de l'antagoniste, le niveau de  $[Ca]_c$  est de  $22.4 \pm 0.8$  tandis que le niveau de  $[Ca]_n$  est de  $33.2 \pm 3.2$  ( $n=3$ ). L'addition de l'Ang II à une concentration de  $10^{-12}$  M n'affecte pas le niveau de  $[Ca]_c$  et de  $[Ca]_n$  (cytosol:  $23.6 \pm 1.5$ ; noyau:  $35.0 \pm 3.4$ ;  $n=3$ ). Ces résultats montrent que le losartan, un antagoniste du récepteur  $AT_1$ , est capable de complètement prévenir l'effet de l'Ang II sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire des CEEDs et des CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines suggérant donc une implication du récepteur  $AT_1$  dans la réponse calcique soutenue induite par l'Ang II au niveau de ces cellules.

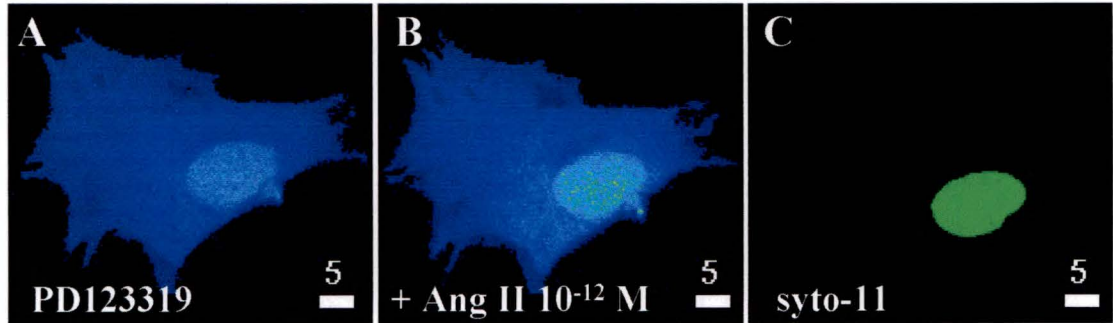
En utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte et la microscopie confocale, nous avons déjà démontré la présence du récepteur  $AT_2$  dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines. Afin de vérifier si ce récepteur participe aussi à l'effet de l'Ang II au niveau de ces cellules, nous avons utilisé le PD123319, un antagoniste spécifique du récepteur  $AT_2$ , à une concentration de  $10^{-7}$  M.

En utilisant la microscopie confocale et la sonde Fluo-3/AM sensible au calcium, nous avons testé l'effet du prétraitement des CEEDs et des CEEGs avec le PD123319 sur l'augmentation soutenue du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  induite par l'Ang II. La figure 20 montre un exemple des niveaux de  $[Ca]_c$  et de  $[Ca]_n$  d'une CEED (panneaux A et B) et d'une CEEG (panneaux D et E) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Les CEEDs et les CEEGs sont incubées pendant 15 minutes en présence de  $10^{-7}$  M de PD123319. Comme l'illustre la figure 20, l'antagoniste, le PD123319, ne prévient pas l'augmentation soutenue dans le niveau de  $[Ca]_c$  et de  $[Ca]_n$  véhiculée par l'Ang II ( $10^{-12}$  M). Ces

**Figure 20** Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur  $AT_2$ , le PD123319, sur l'augmentation soutenue du niveau de  $[Ca]_c$  et de  $[Ca]_n$  induite par l'Ang II dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.

En présence du PD123319 ( $10^{-7}$  M), une CEEDs (A) et une CEEGs (D) montrent un niveau de  $[Ca]_i$  légèrement plus élevé dans le noyau en comparaison avec le cytosol. En présence du PD123319, l'addition de l'Ang II à une concentration de  $10^{-12}$  M, cause une augmentation dans les niveaux du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  de la CEED (B) et de la CEEG (E). (C et F) Délimitation du noyau à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le syto-11. La représentation des images est indiquée selon une échelle de pseudo-couleur représentant l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3/ $Ca^{2+}$  allant de 0 à 255. La couleur du panneau C n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en  $\mu m$ .

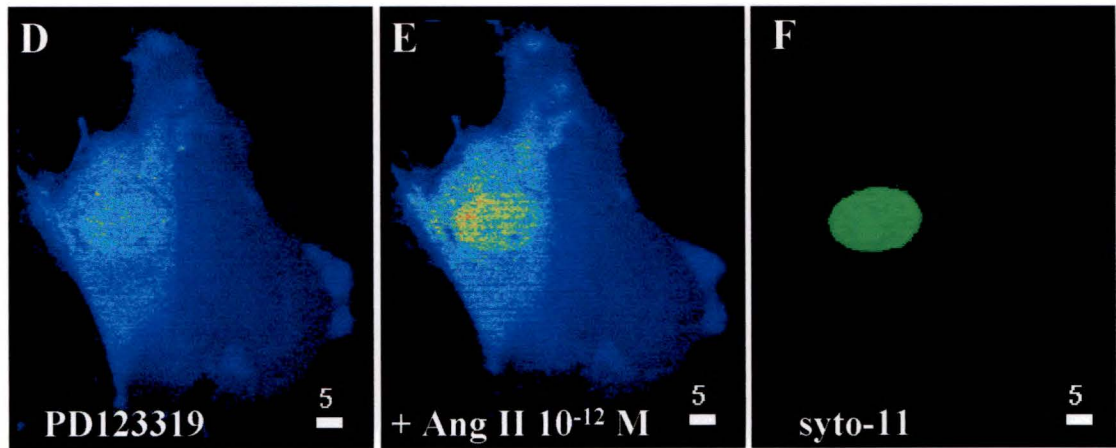
### CEEDs



0

255

### CEEGs



résultats suggèrent donc que le récepteur AT<sub>2</sub> n'est pas impliqué dans la réponse calcique soutenue induite par l'Ang II au niveau de ces cellules.

### **3.4. L'Ang II extracellulaire induit la mobilisation de ses récepteurs dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.**

Très récemment, Bkaily *et al.* (2003) ont démontré que dans les cellules du muscle lisse vasculaire humain exprimant normalement le récepteur AT<sub>1</sub> ou surexprimant le récepteur AT<sub>1</sub> ou le récepteur AT<sub>1</sub> couplé à la GFP, l'Ang II (10<sup>-9</sup> et 10<sup>-4</sup> M) induit l'internalisation et la translocation nucléaire de ce type de récepteur. Comme mentionné auparavant, les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont présents au niveau des CEEDs et des CEEGs provenant de fœtus âgés de 20 semaines. Nous avons donc voulu vérifier si comme pour les récepteurs AT<sub>1</sub> au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire, l'Ang II extracellulaire induit une mobilisation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> au niveau des CEEDs et des CEEGs.

#### **3.4.1. L'Ang II extracellulaire induit la mobilisation du récepteur AT<sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.**

Dans cette série d'expériences, les CEEDs et les CEEGs ont été traitées avec 10<sup>-9</sup> M d'Ang II (une concentration qui produit un effet presque maximal sur le [Ca]<sub>i</sub>) pendant 5, 15, 30 et 60 minutes afin de vérifier si l'Ang II extracellulaire stimule la mobilisation du récepteur AT<sub>1</sub>. Pour étudier ce phénomène, nous avons utilisé la



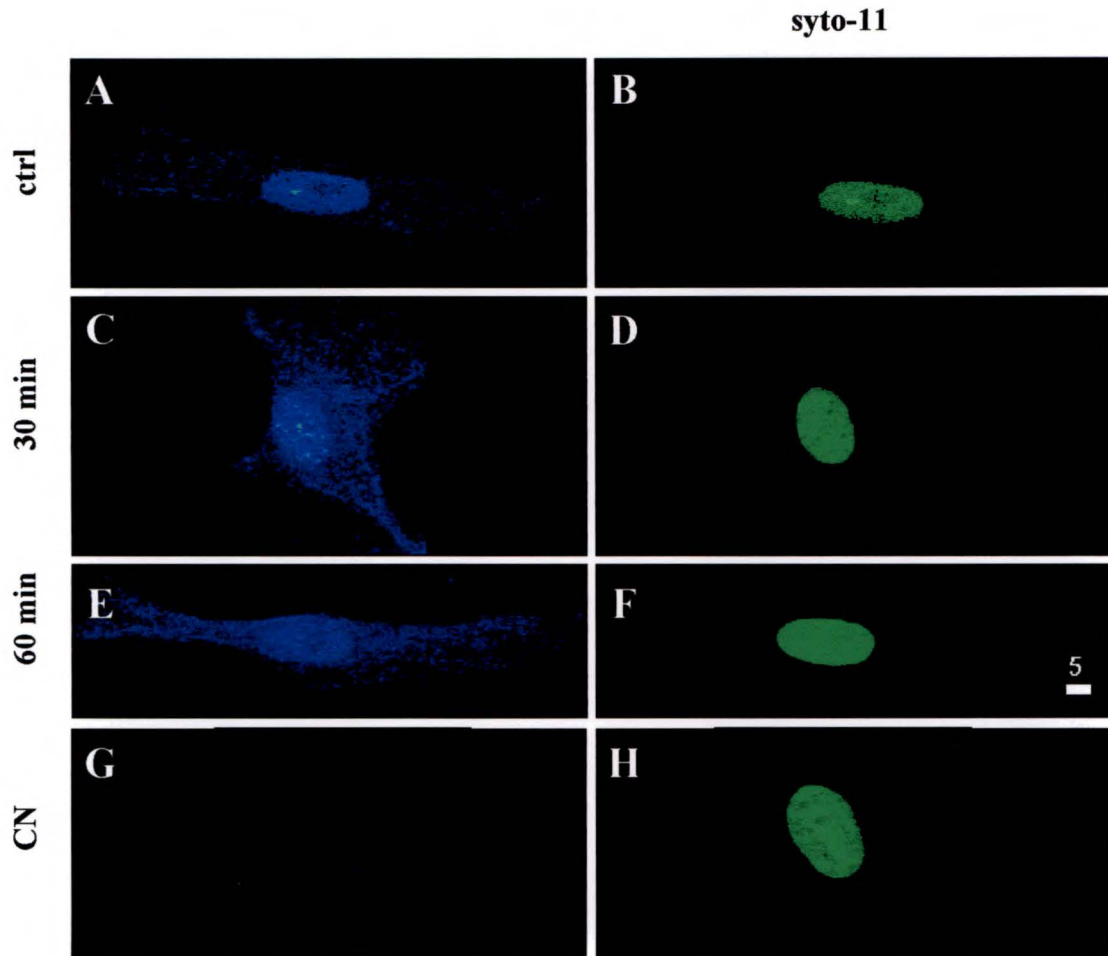
technique d'immunofluorescence indirecte couplée à la microscopie confocale en 3-D. Ces 2 méthodes utilisées simultanément permettent de visualiser d'une façon claire et précise la localisation des récepteurs dans nos cellules. Les figures 21 et 22 illustrent un exemple type pour les CEEDs et les CEEGs, respectivement tandis que la figure 23 montre la compilation des résultats. Il est à noter que les mesures de l'intensité de fluorescence sont faites par unité de surface. Lorsqu'on regarde les cellules sur l'écran de l'ordinateur, le marquage est plus visible que lorsqu'on imprime l'image en 3-D des cellules sur papier.

La figure 21A montre qu'en condition contrôle (cellules non-traitées), le récepteur AT<sub>1</sub> est localisé partout dans les CEEDs et plus particulièrement au niveau du noyau (cytosol:  $2.55 \pm 0.10$ , noyau:  $6.12 \pm 0.51$ ; n=6). Comme nous pouvons le distinguer dans cette figure et la figure 23, suite à un traitement des CEEDs avec  $10^{-9}$  M d'Ang II pendant 5 min, il y a une augmentation hautement significative de l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>1</sub> par rapport au contrôle et ceci de 42% (par rapport au contrôle) au niveau du cytosol et de 72% au niveau du noyau (Ang II  $10^{-9}$  M après 5 min: cytosol:  $3.61 \pm 0.24$ , noyau:  $10.56 \pm 0.56$ ; p<0.0001; n= 4). Après 15 et 30 min de traitement, cette augmentation reste hautement significative et ceci de 50% et 52% au niveau du cytosol respectivement, et de 88% et 95% au niveau du noyau respectivement (Ang II  $10^{-9}$  M après 15 min: cytosol:  $3.81 \pm 0.31$ ; noyau:  $11.49 \pm 0.88$ ; n=6; Ang II  $10^{-9}$  M après 30 min: cytosol:  $3.88 \pm 0.26$ ; noyau:  $11.93 \pm 0.73$ ; n=5; p<0.0001). Après 60 min de traitement avec  $10^{-9}$  M d'Ang II, nous remarquons que l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>1</sub> diminue au niveau du cytosol et du noyau tout en restant significativement plus élevé (une augmentation de 42% et 44%, respectivement) par rapport au contrôle et

**Figure 21** Expérience représentative de l'effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT<sub>1</sub> dans les CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

(A) Reconstruction en 3-D (vue d'en haut) d'une CEED non-traitée. Les cellules expriment le récepteur AT<sub>1</sub> au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau avec une immunoréactivité plus marquée au niveau nucléaire. (C et E) Reconstruction en 3-D d'une CEED montrant l'immunoréactivité du récepteur AT<sub>1</sub> suite au traitement avec de l'Ang II 10<sup>-9</sup> M après 30 min et 60 min, respectivement. (G) contrôle négatif effectué en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul. Après 30 min, l'Ang II induit une augmentation hautement significative de l'intensité de fluorescence des récepteurs AT<sub>1</sub> au niveau du cytosol et du noyau par rapport aux cellules non-traitées (contrôle) tandis qu'après 60 min, celle-ci diminue en restant significativement plus élevée que les valeurs obtenues en condition contrôle (cellules non-traitées). (B, D, F et H) Délimitation du noyau à l'aide du syto-11 des cellules des panneaux A, C, E et G, respectivement. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur AT<sub>1</sub> allant de 0 à 255. La couleur dans les panneaux B, D, F et H n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en µm.

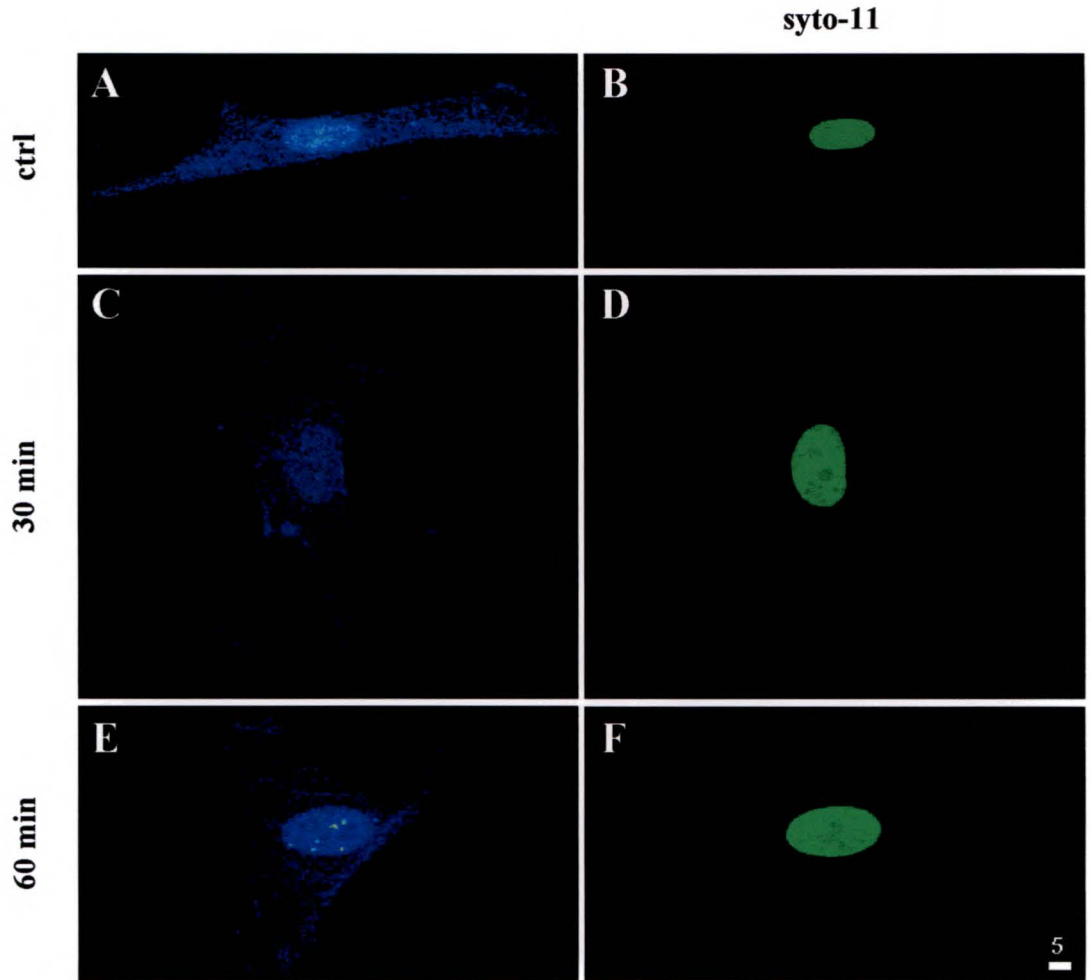
# Récepteur AT<sub>1</sub> / CEEDs



**Figure 22** Expérience représentative de l'effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT<sub>1</sub> dans les CEEG isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

(A) Reconstruction en 3-D (vue d'en haut) d'une CEEG non-traitée. Les cellules expriment le récepteur AT<sub>1</sub> au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau avec une immunoréactivité plus marquée au niveau nucléaire. (C et E) Reconstruction en 3-D d'une CEEG montrant l'immunoréactivité du récepteur AT<sub>1</sub> suite au traitement avec de l'Ang II 10<sup>-9</sup> M après 30 min et 60 min, respectivement. Après 30 min, l'Ang II induit une diminution hautement significative des récepteurs AT<sub>1</sub> au niveau du cytosol et du noyau par rapport aux cellules non-traitées tandis qu'après 60 min, l'Ang II induit une augmentation du récepteur AT<sub>1</sub> seulement au niveau du noyau par rapport aux cellules traitées avec l'Ang II pendant 30 min. (B, D et F) Délimitation du noyau à l'aide du syto-11 des cellules des panneaux A, C et E, respectivement. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur AT<sub>1</sub> allant de 0 à 255. La couleur dans les panneaux B, D et F n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en  $\mu\text{m}$ .

# Récepteur AT<sub>1</sub> / CEEGs

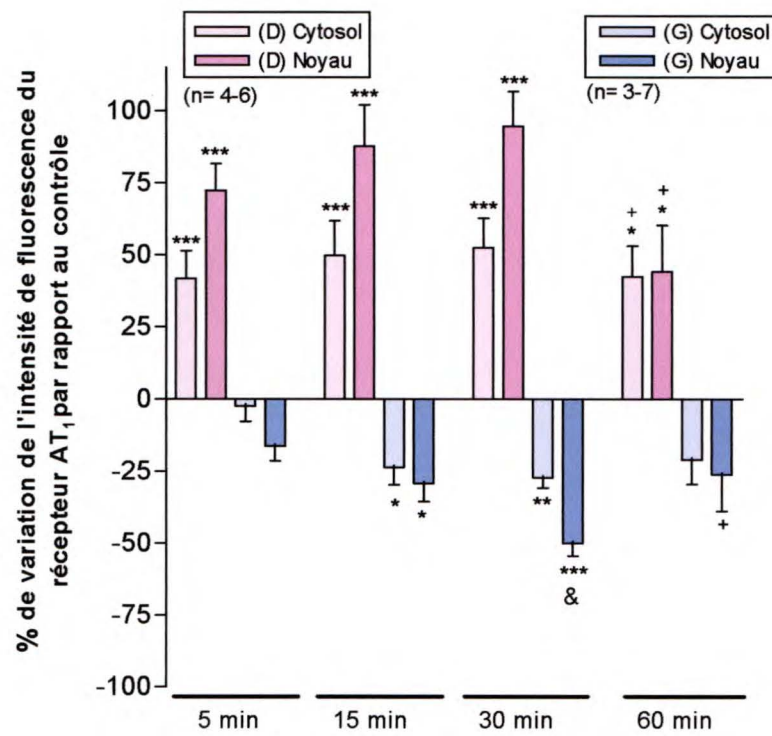


**Figure 23** Effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT<sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

Au niveau des CEEDs (barres ou histogrammes en couleur rose), l'Ang II à une concentration de  $10^{-9}$  M induit une augmentation hautement significative de l'immunoréactivité du récepteur AT<sub>1</sub> au niveau du cytosol et du noyau après 5 min de traitement. Cette augmentation demeure hautement significative au niveau des 2 compartiments cellulaires après 15 min et 30 min de traitement. Il est à noter qu'après 60 min de traitement à l'Ang II ( $10^{-9}$  M), il y a une diminution (par rapport à 30 min de traitement) de l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>1</sub> au niveau du cytosol et du noyau vers des niveaux qui sont toujours significativement plus élevées que les valeurs contrôles.

Au niveau des CEEGs (barres ou histogrammes en couleur blue), l'Ang II à une concentration de  $10^{-9}$  M induit une diminution de l'immunoréactivité du récepteur AT<sub>1</sub> à la fois dans le noyau et dans le cytosol. Cette diminution devient significative dans les 2 compartiments cellulaires après 15 min de traitement et hautement significative après 30 min de traitement. Il est à noter qu'après 60 min de traitement à l'Ang II ( $10^{-9}$  M), l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>1</sub> tend à réaugmenter seulement au niveau du noyau et ce par rapport à 30 min de traitement. (\*) comparaison par rapport au contrôle. (&) comparaison 30 min versus 15 min. (+) comparaison 60 min versus 30 min. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; &  $p < 0.05$ ; +  $p < 0.05$ . Les valeurs sont présentées en moyenne  $\pm$  ESM. «n» est le nombre d'expériences indépendantes.

**Effet de l'Ang II extracellulaire ( $10^{-9}$  M) sur la mobilisation du récepteur  $AT_1$   
dans les CEEDs (couleur rose) et les CEEGs (couleur bleue)  
isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.**



ce au niveau des 2 compartiments cellulaires (cytosol:  $3.63 \pm 0.27$ , noyau:  $8.83 \pm 0.98$ ;  $p < 0.05$ ;  $n=4$ ).

Tout comme les CEEDs, nos résultats montrent qu'en condition contrôle (cellules non-traitées), le récepteur  $AT_1$  est localisé dans tous les compartiments cellulaires des CEEGs (Figure 22A) et plus particulièrement au niveau du noyau (cytosol:  $4.28 \pm 0.10$ , noyau:  $15.25 \pm 1.37$ ;  $n=3$ ). Cependant, le traitement des CEEGs avec une concentration d'Ang II de  $10^{-9}$  M produit des effets opposés à ceux obtenus au niveau des CEEDs (figure 23). Comme nous pouvons remarquer dans la figure 22 et dans la figure 23, suite à un traitement des CEEGs avec  $10^{-9}$  M d'Ang II pendant 5 min, il n'y a pas d'effet significatif sur l'intensité de fluorescence du récepteur  $AT_1$  par rapport au contrôle (Ang II  $10^{-9}$  M 5 min: cytosol:  $4.17 \pm 0.23$ , noyau:  $12.75 \pm 0.77$ ;  $n=3$ ). Cette diminution devient significative après 15 min de traitement avec  $10^{-9}$  M d'Ang II à la fois dans le cytosol (24%) et dans le noyau (29%) (Ang II  $10^{-9}$  M 15 min: cytosol:  $3.26 \pm 0.26$ , noyau:  $10.77 \pm 0.94$ ;  $p < 0.05$ ;  $n=4$ ). Cet effet devient hautement significatif dans les 2 compartiments après 30 min de traitement (27% et 50% respectivement dans le cytosol et le noyau; Ang II  $10^{-9}$  M 30 min: cytosol:  $3.10 \pm 0.14$ ;  $p < 0.01$ , noyau:  $7.59 \pm 0.66$ ;  $p < 0.001$ ;  $n=7$ ). Après 60 min de traitement, il y a une réaugmentation (par rapport à 30 min de traitement) de l'intensité de fluorescence du récepteur  $AT_1$  seulement au niveau du noyau (Ang II  $10^{-9}$  M 60 min: cytosol:  $3.37 \pm 0.36$ , noyau:  $11.25 \pm 1.93$ ;  $p < 0.05$ ;  $n=4$ ).

#### **3.4.2. L'Ang II extracellulaire induit la mobilisation du récepteur $AT_2$ dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.**



Dans cette série d'expériences et comme pour le récepteur AT<sub>1</sub>, les CEEDs et les CEEGs ont été traitées avec 10<sup>-9</sup> M d'Ang II pendant 5, 15, 30 et 60 minutes, afin de vérifier si l'Ang II extracellulaire stimule aussi la mobilisation du récepteur AT<sub>2</sub>. Pour étudier ce phénomène, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte couplée à la microscopie confocale en 3-D. Les figures 24 et 25 illustrent un exemple type pour chaque type cellulaire et la figure 26 montre la compilation des résultats.

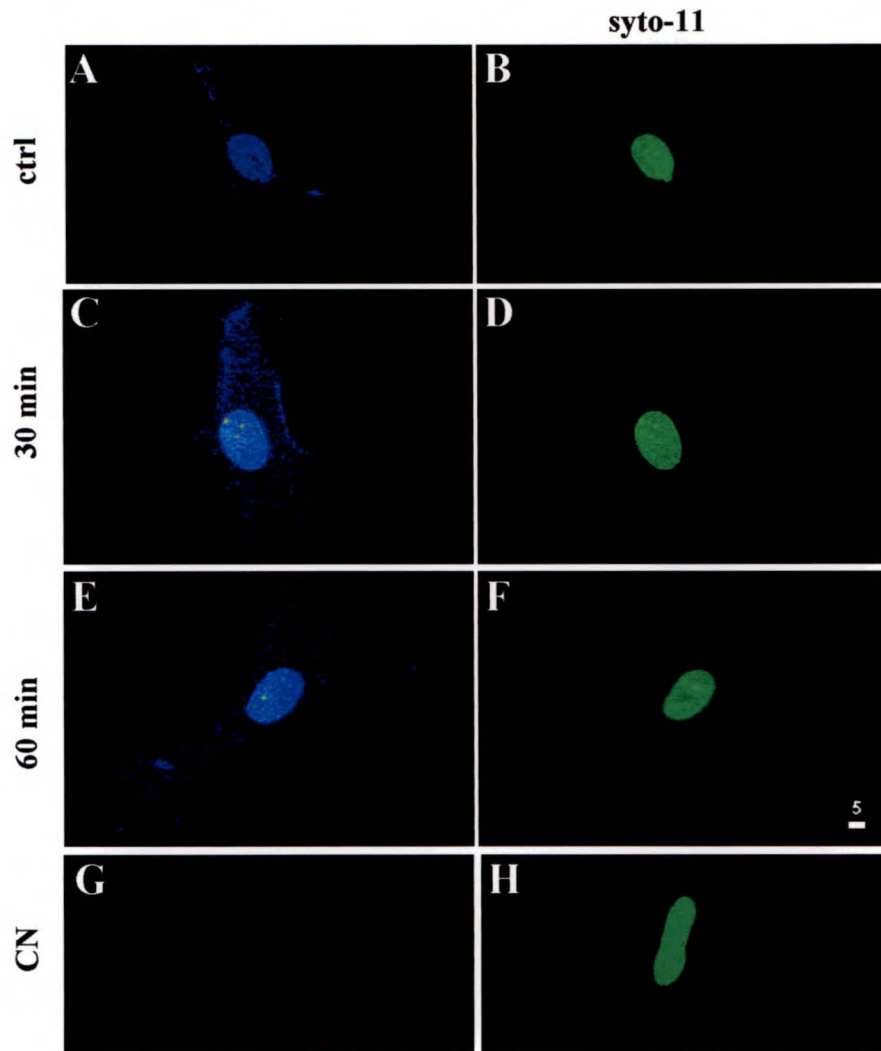
La figure 24A montre qu'en condition contrôle (cellules non-traitées), le récepteur AT<sub>2</sub> est localisé au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et plus particulièrement au niveau du noyau des CEEDs (cytosol: 1.78 ± 0.03, noyau: 4.28 ± 0.31; n=6). Comme le montre cette figure et la figure 26, suite à un traitement des CEEDs avec 10<sup>-9</sup> M d'Ang II pendant 5 min ou 15 min, il ne semble pas avoir d'effet sur les niveaux d'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau du cytosol et du noyau par rapport au contrôle (Ang II 10<sup>-9</sup> M 5 min: cytosol: 1.74 ± 0.08, noyau: 4.11 ± 0.82; n=4; Ang II 10<sup>-9</sup> M 15 min: cytosol: 1.80 ± 0.15, noyau: 4.60 ± 1.01; n= 3). Après 30 min de traitement, cette augmentation devient hautement significative dans le cytosol (22%) et significative dans le noyau (52%) (Ang II 10<sup>-9</sup> M 30 min: cytosol: 2.18 ± 0.17; p<0.0001, noyau: 6.50 ± 1.14; p<0.05; n=4). Après 60 min de traitement avec 10<sup>-9</sup> M d'Ang II, nous observons un retour presque aux valeurs contrôles de l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau cytosol (1.92 ± 0.07, n=4). Par contre, le niveau du récepteur AT<sub>2</sub> nucléaire reste relativement élevé (6.64 ± 0.55; n=4) par rapport au contrôle.

Tout comme les CEEDs, nos résultats montrent qu'en condition contrôle (cellules non-traitées), le récepteur AT<sub>2</sub> est localisé au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et plus particulièrement au niveau du noyau des CEEGs (cytosol: 2.00 ± 0.06,

**Figure 24** Expérience représentative de l'effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT<sub>2</sub> dans les CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

(A) Reconstruction en 3-D (vue d'en haut) d'une CEED non-traitée. Les cellules expriment le récepteur AT<sub>2</sub> surtout au niveau nucléaire. (C et E) Reconstruction en 3-D d'une CEED montrant l'immunoreactivité du récepteur AT<sub>2</sub> suite au traitement avec l'Ang II 10<sup>-9</sup> M après 30 min et 60 min, respectivement. (G) contrôle négatif effectué en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul. Après 30 min de traitement avec l'Ang II, il y a une augmentation hautement significative de l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau du cytosol et significative au niveau du noyau. Après 60 min de traitement, il y a une légère augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau du noyau mais pas au niveau du cytosol. (B, D, F et H) Délimitation du noyau à l'aide du syto-11 des cellules des panneaux A, C, E et G, respectivement. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur AT<sub>2</sub> allant de 0 à 255. La couleur dans les panneaux B, D, F et H n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en µm.

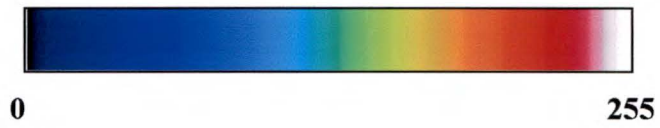
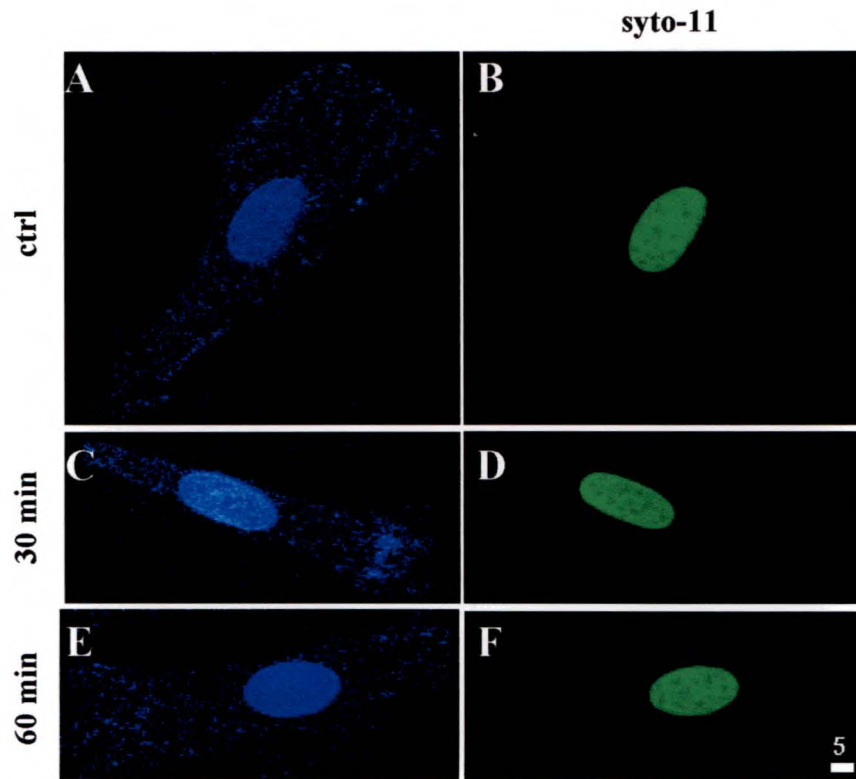
# Récepteur AT<sub>2</sub> / CEEDs



**Figure 25** Expérience représentative de l'effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT<sub>2</sub> dans les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

(A) Reconstruction en 3-D (vue d'en haut) d'une CEEG non-traitée. Les cellules expriment le récepteur AT<sub>2</sub> au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et plus particulièrement au niveau du noyau. (C et E) Reconstruction en 3-D d'une CEEG montrant l'immunoreactivité du récepteur AT<sub>2</sub> suite au traitement avec de l'Ang II 10<sup>-9</sup> M après 30 min et 60 min, respectivement. Après 30 min de traitement, il y a une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau du cytosol et du noyau tandis qu'après 60 min de traitement, il y a une légère diminution de l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau du cytosol et du noyau qui n'est pas significative par rapport à 30 min de traitement. (B, D et F) Délimitation du noyau à l'aide du syto-11 des cellules des panneaux A, C et E, respectivement. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur AT<sub>2</sub> allant de 0 à 255. La couleur dans les panneaux B, D et F n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en  $\mu\text{m}$ .

# Récepteur AT<sub>2</sub> / CEEGs

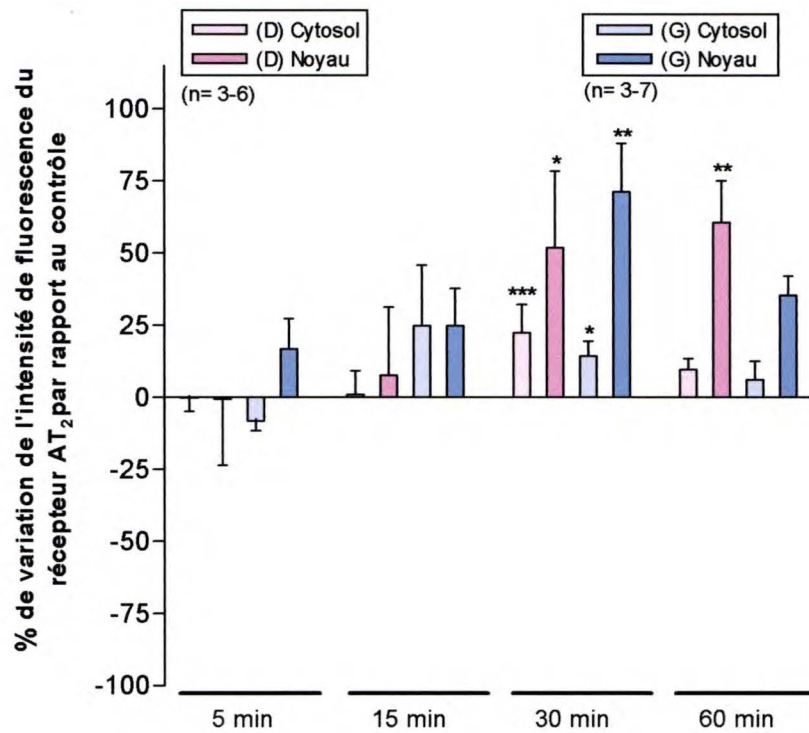


**Figure 26 Effet de l'Ang II extracellulaire sur la mobilisation du récepteur AT<sub>2</sub> dans les CEEDs et les CEEGs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.**

Au niveau des CEEDs (barres ou histogrammes en couleur rose), l'Ang II à une concentration de  $10^{-9}$  M induit une augmentation de l'immunoréactivité du récepteur AT<sub>2</sub> dans le cytosol et le noyau. Après 30 min de traitement, cette augmentation devient hautement significative dans le cytosol et significative dans le noyau tandis qu'après 60 min de traitement, il y a une légère augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau du noyau mais pas au niveau du cytosol.

Au niveau des CEEGs (barres ou histogrammes en couleur bleue), l'Ang II à une concentration de  $10^{-9}$  M induit une augmentation de l'immunoréactivité du récepteur AT<sub>2</sub> dans le cytosol et le noyau. Cette augmentation devient significative dans les 2 compartiments cellulaires après 30 min de traitement. Il est à noter qu'après 60 min de traitement, l'intensité de fluorescence du récepteur AT<sub>2</sub> a tendance à diminuer surtout au niveau nucléaire. (\*) comparaison par rapport au contrôle, effet qui n'est pas significatif par rapport à 30 min de traitement. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Les valeurs sont présentées en moyenne  $\pm$  ESM. «n» est le nombre d'expériences indépendantes.

**Effet de l'Ang II extracellulaire ( $10^{-9}$  M) sur la mobilisation du récepteur  $AT_2$   
dans les CEEDs (couleur rose) et les CEEGs (couleur bleue)  
isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.**



noyau:  $5.69 \pm 0.67$ ;  $n=7$ ) (figure 25A). Comme le montre la figure 25 et la figure 26, le traitement des CEEGs avec une concentration de  $10^{-9}$  M d'Ang II pendant 5 à 15 min n'a pas d'effet significatif sur l'intensité de fluorescence du récepteur  $AT_2$  par rapport au contrôle (Ang II  $10^{-9}$  M 5 min: cytosol:  $1.84 \pm 0.07$ , noyau:  $6.65 \pm 0.60$ ;  $n=3$ ; Ang II  $10^{-9}$  M 15 min: cytosol:  $2.50 \pm 0.42$ , noyau:  $7.11 \pm 0.73$ ;  $n=4$ ). Par contre, après 30 min de traitement, il y a une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur  $AT_2$  et ceci au niveau des 2 compartiments cellulaires (14% et 71% au niveau du cytosol et du noyau respectivement) (Ang II  $10^{-9}$  M 30 min: cytosol:  $2.29 \pm 0.11$ ;  $p<0.05$ ; noyau:  $9.75 \pm 0.10$ ;  $p<0.001$ ;  $n=5$ ). Après 60 min de traitement avec  $10^{-9}$  M d'Ang II, il y a une légère diminution de l'intensité de fluorescence du récepteur  $AT_2$  au niveau du cytosol et du noyau mais qui n'est pas significative par rapport à 30 min de traitement (Ang II  $10^{-9}$  M 60 min: cytosol:  $2.12 \pm 0.13$ , noyau:  $7.71 \pm 0.38$ ;  $n=3$ ).



#### **IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

L'Ang II est un octapeptide qui joue un rôle très important dans la médiation des actions physiologiques du système rénine-angiotensine (PEACH, 1977; TIMMERMANS *et al.*, 1993; KIM et IWAO, 2000). La majorité des études qui portent sur l'Ang II ont été effectuées au niveau du cerveau, des reins, des glandes surrénales, du cœur et des vaisseaux sanguins incluant les cellules endothéliales vasculaires (PEACH, 1977; DOSTAL *et al.*, 1994; HOLTZ et GOETZ, 1994; NAVAR *et al.*, 1996; ALLEN *et al.*, 1998). Au niveau du cœur, la plupart des études concernant l'Ang II ont été effectuées sans tenir compte de la contribution de l'endothélium endocardique (EE) à l'effet cardiaque de l'Ang II. Pour cette raison, l'Ang II circulant et/ou l'Ang II produit localement au niveau des CEEs peut agir directement sur les CEEs et ainsi promouvoir la sécrétion de plusieurs facteurs dépendant du calcium intracellulaire. De plus, l'Ang II produit par les CEEs peut atteindre les myocytes cardiaques et activer les récepteurs à l'Ang II et ainsi moduler la fonction cardiaque. Récemment, notre groupe a montré que les CEEs fœtales humaines âgées de 20 semaines possèdent non seulement des récepteurs au neuropeptide Y (NPY) mais aussi le NPY lui-même (SADER, 2002). Par contre, seulement les CEEs issues du ventricule droit sont capables de sécréter ce peptide (SADER, 2002). L'étude récemment effectuée dans notre laboratoire a clairement démontré que même si les CEEs isolées des ventricules droit et gauche possèdent le NPY et ses récepteurs, il existe une différence entre ces cellules de différentes origines ventriculaires en ce qui concerne les types de récepteurs présents ainsi que leurs distributions et leurs contributions à la modulation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire de ces cellules (SADER, 2002). De plus, nous avons rapporté dans notre laboratoire que les CEEs possèdent les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  et que le récepteur  $ET_B$  participe à l'augmentation

du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire induite par l'ET-1 au niveau des CEEDs (JACQUES *et al.*, 2000). Dans cette même étude, nous avons également démontré que l'ET-1 induit une augmentation dose-dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et nucléaire avec des valeurs d' $\text{EC}_{50}$  plus faibles au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs (JACQUES *et al.*, 2000). Deux autres études rapportent également des différences entre les CEEs isolées des ventricules droit et gauche. Ces études ont montré que les CEEs isolées du ventricule gauche du cœur de porc adulte libèrent plus de  $\text{PGI}_2$  que les CEEs isolées du ventricule droit lorsqu'il y a augmentation de la pression transmurale au niveau cardiaque (NOSAKA *et al.*, 1997). De plus, l'expression et les sites de liaison du peptide natriurétique sont plus abondants au niveau des CEEs isolées du ventricule droit du cœur de rat adulte par rapport aux CEEs isolées du ventricule gauche (RIM *et al.*, 1999).

Dans ce mémoire de maîtrise, nous avons voulu vérifier si comme le NPY et ses récepteurs, l'Ang II et ses récepteurs sont présents au niveau des CEEs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Nous avons aussi voulu vérifier leurs densités, distributions ainsi que leurs effets sur le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire au niveau des CEEs issues du ventricule droit par rapport à celles issues du ventricule gauche.

#### **4.1. Distribution et expression de l'Ang II et des récepteurs $\text{AT}_1$ et $\text{AT}_2$ au niveau des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.**

Dans la première partie de cette étude, nos résultats ont démontré la présence de l'Ang II et de ses récepteurs au niveau des CEEs isolées à partir des ventricules droit et

gauche des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. L'utilisation de l'immunofluorescence indirecte et de la microscopie confocale nous a permis de visualiser en 3-D la distribution du peptide et ses récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ainsi que de mesurer leur densité relative dans les différents compartiments cellulaires.

Nos résultats ont montré que les CEEs issues des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines possèdent le récepteur AT<sub>1</sub>. Ces résultats suggèrent que comme les cellules endothéliales vasculaires (CEVs) issues de la veine ombilicale humaine (DIMMELER *et al.*, 1997), de l'aorte de rat (PUEYO *et al.*, 1996) et de bovin (MONTON *et al.*, 1997) ainsi qu'au niveau de l'artère coronaire de rat (STOLL *et al.*, 1995), les CEEs ventriculaires humaines possèdent, en général, des récepteurs à l'Ang II de type AT<sub>1</sub>. Ce récepteur semble être présent non seulement au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau du cytosol et du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire. La densité de ce récepteur semble être significativement plus élevée au niveau du noyau et ceci dans les CEEDs et les CEEGs. De plus, nos résultats suggèrent que la densité du récepteur AT<sub>1</sub> est plus élevée au niveau du cytosol et du noyau des CEEGs par rapport aux CEEDs et plus particulièrement au niveau nucléaire. Nous avons aussi démontré par immunobuvardage western la présence de ce type de récepteur au niveau des CEEDs et des CEEGs.

Nos résultats ont également montré que les CEEDs et les CEEGs possèdent le récepteur AT<sub>2</sub>. Ce type de récepteur semble être présent au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et plus particulièrement au niveau du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEDs et des CEEGs. Nos résultats suggèrent également que la densité relative du récepteur AT<sub>2</sub> est plus élevée au niveau du cytosol et

du noyau des CEEGs par rapport aux CEEDs. La présence de ce type de récepteur a été confirmée au niveau des CEEDs et des CEEGs par immunobuvardage western. Ces résultats suggèrent que comme les CEVs de plusieurs espèces et plus précisément au niveau des CEVs de la veine ombilicale humaine (DIMMELER *et al.*, 1997), de l'artère coronaire de rat (STOLL *et al.*, 1995) et de l'aorte de bovin (MONTON *et al.*, 1997), les CEEs humaines isolées des ventricules droit et gauche possèdent le récepteur à l'Ang II de type AT<sub>2</sub>.

En utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte jumelée à la microscopie confocale en 3-D, nos résultats ont également démontré la présence de l'Ang II au niveau des CEEs. L'Ang II semble être distribuée de façon homogène dans les CEEDs et les CEEGs avec une intensité de fluorescence comparable au niveau du cytosol et du noyau. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans plusieurs études montrant que les cellules endothéliales (KIFOR et DZAU, 1987; KUSAKA *et al.*, 2000; XIAO *et al.*, 2000; COOK *et al.*, 2001) et les CMLVs de rat (HALLER *et al.*, 1996) contiennent de l'Ang II. Il a été suggéré que l'Ang II présent à l'intérieur de la cellule peut provenir de l'internalisation du complexe Ang II/récepteur AT<sub>1</sub> ainsi que de la translocation nucléaire de ce complexe (VAN KATS *et al.*, 1997; LU *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2000) ou de sa synthèse à l'intérieur des cellules (KIFOR et DZAU, 1987; XIAO *et al.*, 2000; KUSAKA *et al.*, 2000). L'origine de l'Ang II présent au niveau cytosolique et nucléaire n'est pas encore déterminée et doit être clarifiée dans le futur. Par contre, la cohabitation de l'Ang II près de ses récepteurs au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire peut suggérer que cet octapeptide peut être disponible pour activer ses récepteurs partout où ceux-ci sont présents au niveau des membranes des organites de la

cellule incluant les membranes nucléaires. Des études récentes au niveau des noyaux isolés ont démontré qu'effectivement l'Ang II cytosolique est capable d'activer ses récepteurs présents au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire (BKAILY *et al.*, 2003). D'autres études sont nécessaires afin de confirmer ces résultats au niveau des noyaux isolés des CEEs.

Même si la densité relative de l'Ang II et ses récepteurs au niveau cytosolique (incluant la membrane de surface) est relativement faible par rapport au noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire), nos résultats ont montré clairement que non seulement les récepteurs AT<sub>1</sub> et l'Ang II sont présents au niveau du noyau des CEEs, mais aussi les récepteurs AT<sub>2</sub>. En effet, la présence du récepteur AT<sub>1</sub> au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire et du noyau a aussi été rapportée dans d'autres types cellulaires comme au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) de rat (HALLER *et al.*, 1996), des CMLVs aortiques humaines (BKAILY *et al.*, 2003a), des cardiomyocytes d'embryon de poulet (BKAILY *et al.*, 1997) ainsi qu'au niveau des noyaux isolés d'hépatocytes de rat (TANG *et al.*, 1992; EGGENA *et al.*, 1993; BOOZ *et al.*, 1996) et de CMLVs humaines (BKAILY *et al.*, 2003). De plus, plusieurs groupes ont démontré la présence de différents types de récepteurs couplés aux protéines G ainsi que leur ligand au niveau du noyau comme les récepteurs à l'ET-1 (BKAILY *et al.*, 1997a; 2000; 2002; 2003b), les récepteurs EP<sub>3</sub> et EP<sub>4</sub> à la prostaglandine E<sub>2</sub> (BHATTACHARYA *et al.*, 1999; GOBEIL *et al.*, 2002), les récepteurs au facteur activateur de plaquette (PAF) (MARRACHE *et al.*, 2002), les récepteurs Y<sub>1</sub> au NPY (JACQUES *et al.*, 2003), les récepteurs B<sub>1</sub> et/ou B<sub>2</sub> à la bradykinine (BKAILY *et al.*, 1997), les récepteurs kappa aux opiacés (VENTURA *et al.*, 1998) et les récepteurs

"parathyroid hormone-related protein" de l'hormone parathyroïde (MASSFELDER *et al.*, 1997). De plus, plusieurs enzymes ou seconds messagers sont présents au niveau du noyau comme par exemple la phosphatidylinositol 4-kinase (PL<sub>4</sub>K) (PAYRASTRE *et al.*, 1992), la diacylglycerol kinase (PAYRASTRE *et al.*, 1992; BREGOLI *et al.*, 2001), la phospholipase C (PLC) (PAYRASTRE *et al.*, 1992, YORK *et al.*, 1999), la protéine kinase C (LEACH et RABEN, 1993; VENTURA *et al.*, 2003), la phospholipase D (PLD) (BALDASSARE *et al.*, 1997) ainsi que COX-1 et COX-2 (SPENCER *et al.*, 1998). Il a été également rapporté la présence de pompes et canaux ioniques au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire comme par exemple les récepteurs à la ryanodine, à l'IP<sub>3</sub> et l'IP<sub>4</sub>, pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase, échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> et des canaux ioniques de type R (WICKMAN et CLAPHAM, 1995; GERASIMENKO *et al.*, 1996; BKAILY, 1994; BKAILY *et al.*, 1997; XIE *et al.*, 2002). Donc le noyau semble être une cellule à l'intérieur d'une cellule qui possède certains types de canaux ioniques, échangeurs, pompes, récepteurs, seconds messagers et enzymes dépendamment du type cellulaire (BKAILY *et al.*, 2003).

Malgré les similarités qui existent entre les récepteurs de la membrane plasmique et les récepteurs nucléaires, plusieurs études ont rapporté aussi des différences. Par exemple, Tang *et al.* (1992) ont rapporté que la liaison de l'Ang II au récepteur AT<sub>1</sub> au niveau des noyaux isolés d'hépatocytes de rat atteint l'équilibre après 30 min à 25°C comparée à 10 min à 25°C pour sa liaison au niveau du récepteur AT<sub>1</sub> de la membrane plasmique, le pH optimal étant de 7.0 pour la liaison au niveau nucléaire et de 8.0 au niveau de la membrane plasmique. De plus, Booz *et al.* (1992) ont montré qu'à 18°C, la liaison de l'Ang II au récepteur AT<sub>1</sub> atteint l'équilibre après 120 min au niveau des

noyaux isolés d'hépatocytes de rat par rapport à 25 min pour le récepteur AT<sub>1</sub> au niveau de la membrane plasmique, et que l'affinité de la liaison de l'Ang II est plus élevée pour le récepteur AT<sub>1</sub> présent au niveau du noyau par rapport à celui présent au niveau de la membrane plasmique. De même, Bkaily *et al.* (2000; 2002) ont rapporté que les récepteurs à l'endothéline-1 au niveau nucléaire sont dix fois plus sensibles à l'ET-1 que les récepteurs présents au niveau de la sarcolemme des cardiomyocytes d'embryon de poulet et des cellules du muscle lisse vasculaire humain. D'une façon similaire, Gobeil *et al.* (2002) ont démontré que les effets véhiculés par l'activation du récepteur EP<sub>3</sub> au niveau nucléaire sont différents de ceux observés par l'activation de ce même récepteur au niveau de la membrane de surface et que ces récepteurs ne sont pas couplés aux mêmes voies de signalisation, les récepteurs EP<sub>3</sub> présents au niveau de la membrane plasmique étant couplés à l'adénylyl cyclase et les récepteurs EP<sub>3</sub> nucléaires ne l'étant pas. De plus, Marrache *et al.* (2002) ont montré que contrairement aux récepteurs au PAF présents au niveau de la membrane plasmique, les récepteurs au PAF présents au niveau nucléaire sont sensibles à la toxine de pertussis. Il a été aussi rapporté que l'activation des récepteurs des membranes de l'enveloppe nucléaire peut avoir un effet direct sur le noyau. Par exemple, Eggena *et al.* (1993) ont montré que le récepteur AT<sub>1</sub> est présent au niveau des noyaux isolés d'hépatocytes de rat et que sa stimulation par l'Ang II induit spécifiquement l'expression de l'ARNm de la rénine et de l'angiotensinogène d'une façon dose-dépendante, indiquant que ce récepteur est fonctionnel. De plus, il a été rapporté que l'activation des récepteurs nucléaires de l'ET-1 (BKAILY *et al.*, 2002) et du récepteur nucléaire AT<sub>1</sub> de l'Ang II (BKAILY *et al.*, 1997) au niveau des cardiomyocytes d'embryon de poulet ainsi que du récepteur ET<sub>B</sub> nucléaire



(BKAILY *et al.*, 1997; 2003b) au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire humain, cause une augmentation du  $[Ca]_n$  libre due à la mobilisation du  $Ca^{2+}$  nucléoplasmique probablement via une voie dépendante de l' $IP_3$  (BKAILY, 2000) ou à l'activation du canal calcique de type R présent au niveau du noyau (BKAILY, 1994). De même, Gobeil *et al.* (2002) ont rapporté que le récepteur  $EP_3$  de la prostaglandine présent au niveau des membranes nucléaires des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux de porc induit l'expression de la eNOS par la  $PGE_2$  dans ces cellules impliquant l'activation des canaux  $K^+$  dépendant du  $Ca^{2+}$ , la phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3 kinase), la MAP kinase kinase (MEK) et la voie de NF- $\kappa$ B. De plus, Marrache *et al.* (2002) ont montré que la stimulation des récepteurs PAF présents au niveau des noyaux isolés des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux de porc cause une diminution dans la production de l'AMPc, une augmentation de  $[Ca]_n$  qui est sensible à la toxine de pertussis, induit l'expression de gènes proinflammatoires comme la NOS inductible et la cyclooxygénase-2 (COX-2), provoque une augmentation dans le niveau de la phosphorylation des kinases régulées par signal extracellulaire 1 et 2 (ERK 1/2) ainsi qu'une augmentation dans la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN. Toutes ces études suggèrent que les récepteurs présents au niveau du noyau incluant les récepteurs à l'Ang II sont fonctionnels et que ceux-ci partagent des similarités et des différences avec les récepteurs présents au niveau de la membrane plasmique. Ils semblent aussi capables d'activer différentes voies de signalisation et ce dans différents types cellulaires. Des études additionnelles sont nécessaires afin de déterminer les fonctions possibles des récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  nucléaires au niveau des CEEs.

De façon générale, plusieurs fonctions ont été attribuées aux récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Il est bien connu que le récepteur AT<sub>1</sub> véhicule tous les effets classiques de l'Ang II comme par exemple l'élévation de la pression sanguine, la vasoconstriction, l'augmentation de la contractilité cardiaque, le relâchement de l'aldostérone des glandes surrénales, le relâchement des catécholamines des terminaisons nerveuses et l'absorption du sodium et de l'eau (pour revue, voir TIMMERMANS *et al.*, 1993). Quant au récepteur AT<sub>2</sub>, il a été rapporté qu'il est fortement exprimé durant le développement fœtal et plus spécifiquement au niveau du mésenchyme non-différencié de l'intestin et de l'estomac, du tissu conjonctif, du diaphragme, de la langue (GRADY *et al.*, 1991), du derme, de l'épiderme (GRADY et KALINYAK, 1993), ainsi que dans la glande surrénale, l'aorte, le rein et dans certaines régions du cerveau telles le cervelet, l'olive inférieure, et le locus coeruleus (DE GASPARO, 2002). Cependant, son expression diminue rapidement après la naissance (GRADY *et al.*, 1991; MATSUBARA, 1998; HORIUCHI *et al.*, 1999; DE GASPARO, 2002), suggérant que le récepteur AT<sub>2</sub> joue un rôle important durant le développement foetal. Chez le mammifère adulte, ce récepteur est exprimé dans certains tissus tels le cerveau (MILLAN *et al.*, 1991; JOHREN *et al.*, 1996), le cœur (SAMYN *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1998), les reins et les glandes surrénales (BREAUULT *et al.*, 1996). Afin de vérifier si la présence du récepteur AT<sub>2</sub> dans nos cellules est due au stade du développement embryonnaire, et n'ayant pas accès à des cellules endothéliales endocardiques adultes humaines, nous avons démontré la présence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau des CEEDs et des CEEGs isolées à partir du cœur de rat adulte suggérant ainsi qu'à 20 semaines embryonnaires nos CEEs sont comparables aux CEEs adultes. De plus, plusieurs études ont montré que le récepteur AT<sub>2</sub> aurait un effet antiproliférateur. Stoll *et*

*al.* (1995) ont montré que les cellules endothéliales isolées de l'artère coronaire de rat expriment les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> et que le récepteur AT<sub>2</sub> inhibe la prolifération cellulaire véhiculée via le récepteur AT<sub>1</sub>. De même, d'autres études ont montré que la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> inhibe la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire véhiculées via le récepteur AT<sub>1</sub> au niveau des myocytes (BOOZ et BAKER, 1996) et des fibroblastes (VAN KESTEREN *et al.*, 1997; OHKUBO *et al.*, 1997) isolés des cœurs de rats nouveau-nés. Dans ce processus, l'activation du récepteur AT<sub>2</sub> cause une diminution dans l'activité de ERK causée par l'activation de la ERK phosphatase-1 (MKP-1) (MARIC *et al.*, 1998). De plus, des études ont montré l'effet proapoptotique du récepteur AT<sub>2</sub>. Horiuchi *et al.* (1997) ont rapporté que ERK joue un rôle critique dans l'inhibition de l'apoptose dans la lignée cellulaire PC12W en phosphorylant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et que le récepteur AT<sub>2</sub> inhibe l'activation de ERK, résultant ainsi dans l'inactivation de Bcl-2 et l'induction de l'apoptose. De même, au niveau des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, Dimmeler *et al.* (1997) ont montré que la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> par l'Ang II cause l'apoptose via l'activation de la caspase-3, une caspase effectrice. De plus, il est bien documenté dans la littérature que le récepteur AT<sub>2</sub> antagonise les effets du récepteur AT<sub>1</sub>. Par exemple, la réduction dans la taille de l'infarctus chez le porc induite par le blocage du récepteur AT<sub>1</sub> se produit via une cascade de signalisation impliquant l'activation du récepteur AT<sub>2</sub> (JALOWI *et al.*, 1998). Chez les rats souffrants d'infarctus du myocarde, les effets bénéfiques de l'antagoniste du récepteur AT<sub>1</sub>, le L158809, sur l'hypertrophie des myocytes sont supprimés par l'administration intraveineuse simultanée de l'antagoniste du récepteurs AT<sub>2</sub>, le PD123319 (LIU *et al.*, 1997). D'une façon similaire, chez le hamster

cardiomyopathique, les récepteurs AT<sub>2</sub> antagonisent la progression de la fibrose au niveau du myocarde induite par le récepteur AT<sub>1</sub> (OHKUBO *et al.*, 1997). De plus, des études sur des animaux transgéniques clarifient davantage l'interaction entre ces 2 types de récepteurs. Par exemple, les souris "knock-out" pour le gène du récepteur AT<sub>2</sub> manifestent une augmentation significative dans leur pression sanguine de base (HEIN *et al.*, 1995; ICHIKI *et al.*, 1995) alors que la surexpression de ce type de récepteur au niveau du cœur chez la souris diminue les effets chronotropes positifs de l'Ang II et ses effets sur l'augmentation de la pression sanguine véhiculés via le récepteur AT<sub>1</sub> (MASAKI *et al.*, 1998).

Ainsi, la présence des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> au niveau de la membrane plasmique et des membranes de l'enveloppe nucléaire ainsi que de l'Ang II au niveau du cytosol et du noyau des CEEs pourrait expliquer en partie le rôle important de ces récepteurs dans la médiation des effets de l'Ang II dans plusieurs fonctions cellulaires (BOOZ *et al.*, 1992; TANG *et al.*, 1992; HALLER *et al.*, 1996; BKAILY *et al.*, 1997).

#### **4.2. Effet de l'Ang II sur les niveaux de [Ca]<sub>c</sub> et de [Ca]<sub>n</sub> des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines et type de récepteur responsable de cet effet.**

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons étudié l'effet de l'Ang II sur les niveaux calciques cytosolique et nucléaire des CEEDs et des CEEGs des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Nos résultats montrent que l'Ang II induit une augmentation dose-dépendante du [Ca]<sub>c</sub> et du [Ca]<sub>n</sub>. En accord avec ces résultats,

plusieurs groupes ont rapporté que l'Ang II induit une augmentation soutenue et dose-dépendante du calcium intracellulaire libre au niveau de différents types cellulaires tels les cellules endothéliales de l'artère ombilicale humaine (KO *et al.*, 1997), les cellules épithéliales du sein d'origine adulte humaine (GRECO *et al.*, 2002), les cardiomyocytes de rat adulte (SHAO *et al.*, 1998), et les cellules du muscle lisse vasculaire humain (BKAILY *et al.*, 2002). Pour les CEEDs, les valeurs de  $EC_{50}$  obtenus pour le cytosol et le noyau sont de l'ordre de  $10^{-12}$  M, tandis que pour les CEEGs, les valeurs de  $EC_{50}$  obtenus pour le cytosol et le noyau sont de l'ordre de  $10^{-13}$  M suggérant que les CEEGs sont plus sensibles à l'Ang II que les CEEDs. Des différences dans l'effet de l'ET-1 (JACQUES *et al.*, 2000) et du NPY (SADER, 2002) sur les niveaux de  $[Ca]_c$  et  $[Ca]_n$  entre les CEEDs et les CEEGs âgées de 20 semaines ont aussi été rapportées par notre groupe. Le fait que les valeurs des  $EC_{50}$  cytosolique et nucléaire sont similaires que ce soit dans les CEEDs ou dans les CEEGs, suggère que l'augmentation du  $[Ca]_n$  est en grande partie la conséquence de l'augmentation du  $[Ca]_c$  (BKAILY *et al.*, 1996; 1997). Nos résultats démontrent également qu'une concentration d'Ang II de l'ordre de  $10^{-17}$  M est capable d'induire une augmentation du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  à la fois dans les CEEDs et les CEEGs, suggérant que ces cellules sont extrêmement sensibles à l'Ang II comme il a été rapporté pour le NPY (JACQUES *et al.*, 2003). De plus, il semble que ce peptide semble jouer un rôle important dans la régulation de l'homéostasie calcique des CEEs. Nos résultats suggèrent également que l'augmentation du  $[Ca]_i$  par l'Ang II peut contribuer au relâchement des médiateurs cardioactifs pouvant affecter non seulement la contractilité cardiaque (BRUSAERT et ANDRIES, 1992; SHAH, 1996) mais aussi l'excitation-sécrétion des CEEs (JACQUES *et al.*, 2003). Par exemple, il a été démontré que

l'augmentation du  $[Ca]_i$  est l'élément clé qui déclenche des cascades d'évènements nécessaires à la production du NO (GRAIER *et al.*, 1992; PARTON, 1996, MICHEL *et al.*, 1997; PRABHAKAR *et al.*, 1998), de la  $PGI_2$  (CLARK *et al.*, 1995; PATEL *et al.*, 1996), de l'ET-1 (Bkaily *et al.*, 2003), du NPY (JACQUES *et al.*, 2003) ainsi qu'au relâchement des facteurs tels que le facteur von Willbrand (BIRCH *et al.*, 1992).

Nos résultats ont montré que l'antagoniste non-peptidique sélectif du récepteur  $AT_1$ , le losartan, bloque l'effet de l'Ang II sur l'augmentation du  $[Ca]_i$  au niveau des CEEDs et des CEEGs. Ces résultats suggèrent qu'en général l'effet de l'Ang II sur la  $[Ca]_i$  dans les CEEs est véhiculé principalement via l'activation du récepteur  $AT_1$ , puisque le traitement de nos cellules avec  $10^{-7}$  M de losartan a complètement prévenu l'augmentation du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  induite par l'Ang II. De plus, le traitement de nos cellules avec  $10^{-7}$  M de l'antagoniste non-peptidique sélectif du récepteur  $AT_2$ , le PD123319, n'a pas pu prévenir l'augmentation du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  par l'Ang II au niveau des CEEDs et des CEEGs. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres groupes qui ont montré que l'activation du récepteur  $AT_1$  est responsable de l'augmentation du  $[Ca]_i$  dans certains types cellulaires comme les cellules endothéliales de l'artère ombilicale humaine (KO *et al.*, 1997) et les cellules épithéliales du sein d'origine fœtale humaine (GRECO *et al.*, 2002). Cependant, Shao *et al.* (1998) ainsi que El-Bizri (2001) ont rapporté que les 2 types de récepteurs à l'Ang II, les récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$ , sont responsable de l'augmentation du  $[Ca]_i$  dans les cardiomyocytes de rat adulte (SHAO *et al.*, 1998) ainsi que de l'embryon de poulet et fœtal humain âgé de 20 semaines (EL-BIZRI, 2001). Le fait que l'augmentation du  $[Ca]_i$  induite par l'Ang II est véhiculée par les récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  dans les cardiomyocytes adultes (SHAO *et al.*,

1998) et fœtaux humains (EL-BIZRI, 2001) et que, dans les CEEs fœtales humaines, celle-ci est véhiculée uniquement via l'activation du récepteur  $AT_1$  suggère que l'absence d'effet de l'activation des récepteurs  $AT_2$  sur le  $[Ca]_i$  des CEEs n'est pas due à leur origine fœtale mais plutôt au type cellulaire. Il est donc difficile de généraliser sur le rôle du récepteur  $AT_2$  dans la régulation du  $[Ca]_i$  et il semble que l'augmentation du  $[Ca]_c$  et du  $[Ca]_n$  par l'Ang II peut être véhiculée par le récepteur  $AT_1$  et/ou  $AT_2$  dépendamment du type cellulaire étudié.

#### **4.3. Effet de l'Ang II sur la mobilisation des récepteurs $AT_1$ et $AT_2$ au niveau des CEEs isolées des ventricules droit et gauche du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.**

Dans la dernière partie de notre étude et afin de confirmer davantage qu'une différence existe entre les CEEs droites et gauches, nous avons étudié l'effet d'un prétraitement à l'Ang II sur la mobilisation des récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  des CEEDs et des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains de 20 semaines. Nos résultats suggèrent qu'au niveau des CEEDs, l'Ang II extracellulaire ( $10^{-9}$  M) induit une mobilisation du récepteur  $AT_1$ . Par contre, cette mobilisation des récepteurs  $AT_1$  par l'Ang II semble être différente dans les CEEDs par rapport aux CEEGs. En effet, la mobilisation des récepteurs  $AT_1$  dans les CEEDs est associée à une augmentation de la densité relative de ce type de récepteur au niveau cytosolique et nucléaire. Cette augmentation des récepteurs  $AT_1$  peut être due en partie à la synthèse *de novo* de ce type de récepteur comme il a été démontré dans les CMLVs aortiques humaines (BKAILY *et al.*, 2003a). Par contre, à l'opposé des CEEDs, la mobilisation des récepteurs  $AT_1$  dans les CEEGs est suivie par une diminution

de la densité relative de ce type de récepteur au niveau cytosolique et nucléaire. Cet effet peut être dû à la dégradation de ce type de récepteur une fois qu'il est mobilisé par l'Ang II. Il est à noter que l'effet de l'Ang II sur le niveau des récepteurs AT<sub>1</sub> dans les CEEDs et les CEEGs atteint une valeur maximale à 30 min de l'ajout de l'Ang II et à 60 min, il semble que le niveau de ce type de récepteur retourne vers des valeurs près du niveau du contrôle. Ces résultats suggèrent davantage qu'une différence existe entre les CEEDs et les CEEGs en ce qui concerne les mécanismes responsables de la mobilisation, la dégradation et la synthèse *de novo* des récepteurs AT<sub>1</sub>. Les mécanismes impliqués dans ces processus restent à explorer. De plus, il est possible que les changements observés peuvent être dus, en partie, à une variation dans la polarité focalisée dans certains compartiments subcellulaires tel le noyau. Cette possibilité doit être vérifiée dans le futur. Il est difficile d'extrapoler à partir de nos résultats si l'augmentation de la densité des récepteurs AT<sub>1</sub> dans les CEEDs est associée à une synthèse *de novo* de ce type de récepteur et si la diminution des récepteurs AT<sub>1</sub> dans les CEEGs est associée à une dégradation de ce type de récepteur. Ces hypothèses doivent être vérifiées dans le futur en utilisant des bloqueurs de la synthèse protéique comme la cycloheximide ou la puromycine, des bloqueurs des pores nucléaires comme la thapsigargine, en stimulant la transcription en augmentant le nombre de nucléotides (NTPs) et en utilisant des bloqueurs de protéasomes tels le N-acétyl-L-leucinyl-L-leucinal-L-norleucinal, la lactacystine et la bêta-lactone. Ces expériences seront effectuées en utilisant les techniques d'immunofluorescence et d'immunobuvardage western. De plus, il serait intéressant d'étudier la demie-vie des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. De plus, nos résultats semblent suggérer que la synthèse *de novo* ainsi que la dégradation des récepteurs AT<sub>1</sub>



peuvent avoir lieu non seulement au niveau cytosolique mais aussi au niveau nucléaire. Une telle suggestion a été démontrée récemment dans les CMLVs aortiques humaines (BKAILY *et al.*, 2003a). Nos résultats suggèrent aussi que comme pour les récepteurs AT<sub>1</sub>, l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> dans les CEEDs induit une mobilisation de ce récepteur ainsi qu'une augmentation transitoire de sa densité relative qui est très évidente au niveau nucléaire et à 30 min en présence de l'Ang II. Par contre, à l'opposé des récepteurs AT<sub>1</sub>, l'activation du récepteur AT<sub>2</sub> des CEEGs semble induire non seulement la mobilisation de ce type de récepteur mais aussi une augmentation transitoire qui a lieu d'une façon évidente au niveau nucléaire et à 30 min en présence de l'agoniste. Ces résultats suggèrent: 1- comme le récepteur AT<sub>1</sub>, l'activation du récepteur AT<sub>2</sub> peut induire sa mobilisation et peut-être sa translocation et sa synthèse *de novo* au niveau cytosolique et nucléaire; 2- la translocation au niveau nucléaire du récepteur AT<sub>1</sub> peut être facilitée par la présence du motif du signal de localisation nucléaire (NLS) présent dans ce type de récepteur; par contre, les mécanismes de translocation nucléaire du récepteur AT<sub>2</sub> restent à déterminer; 3- la dégradation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> mobilisés peut avoir lieu non seulement au niveau du cytosol mais aussi au niveau du noyau; 4- la synthèse *de novo* peut avoir lieu au niveau du noyau; 5- la cinétique de mobilisation, dégradation et probablement de recyclage ainsi que de synthèse *de novo* des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> semble être similaire (maximale à 30 min). Ceci suggère que probablement les mécanismes impliqués dans ces processus peuvent être similaires. Par contre, puisque la mobilisation des récepteurs AT<sub>1</sub> est associée à une augmentation transitoire des niveaux de ce type de récepteur dans les CEEDs et une diminution transitoire dans les CEEGs tend à suggérer qu'une différence peut exister entre les CEEDs et les CEEGs au

niveau de la colocalisation de l'enzyme responsable de la dégradation du récepteur et/ou une différence dans la cinétique de synthèse et de recyclage de ce type de récepteur. Ces points doivent être étudiés dans le futur. Bien que nos résultats ont montré que l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> module le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, reste que le rôle du récepteur AT<sub>2</sub> dans la fonction des CEEDs reste à découvrir. Il est possible que ce type de récepteur peut être impliqué probablement dans la survie et/ou le cycle cellulaire des CEEs. Ceci reste à explorer.

En conclusion, nos résultats démontrent que : 1) les cellules endothéliales endocardiques isolées à partir des cœurs fœtaux humains de 20 semaines contiennent de l'Ang II et possèdent les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>; 2) le récepteur AT<sub>1</sub> est présent au niveau de la membrane de surface, du cytosol et du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire avec une densité significativement plus élevée au niveau nucléaire et ceci au niveau des CEEDs et des CEEGs; 3) la densité du récepteur AT<sub>1</sub> au niveau du cytosol et du noyau est plus élevée au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs; 4) le récepteur AT<sub>2</sub> est présent au niveau de la membrane de surface, du cytosol et du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire avec une densité significativement plus élevée au niveau nucléaire et ceci au niveau des CEEDs et des CEEGs; 5) la densité du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau du cytosol et du noyau est plus élevée au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs; 6) la présence du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau de nos cellules n'est pas due au stade du développement embryonnaire de nos cellules car les CEEs de rat adulte l'expriment d'une façon similaire; 7) l'Ang II est distribué d'une façon homogène dans le cytosol et le noyau des CEEDs et des CEEGs; 8) l'intensité de fluorescence de l'Ang II au niveau du cytosol et du noyau est similaire dans les CEEDs et les CEEGs; 9) l'Ang II

induit une augmentation dose-dépendante de la concentration du  $[Ca]_c$  et  $[Ca]_n$  à la fois dans les CEEDs et les CEEGs qui est véhiculée via l'activation du récepteur  $AT_1$ ; 10) les CEEGs sont plus sensibles à l'Ang II que les CEEDs et finalement 11) le prétraitement des CEEDs et des CEEGs avec l'Ang II peut induire la synthèse *de novo* et/ou la dégradation des récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  dans nos cellules. Ces résultats démontrent que non seulement l'Ang II augmente le  $Ca^{2+}$  intracellulaire des CEEs et ainsi peut moduler l'excitation-sécrétion de ces cellules, mais aussi montrent qu'une différence entre les CEEDs et les CEEGs existe au niveau non seulement de la distribution des récepteurs à l'Ang II mais aussi de la sensibilité à l'Ang II ainsi que le profil et le taux de mobilisation, de dégradation et probablement de synthèse *de novo* de ses récepteurs. Pour toutes ces raisons, nos résultats démontrent qu'on ne peut pas généraliser sur les propriétés pharmacologiques et fonctionnelles des CEEs et que l'on doit tenir compte de l'origine anatomique des CEEs. Il est clair que ce travail a répondu à certaines questions fondamentales concernant l'Ang II et ses récepteurs au niveau des CEEs. Par contre, ce travail représente un pavé qui marque le début d'un chemin en suscitant des questions extrêmement importantes qui attendent d'être explorées.

## **V. REMERCIEMENTS**

Je tiens avant tout à remercier profondément Dr. Danielle Jacques qui a eu confiance en moi et qui m'a accueillie dans son laboratoire. Je la remercie sincèrement pour la formation scientifique qu'elle m'a offerte, pour sa supervision, pour ses encouragements continuels, pour sa patience et pour le temps qu'elle m'a accordé tout au long de mes études de maîtrise.

Je voudrai également remercier sincèrement Dr. Ghassan Bkaily pour ses conseils précieux, pour son temps et sa passion contagieuse pour la recherche. Je le remercie pour sa perspicacité qui m'a beaucoup aidé à bien accomplir ce mémoire.

Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues de laboratoire et mes amis, Sawsan, Maud, Ghada K., Rami, Magda, Ghada H., Nesrine, Hadia, Joe, Johnny, Sama, Sana, Claudine, Mirna et Moni, pour l'atmosphère d'équipe qu'ils m'ont offert durant mes études. Je remercie particulièrement Nisrine J. et Wassim pour leur amitié et leur support. Je remercie aussi Ghassan Bkaily jr. et Dany Bkaily pour leur assistance technique.

De plus, je tiens à remercier tous les membres du département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire incluant les professeurs, les étudiants, les assistants de recherche et les secrétaires pour leur aide et leur support.

Finalement, je remercie sincèrement les Docteurs Claude Asselin et Fernand Gobeil pour avoir accepté de corriger ce mémoire.

Le support financier de ce travail a été assuré par les subventions de recherche de la fondation des maladies du cœur du Québec (FMCQ) pour Dr. Danielle Jacques.

## **VI. BIBLIOGRAPHIE**

Abu-Soud HM. et Stuehr DJ. (1993). Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 10769-72.

Allen AM., Moeller I., Jenkins TA., Zhuo J., Aldred GP., Chai SY. et Mendelsohn FA. (1998). Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res. Bull.* **47**: 17-28.

Anborgh PH., Seachrist JL., Dale LB. et Ferguson SS. (2000). Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol. Endocrinol.* **14**: 2040-53.

Anderson KM. et Peach MJ. (1994). Receptor binding and internalization of a unique biologically active angiotensin II-colloidal gold conjugate: morphological analysis of angiotensin II processing in isolated vascular strips. *J. Vasc. Res.* **31**: 10-7.

Anderson KM., Murahashi T., Dostal DE. et Peach MJ. (1993). Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **264**: C179-88.

Andries LJ. (1994). Endocardial endothelium: Functional morphology. Austin, TX, Landes. p: 143.

Andries LJ. et Brutsaert DL. (1991). Differences in functional structure between endocardial endothelium and vascular endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17**: S243-S246.

Anversa P., Giacomelli F. et Wiener J. (1975). Intercellular junctions of rat endocardium. *Anat. Rec.* **183**: 477-484.

Arts GJ., Kuersten S., Romby P., Ehresmann B. et Mattaj IW. (1998). The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J.* **17**: 7430-41.

Atlas SA. (1998). The renin-angiotensin system revisited: classical and nonclassical pathway of angiotensin formation. *Mount Sinai J Med.* **65**: 87-96.

Baker KM. (1991) Cardiac actions of angiotensin. *J. Vasc. Med. Biol.* **3**: 30-37.

Baker KM. et Aceto JA. (1989). Characterization of avian angiotensin II cardiac receptors: coupling to mechanical activity and phosphoinositide metabolism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**: 375-82.

Baker KM., Booz GW. et Dostal DE. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Ann. Rev. Physiol.* **54**: 227-41.

Baker KM., Campanile CP., Trachte GJ. et Peach MJ. (1984). Identification and characterization of the rabbit angiotensin II myocardial receptor. *Circ. Res.* **54**: 286-93.

Baker PF., Hodgkin AL. et Ridgway EB. (1971). Depolarisation and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol.* **218**: 709-755.

Baker KM. et Singer HA. (1988). Identification and characterization of guinea pig angiotensin II ventricular and atrial receptors: coupling to inositol phosphate production. *Circ. Res.* **62**: 896-904.

Baldassare JJ., Jarpe MB., Alferes L. et Raben DM. (1997). Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction. *J. Biol. Chem.* **272**: 4911-4.

Barak LS., Tiberi M., Freedman NJ., Kwatra MM., Lefkowitz RJ. et Caron MG. (1994). A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated beta 2-adrenergic receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* **269**: 2790-5.

Barritt GJ. (1999). Receptor-activated  $Ca^{2+}$  inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular  $Ca^{2+}$  signalling requirements. *Biochem. J.* **337**: 153-69.

Bauer JH. et Reams GP. (1995). The angiotensin II type 1 receptor antagonists. A new class of antihypertensive drugs. *Arch. Int. Med.* **155**: 1361-8.

Baumgarten CR., Linz W., Kunkel G., Scholkens BA. et Wiemer G. (1993). Ramiprilat increases bradykinin outflow from isolated hearts of rat. *Br. J. Pharm.* **108**: 293-5.

Becker BJ. (1964). Studies of the human mural endocardium. *J. Pathol. Bacteriol.* **88**: 541-7.

Bedecs K., Elbaz N., Sutren M., Masson M., Susini C., Strosberg AD. et Nahmias C. (1997). Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem. J.* **325**: 449-54.

Berridge M.J. (1995). Calcium signaling and cell proliferation. *Bioessays* **17**: 491-500.

Berridge MJ. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* **220**: 345-60.

Berridge MJ. et Irvine RF. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* **312**: 315-21.

Bhattacharya M., Peri K., Ribeiro-da-Silva A., Almazan G., Shichi H., Hou X., Varma DR. et Chemtob S. (1999). Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **274**: 15719-24.



Bianchi C., Gutkowska J., Charbonneau C., Ballak M., Anand-Srivastava MB., De Lean A., Genest J. et Cantin M. (1986a). Internalization and lysosomal association of [ $^{125}$ I]angiotensin II in norepinephrine-containing cells of the rat adrenal medulla. *Endocrinology*. **119**: 1873-5.

Bianchi C., Gutkowska J., De Lean A., Ballak M., Anand-Srivastava MB., Genest J. et Cantin M. (1986). Fate of [ $^{125}$ I]angiotensin II in adrenal zona glomerulosa cells. *Endocrinology*. **118**: 2605-7.

Birch KA., Pober JS., Zavoico GB., Means AR. et Ewenstein BM. (1992). Calcium/calmodulin transduces thrombin-stimulated secretion: studies in intact and minimally permeabilized human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell Biol.* **118**: 1501-10.

Bkaily G. (1991). Receptor and second messenger modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  channels activity in vascular smooth muscle cells. In: *Ion channels of vascular smooth muscle cells and endothelial cells*. Eds. N. Sperelakis and H. Kuriyama. New York: Elsevier pp: 185-198.

Bkaily G. (ed) (1994). Biophysical and pharmacological properties of T-, L- and R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. In: *Ionic Channels in Vascular Smooth Muscle*. R.G. Landes Company, Austin, pp: 9-21.

Bkaily G. (ed) (1994a). Regulation of R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by insulin and ET-1 in VSM. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle*. Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 41-52.

Bkaily G. (ed) (1994b). Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in VSM by monocyte-released factors. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle*. Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 53-64.

Bkaily G. (ed) (1994c). The possible role of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  channels in vascular smooth muscle pathophysiology. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle*. Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 103-113.

Bkaily G., Choufani S., Hassan G., El-bizri N., Jacques D. et D'Orleans-Juste P. (2000). Presence of functional endothelin-1 receptors in nuclear membranes of human aortic vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**: 414-7.

Bkaily G., Choufani S., Sader S., Jacques D., D'Orléans-Juste P., Nader M., Kurban G. et Kamal M. (2003b). Activation of sarcolemma and nuclear membranes ET-1 receptors regulated transcellular calcium levels in heart and vascular smooth cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**: 654-62.

- Bkaily G., D'Orléans-Juste P., Naik R., Pérodin J., Stankova J., Abdulnour E. et Rola-Pleszczynsky M. (1993). PAF activation of a voltage-gated R-type  $Ca^{2+}$  channel in human and canine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **110**: 519-520.
- Bkaily G., D'Orléans-Juste P., Pothier P., Calixto J B. et Yunes R. (1997). Nuclear membrane receptors and channels : Potential therapeutical targets for drug action. *Drug Dev. Res.* **42**: 211-22.
- Bkaily G., Economos DL., Potvin JL., Ardilouze C., Marriott J., Corcos D., Bonneau C. et Fong N. (1992). Blockade of insulin sensitive steady-state R-type  $Ca^{2+}$  channel by PN 200-110 in heart and vascular smooth muscle. *Mol. Cell Biochem.* **177**: 93-106.
- Bkaily G., Gros-Louis N., Naik R., Jaalouk D. et Pothier P. (1996). Implication of the nucleus in excitation contraction coupling of heart cells. *Mol. Cell Biochem.* **154**: 113-21.
- Bkaily G., Jacques D., D'Orléans-Juste P., Gobeil F Jr., Chemtob S., Choufani S. et Nader M. (2003). Nuclear membranes channels, exchangers and G-protein coupled receptors: a new target for drug action. *Trends Pharmacol. Sci.* (sous presse).
- Bkaily G., Jacques D. et Pothier P. (1999). Use of confocal microscopy to investigate cell structure and function. *Methods in Enzymology.* **307**: 119-35.
- Bkaily G., Massaad D., Choufani S., Jacques D. et D'Orleans-Juste P. (2002). Role of endothelin-1 receptors in the sarcolemma membrane and the nuclear membrane in the modulation of basal cytosolic and nuclear calcium levels in heart cells. *Clin. Sci.* **103**: 141S-147S.
- Bkaily G., Pothier P., D'Orléans-Juste P., Simaan M., Jacques D., Jaalouk D., Belzile F., Hassan G., Boutin C., Haddad G. et Neugebauer W. (1997a). The use of confocal microscopy in the investigation of cell structure and function in the heart, vascular endothelium and smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* **172**: 171-94.
- Bkaily G., Sleiman S., Stephan J., Asselin C., Choufani S., Kamal M., Jacques D., Gobeil F. et D'Orléans-Juste P. (2003a). Angiotensin II AT1 receptor internalization, translocation and *de novo* synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**: 1-14.
- Bkaily G., Wang S., Bui M. et Ménard D. (1995). ET-1 stimulates  $Ca^{2+}$  currents in cardiac cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**: 293-6.
- Bolton T.B. (1979). Mechanisms of action of transmitter and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* **59**: 606-718.
- Bonnardeaux JL. et Regoli D. (1974). Action of angiotensin and analogues on the heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **52**: 50-60.

- Booz GW. et Baker KM. (1996). Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*. **28**: 635-40.
- Booz GW., Conrad KM., Hess AL., Singer HA. et Baker KM. (1992). Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology*. **130**: 3641-9.
- Bouvier M., Hausdorff WP., De Blasi A., O'Dowd BF., Kobilka BK., Caron MG. et Lefkowitz RJ. (1988). Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*. **333**: 370-3.
- Breault L., Lehoux JG. et Gallo-Payet N. (1996). The angiotensin AT2 receptor is present in the human fetal adrenal gland throughout the second trimester of gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 3914-22.
- Brechler V., Jones PW., Levens NR., de Gasparo M. et Bottari SP. (1993). Agonistic and antagonistic properties of angiotensin analogs at the AT2 receptor in PC12W cells. *Regul. Pept.* **44**: 207-13.
- Brechler V., Reichlin S., De Gasparo M. et Bottari SP. (1994). Angiotensin II stimulates protein tyrosine phosphatase activity through a G-protein independent mechanism. *Receptors Channels*. **2**: 89-98.
- Bredt DS., Hwang PM. et Snyder SH. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. **347**: 768-70.
- Bregoli L., Baldassare JJ. et Raben DM. (2001). Nuclear diacylglycerol kinase-theta is activated in response to alpha-thrombin. *J. Biol. Chem.* **276**: 23288-95.
- Brismar H., Asghar M., Carey RM., Greengard P. et Aperia A. (1998). Dopamine-induced recruitment of dopamine D1 receptors to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 5573-8.
- Brutsaert DL. (2003). Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol. Rev.* **83**: 59-115.
- Brutsaert DL. et Andries LJ. (1992). The endocardial endothelium. *Am. J. Physiol.* **263**: H985-1002.
- Brutsaert DL., De Keulenaer GW., Fransen P., Mohan P., Kaluza GL., Andries LJ., Rouleau JL. et Sys SU. (1996). The cardiac endothelium: functional morphology, development, and physiology. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **39**: 239-62.
- Brutsaert DL., Fransen P., Andries LJ., De Keulenaer GW. et Sys SU. (1998). Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovasc. Res.* **38**: 281-90.

- Brutsaert DL., Meulemans AL., Sipido KR. et Sys SU. (1986). Endocardial control of myocardial performance, *Molecular Mechanisms of Muscle Contraction*. Edited by Sugi H, Pollack GH. Hakone, Japan, Plenum Publishers, Proceedings of the 1986 Muscle Symposium. pp: 606-619.
- Buisson B., Bottari SP., de Gasparo M., Gallo-Payet N. et Payet MD. (1992). The angiotensin AT2 receptor modulates T-type calcium current in non-differentiated NG108-15 cells. *FEBS Letters*. **309**: 161-4.
- Busse R., Luckhoff A. et Mulch A. (1991). Cellular mechanisms controlling EDRF/NO formation in endothelial cells. *Basic Res. Cardiol*. **86**: 7-16.
- Campbell DJ. et Habener JF. (1986). Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J. Clin. Invest*. **78**: 31-9.
- Carley WW., Tanoue L., Merker M. et Gillis CN. (1990). Isolation of rabbit pulmonary microvascular endothelial cells and characterization of their angiotensin converting enzyme activity. *Pulm. Pharmacol*. **3**: 35-40.
- Carter TD. et Pearson JD. (1992). Regulation of prostacyclin synthesis in endothelial Cells. *News. Physiol. Sci*. **7**: 64-69.
- Catt K. et Abbott A. (1991). Molecular cloning of angiotensin II receptors may presage further receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci*. **12**: 279-81.
- Catterall WA. et Striessnig J. (1992). Receptor sites for Ca<sup>2+</sup> channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci*. **13**: 256-62.
- Chen R., Mukhin YV., Garnovskaya MN., Thielen TE., Iijima Y., Huang C., Raymond JR., Ullian ME. et Paul RV. (2000). A functional angiotensin II receptor-GFP fusion protein: evidence for agonist-dependent nuclear translocation. *Am. J. Physiol*. **279**: F440-8.
- Chiu AT., Herblin WF., McCall DE., Ardecky RJ., Carini DJ., Duncia JV., Pease LJ., Wong PC., Wexler RR. et Johnson AL. (1989). Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **165**: 196-203.
- Choufani S. (2002). L'endothéline-1 module le calcium cytosolique et nucléaire ainsi que la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules du muscle lisse aortique humaine. *Université de Sherbrooke*.
- Clark JD., Schievella AR., Nalefski EA. et Lin LL. (1995). Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Lipid. Mediat Cell Signal*. **12**: 83-117.
- Claude P. et Goodenough DA. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J. Cell Biol*. **58**: 390-400.

- Conchon S., Monnot C., Teutsch B., Corvol P. et Clauser E. (1994). Internalization of the rat AT1a and AT1b receptors: pharmacological and functional requirements. *FEBS Letters*. **349**: 365-70.
- Cook JL., Zhang Z. et Re RN. (2001). In vitro evidence for an intracellular site of angiotensin action. *Circ Res*. **89**: 1138-46.
- Couttenye MM., De Clerck NM., Herman AG. et Brutsaert DL. (1985). Effects of prostacyclin on contractile properties of isolated mammalian cardiac muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. **7**: 971-6.
- Crozat A., Penhoat A. et Saez JM. (1986). Processing of angiotensin II (A-II) and (Sar1,Ala8)A-II by cultured bovine adrenocortical cells. *Endocrinology*. **118**: 2312-8.
- Curnow KM., Pascoe L. et White PC. (1992). Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Molec. Endocrinol*. **6**: 1113-8.
- Curtis MJ., Pugsley MK. et Walker MJ. (1993). Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res*. **27**: 703-19.
- Danser AH., van Kats JP., Admiraal PJ., Derckx FH., Lamers JM., Verdouw PD., Saxena PR. et Schalekamp MA. (1994). Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension*. **24**: 37-48.
- Das UN., Lee AM. et Barritt GJ. (1983). Prostanoids can modify response to electrical stimulus and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  exchange in isolated myocardial muscle cells. *Prostaglandins Leukot. Med*. **12**: 305-14.
- De Hert SG., Gillebert TC., Andries LJ. et Brutsaert DL. (1993). Role of the endocardial endothelium in the regulation of myocardial function. Physiologic and pathophysiologic implications. *Anesthesiology*. **79**: 1354-66.
- De Gasparo M. (2002). Les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> de l'angiotensine II. L'essentiel. *Drugs*. **62** Spec. Issue: 1-10.
- Dempsey PJ., McCallum ZT., Kent KM. et Cooper T. (1971). Direct myocardial effects of angiotensin II. *Am. J. Physiol*. **220**: 477-81.
- Deschênes C., Vezina A., Beaulieu J.F., et Rivard N. (2001). Role of p27<sup>Kip1</sup> in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology*. **120**: 423-438.
- Dimmeler S., Rippmann V., Weiland U., Haendeler J. et Zeiher AM. (1997). Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ. Res*. **81**: 970-6.

- Dipolo RJ. (1979). Calcium influx in internally dialysed squid axons. *J. Gen. Physiol.* **73**: 91-113.
- Dollinger SJ. et Wahler GM. (1994). A nitric oxide donor has stimulatory and inhibitory effects on the cardiac calcium current, both of which are inhibited by a G-kinase blocker. *Biophysical. J.* **66**: A238.
- Doss RC., Perkins JP. et Harden TK. (1981). Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **256**: 12281-6.
- Dostal DE., Rothblum KN. et Baker KM. (1994). An improved method for absolute quantification of mRNA using multiplex polymerase chain reaction: determination of renin and angiotensinogen mRNA levels in various tissues. *Anal. Biochem.* **223**: 239-50.
- Duff JL., Berk BC. et Corson MA. (1992). Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**: 257-64.
- Dzau VJ., Ellison KE., Brody T., Ingelfinger J. et Pratt RE. (1987). A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology.* **120**: 2334-8.
- Eggena P., Zhu JH., Clegg K. et Barrett JD. (1993). Nuclear angiotensin receptors induce transcription of renin and angiotensinogen mRNA. *Hypertension.* **22**: 496-501.
- El-Bizri N. (2001). Modulation de l'activité calcique cardiaque par les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, les récepteurs à l'Ang II et les récepteurs à la bradykinine cardiaques. *Université de Sherbrooke.*
- Fassina G., Tessari F. et Dorigo P. (1983). Positive inotropic effect of a stable analogue of PGI<sub>2</sub> and of PGI<sub>2</sub> on isolated guinea pig atria. Mechanism of action. *Pharmacol. Res. Commun.* **15**: 735-49.
- Feron O., Smith TW., Michel T. et Kelly RA. (1997). Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 17744-8.
- Fisher ER. et Davis ER. (1958). Observations concerning the pathogenesis of endocardial thickening in the adult heart. *Am. Heart J.* **56**: 553-561.
- Fisher TE. et Bourque CW. (2001). The function of Ca(2+) channel subtypes in exocytotic secretion: new perspectives from synaptic and non-synaptic release. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **77**: 269-303.
- Florey. The endothelial cell. (1996). *Br. Med. J.* **5512**: 487-90.

- Fowler NO., et Holmes JC. (1964). Coronary and myocardial actions of angiotensin. *Circ. Res.* **14**: 191-201.
- Fox AP., Nowycky MC. et Tsien RW. (1987). Single-channel recording of three types of calcium channels in chick sensory neurons. *J. Physiol.* **394**: 173-200.
- Fransen P. et Sys SU. (1997).  $K^+$  and  $Cl^-$  contribute to resting membrane conductance of cultured porcine endocardial endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **272**: H1770-9.
- Fransen PF., Demolder MJ. et Brutsaert DL. (1995). Whole cell membrane currents in cultured pig endocardial endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **268**: H2036-47.
- Frearson JA., Harrison P., Scrutton MC. et Pearson JD. (1995). Differential regulation of von Willebrand factor exocytosis and prostacyclin synthesis in electropermeabilized endothelial cell monolayers. *Biochem. J.* **309**: 473-9.
- Freer RJ., Pappano AJ., Peach MJ., Bing KT., McLean MJ., Vogel S. et Sperelakis N. (1976). Mechanism for the positive inotropic effect of angiotensin II on isolated cardiac muscle. *Circ. Res.* **39**: 178-83.
- Fujita Y., Mynlieff M., Dirksen RT., Kim MS., Niidome T., Nakai J., Friedrich T., Iwabe N., Miyata T. et Furuichi T. (1993). Primary structure and functional expression of the omega-conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron.* **10**: 585-98.
- Furchgott RF. et Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **288**: 373-6.
- Furukawa T., Ito H., Nitta J., Tsujino M., Adachi S., Hiroe M., Marumo F., Sawanobori T. et Hiraoka M. (1992). Endothelin-1 enhances calcium entry through T-type calcium channels in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **71**: 1242-53.
- Gaborik Z., Szaszak M., Szidonya L., Balla B., Paku S., Catt KJ., Clark AJ. et Hunyady L. (2001). Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the  $AT_1$  angiotensin receptor. *Mol. Pharmacol.* **59**: 239-47.
- Gallinat S., Busche S., Raizada MK. et Summers C. (2000). The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am. J. Physiol.* **278**: E357-74.
- Ganong WF. (1984). The brain renin-angiotensin system. *Ann. Rev. Physiol.* **46**: 17-31.
- Ganten D., Hermann K., Unger T. et Lang RE. (1983). The tissue renin-angiotensin systems: focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. *Clin. Exp. Hypertension.* **5**: 1099-118.

- Ganten D. et Speck G. (1978). The brain renin-angiotensin system: a model for the synthesis of peptides in the brain. *Biochem. Pharmacol.* **27**: 2379-89.
- Gavaghan M. Cardiac anatomy and physiology: a review. (1998). *AORN Journal.* **67**: 802-22.
- Gerasimenko OV., Gerasimenko JV., Tepikin AV. et Petersen OH. (1996). Calcium transport pathways in the nucleus. *Pflugers Archiv.* **432**: 1-6.
- Giasson E. et Meloche S. (1995). Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 5225-31.
- Gobeil F JR., Dumont I., Marrache AM., Vazquez-Tello A., Bernier SG., Abran D., Hou X., Beauchamp MH., Quiniou C., Bouayad A., Choufani S., Bhattacharya M., Molotchnikoff S., Ribeiro-da-Silva A., Varma DR., Bkaily G. et Chemtob S. (2002). Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors. *Circ. Res.* **90**: 682-9.
- Gottlieb AI., Langille BL., Wong MK. et Kim DW. (1991). Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab. Invest.* **65**: 123-37.
- Grady EF. et Kalinyak JE. (1993). Expression of AT2 receptors in rat fetal subdermal cells. *Regul. Pept.* **44**: 171-80.
- Grady EF., Sechi LA., Griffin CA., Schambelan M. et Kalinyak JE. (1991). Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest.* **88**: 921-33.
- Graier WF., Groschner K., Schmidt K. et Kukovetz WR. (1992). SK&F 96365 inhibits histamine-induced formation of endothelium-derived relaxing factor in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 1539-45.
- Greco S., Muscella A., Elia MG., Salvatore P., Storelli C. et Marsigliante S. (2002). Activation of angiotensin II type I receptor promotes protein kinase C translocation and cell proliferation in human cultured breast epithelial cells. *J. Endocrinol.* **174**: 205-14.
- Griendling KK., Delafontaine P., Rittenhouse SE., Gimbrone MA Jr. et Alexander RW. (1987). Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 14555-62.
- Griendling KK., Sorescu D., Lassegue B. et Ushio-Fukai M. (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology.* **20**: 2175-83.



Griendling KK., Tsuda T., Berk BC. et Alexander RW. (1989). Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **14**: S27-33.

Grocott-Mason R., Anning P., Evans H., Lewis MJ. et Shah AM. (1994). Modulation of left ventricular relaxation in isolated ejecting heart by endogenous nitric oxide. *Am. J. Physiol.* **267**: H1804-13.

Grocott-Mason R., Fort S., Lewis MJ. et Shah AM. (1994). Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts. *Am. J. Physiol.* **266**: H1699-705.

Hadcock JR. et Malbon CC. (1988). Down-regulation of beta-adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 5021-5.

Haller H., Lindschau C., Erdmann B., Quass P. et Luft FC. (1996). Effects of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **79**: 765-72.

Hausdorff WP., Bouvier M., O'Dowd BF., Irons GP., Caron MG. et Lefkowitz RJ. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **264**: 12657-65.

Hein L., Barsh GS., Pratt RE., Dzau VJ. et Kobilka BK. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature.* **377**: 744-7.

Hein L., Meinel L., Pratt RE., Dzau VJ. et Kobilka BK. (1997). Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol. Endocrinol.* **11**: 1266-77.

Hentze MW. et Kulozik AE. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell.* **96**: 307-10.

Hermans E., Vanisberg MA., Geurts M. et Maloteaux JM. (1997). Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *Neurochem. Intl.* **31**: 291-9.

Hibbs JB Jr., Vavrin Z. et Taintor RR. (1987). L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* **138**: 550-65.

Hilal-Dandan R., Urasawa K. et Brunton LL. (1992). Endothelin inhibits adenylate cyclase and stimulates phosphoinositide hydrolysis in adult cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **267**: 10620-4.

- Hillman D., Chen S., Aung TT., Cherksey B., Sugimori M. et Llinas RR. (1991). Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 7076-80.
- Holtz J. et Goetz RM. (1994). Vascular renin-angiotensin-system, endothelial function and atherosclerosis? *Basic Res. Cardiol.* **89**: 71-86.
- Horiuchi M., Akishita M. et Dzau VJ. (1999). Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* **33**: 613-21.
- Horiuchi M., Hayashida W., Akishita M., Tamura K., Daviet L., Lehtonen JY. et Dzau VJ. (1999a). Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ. Res.* **84**: 876-82.
- Horiuchi M., Hayashida W., Kambe T., Yamada T. et Dzau VJ. (1997). Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**: 19022-6.
- Hosey MM. et Lazdunski M. (1988). Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membr. Biol.* **104**: 81-105.
- Hoyer J., Distler A., Haase W. et Gogelein H. (1994).  $Ca^{2+}$  influx through stretch-activated cation channels activates maxi  $K^{+}$  channels in porcine endocardial endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 2367-71.
- Huang XC., Richards EM. et Summers C. (1996). Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J. Biol. Chem.* **271**: 15635-41.
- Huang XC., Shenoy UV., Richards EM. et Summers C. (1997). Modulation of angiotensin II type 2 receptor mRNA in rat hypothalamus and brainstem neuronal cultures by growth factors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **47**: 229-36.
- Hunyady L. (1999). Molecular mechanisms of angiotensin II receptor internalization. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: S47-56.
- Hunyady L., Bor M., Balla T. et Catt KJ. (1994). Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 31378-82.
- Hunyady L., Merelli F., Baukal AJ., Balla T. et Catt KJ. (1991). Agonist-induced endocytosis and signal generation in adrenal glomerulosa cells. A potential mechanism for receptor-operated calcium entry. *J. Biol. Chem.* **266**: 2783-8.
- Iborra FJ., Jackson DA. et Cook PR. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science.* **293**: 1139-42.

- Ichiki T., Labosky PA., Shiota C., Okuyama S., Imagawa Y., Fogo A., Niimura F., Ichikawa I., Hogan BL. et Inagami T. (1995). Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*. **377**: 748-50.
- Inagami T., Naruse M. et Hoover R. (1995). Endothelium as an endocrine organ. *Ann. Rev. Physiol.* **57**: 171-89.
- Ingelfinger JR. et Dzau VJ. (1991). Molecular biology of renal injury: emphasis on the role of the renin-angiotensin system. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2**: S9-20.
- Iouzalén L., Lantoiné F., Pernollet MG., Millanvoye-Van Brussel E., Devynck MA. et David-Dufilho M. (1996). SK&F 96365 inhibits intracellular  $Ca^{2+}$  pumps and raises cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration without production of nitric oxide and von Willebrand factor. *Cell Calcium*. **20**: 501-8.
- Ishida M., Marrero MB., Schieffer B., Ishida T., Bernstein KE. et Berk BC. (1995). Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **77**: 1053-9.
- Ishida Y., Kawahara Y., Tsuda T., Koide M. et Yokoyama M. (1992). Involvement of MAP kinase activators in angiotensin II-induced activation of MAP kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*. **310**: 41-5.
- Ishizaka N., Griendling KK., Lassegue B. et Alexander RW. (1998). Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension* **32**: 459-66.
- Jacobs LS. et Douglas JG. (1996). Angiotensin II type 2 receptor subtype mediates phospholipase A2-dependent signaling in rabbit proximal tubular epithelial cells. *Hypertension*. **28**: 663-8.
- Jacobson A. et Peltz SW. (1996). Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 693-739.
- Jacques D., Sader S., Choufani S., D'Orleans-Juste P. et Charest D. (2000). Endothelin-1 regulates cytosolic and nuclear  $Ca^{2+}$  in human endocardial endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**: S397-400.
- Jacques D., Sader S., Perreault C., Fournier A., Pelletier G., Beck-Sickingler AG. et Descorbeth M. (2003). Presence of neuropeptide Y and the  $Y_1$  receptor in the plasma membrane and nuclear envelope of human endocardial endothelial cells: modulation of intracellular calcium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**: 288-300.
- Jaloway A., Schulz R., Dorge H., Behrends M. et Heusch G. (1998). Infarct size reduction by  $AT_1$ -receptor blockade through a signal cascade of  $AT_2$ -receptor activation, bradykinin and prostaglandins in pigs. *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**: 1787-96.

- Jan Danser AH. (2003). Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 759-68.
- Janiak P., Pillon A., Prost JF. et Vilaine JP. (1992). Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury. *Hypertension*. **20**: 737-45.
- Joannides R., Richard V., Haefeli WE., Benoist A., Linder L., Luscher TF. et Thuillez C. (1997). Role of nitric oxide in the regulation of the mechanical properties of peripheral conduit arteries in humans. *Hypertension*. **30**: 1465-70.
- Jockers R., Angers S., Da Silva A., Benaroch P., Strosberg AD., Bouvier M. et Marullo S. (1999). Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 28900-8.
- Johnston CI. (1995). Angiotensin receptor antagonists: focus on losartan. *Lancet*. **346**: 1403-7.
- Johren O., Inagami T. et Saavedra JM. (1996). Localization of AT2 angiotensin II receptor gene expression in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **37**: 192-200.
- Kambayashi Y., Bardhan S., Takahashi K., Tsuzuki S., Inui H., Hamakubo T. et Inagami T. (1993). Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* **268**: 24543-6.
- Kapas S., Hinson JP., Puddefoot JR., Ho MM. et Vinson GP. (1994). Internalization of the type I angiotensin II receptor (AT1) is required for protein kinase C activation but not for inositol trisphosphate release in the angiotensin II stimulated rat adrenal zona glomerulosa cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**: 1292-8.
- Karaki H. et Weiss G.B. (1988). Calcium release in smooth muscle. *Life Science* **42**: 111-22.
- Katwa LC., Ratajska A., Cleutjens JP., Sun Y., Zhou G., Lee SJ. et Weber KT. (1995). Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovasc. Res.* **29**: 57-64.
- Katz, B. (1969). The release of neuronal transmitter substances. C.C. Thomas, Ed. Liverpool University Press. Liverpool. Sherrington Lectures (10)IX: 2-5.
- Kelly RA., Eid H., Kramer BK., O'Neill M., Liang BT., Reers M. et Smith TW. (1990). Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway. *J. Clin. Invest.* **86**: 1164-71.
- Kifor I. et Dzau VJ. (1987). Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ. Res.* **60**: 422-8.

- Kim S. et Iwao H. (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.* **52**: 11-34.
- Kim SZ., Cho KW. et Kim SH. (1999). Modulation of endocardial natriuretic peptide receptors in right ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **277**: H2280-9.
- Klein W. et Bock P. (1983). Elastica-positive material in the atrial endocardium. Light and electron microscopic identification. *Acta Anatomica.* **116**: 106-13.
- Ko Y., Glodny B., Stier S., Totzke G., Nickenig G., Dusing R., Sachinidis A. et Vetter H. (1997). Angiotensin type-1 (AT1) receptor gene expression in primarily cultured human arterial umbilical endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **53**: 417-21.
- Kramer BK., Nishida M., Kelly RA. et Smith TW. (1992). Endothelins. Myocardial actions of a new class of cytokines. *Circulation.* **85**: 350-6.
- Kramer BK., Smith TW. et Kelly RA. (1991). Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger. *Circ. Res.* **68**: 269-79.
- Kubes P., Suzuki M. et Granger DN. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 4651-5.
- Kudoh S., Komuro I., Mizuno T., Yamazaki T., Zou Y., Shiojima I., Takekoshi N. et Yazaki Y. (1997). Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Circ. Res.* **80**: 139-46.
- Kusaka Y., Kelly RA., Williams GH. et Kifor I. (2000). Coronary microvascular endothelial cells cosecrete angiotensin II and endothelin-1 via a regulated pathway. *Am. J. Physiol.* **279**: H1087-96.
- Kusuhara M., Takahashi E., Peterson TE., Abe J., Ishida M., Han J., Ulevitch R. et Berk BC. (1998). p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$  exchange and ERK1/2. *Circ. Res.* **83**: 824-31.
- Laite-Moreira AF., Mohan P., Sys SU. et Brutsaert DL. (1994). Myocardial positive inotropic effect of dibutyryl-cyclic GMP in vivo. *Eur. Heart J.* **15**: 144.
- Lang D., Shah AM. et Lewis MJ. (1996). Angiotensin converting enzyme activity: aortic and endocardial endothelium compared. *Endothelium.* **4**: 51-61.
- Lantoine F., Iouzalén L., Devynck MA., Millanvoeye-Van Brussel E. et David-Duflho M. (1998). Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Biochem. J.* **330**: 695-9.

- Laskey RE., Adams DJ., Johns A., Rubanyi GM. et van Breemen C. (1990). Membrane potential and Na(+)-K+ pump activity modulate resting and bradykinin-stimulated changes in cytosolic free calcium in cultured endothelial cells from bovine atria. *J. Biol. Chem.* **265**: 2613-9.
- Lauer MR., Gunn MD. et Clusin WT. (1992). Endothelin activates voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> current by a G protein-dependent mechanism in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.* **448**: 729-47.
- Lazard D., Briend-Sutren MM., Villageois P., Mattei MG., Strosberg AD. et Nahmias C. (1994). Molecular characterization and chromosome localization of a human angiotensin II AT2 receptor gene highly expressed in fetal tissues. *Receptors Channels.* **2**: 271-80.
- Leach KL. et Raben DM. (1993). Nuclear localization of protein kinase C. *Biochem. Soc. Transact.* **21**: 879-83.
- Lee MW. et Severson DL. (1994). Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. *Am. J. Physiol.* **267**: C659-78.
- Leduc I. et Meloche S. (1995). Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 4401-4.
- Lejbkowitz F., Goyer C., Darveau A., Neron S., Lemieux R. et Sonenberg N. (1992). A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 9612-6.
- Levens NR., Peach MJ. et Carey RM. (1981). Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the control of renal function. *Circ. Res.* **48**: 157-67.
- Li K., Rouleau JL., Calderone A., Andries JL. et Brutsaert DL. (1993). Endocardial function in pacing-induced heart failure in the dog. *J. Molec. Cell. Cardiol.* **25**: 529-40.
- Lindpaintner K. et Ganten D. (1991). The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ. Res.* **68**: 905-21.
- Linden RJ. et Kappagoda CT. (1982). Atrial receptors. In: *Monographs of the physiological Society*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, vol. 39, p. 6-30.
- Liu YH., Yang XP., Sharov VG., Nass O., Sabbah HN., Peterson E. et Carretero OA. (1997). Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J. Clin. Invest.* **99**: 1926-35.
- Llinas RR., Sugimori M. et Cherksey B. (1989). Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **560**: 103-11.

Lohse MJ. (1993). Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim. Biophys. Acta.* **1179**: 171-88.

Lohse MJ., Benovic JL., Caron MG. et Lefkowitz RJ. (1990). Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* **265**: 3202-11.

Lokuta AJ., Cooper C., Gaa ST., Wang HE. et Rogers TB. (1994). Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 4832-8.

Lopez JJ., Lorell BH., Ingelfinger JR., Weinberg EO., Schunkert H., Diamant D. et Tang SS. (1994). Distribution and function of cardiac angiotensin AT1- and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am. J. Physiol.* **267**: H844-52.

Lu D., Yang H., Shaw G. et Raizada MK. (1998). Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons. *Endocrinology.* **139**: 365-75.

Luchner A., Stevens TL., Borgeson DD., Redfield MM., Bailey JE., Sandberg SM., Heublein DM. et Burnett JC Jr. (1996). Angiotensin II in the evolution of experimental heart failure. *Hypertension.* **28**: 472-7.

Lund E. et Dahlberg JE. (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science.* **282**: 2082-5.

Luscher TF., Boulanger CM., Yang Z., Noll G. et Dohi Y. (1993). Interactions between endothelium-derived relaxing and contracting factors in health and cardiovascular disease. *Circ.* **87**: S36-S44.

Maric C., Aldred GP., Harris PJ. et Alcorn D. (1998). Angiotensin II inhibits growth of cultured embryonic renomedullary interstitial cells through the AT2 receptor. *Kidney Intl.* **53**: 92-9.

Marks A.R. (1992). Calcium channels expressed in vascular smooth muscle. *Circulation.* **86**: 61-67.

Marrache AM., Gobeil F Jr., Bernier SG., Stankova J., Rola-Pleszczynski M., Choufani S., Bkaily G., Bourdeau A., Sirois MG., Vazquez-Tello A., Fan L., Joyal JS., Filep JG., Varma DR., Ribeiro-Da-Silva A. et Chemtob S. (2002). Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J. Immunol.* **169**: 6474-81.

Marrero MB., Paxton WG., Schieffer B., Ling BN. et Bernstein KE. (1996). Angiotensin II signalling events mediated by tyrosine phosphorylation. *Cellular Signalling.* **8**: 21-6.

- Marrero MB., Schieffer B., Paxton WG., Heerdt L. et Berk BC. (1995). Delafontaine P. Bernstein KE. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*. **375**: 247-50.
- Martens JR., Wang D., Summers C., Posner P. et Gelband CH. (1996). Angiotensin II type 2 receptor-mediated regulation of rat neuronal K<sup>+</sup> channels. *Circ. Res.* **79**: 302-9.
- Martin MM., Su B. et Elton TS. (1994). Molecular cloning of the human angiotensin II type 2 receptor cDNA. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* **205**: 645-51.
- Masaki H., Kurihara T., Yamaki A., Inomata N., Nozawa Y., Mori Y., Murasawa S., Kizima K., Maruyama K., Horiuchi M., Dzau VJ., Takahashi H., Iwasaka T., Inada M. et Matsubara H. (1998). Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J. Clin. Invest.* **101**: 527-35.
- Massfelder T., Dann P., Wu TL., Vasavada R., Helwig JJ. et Stewart AF. (1997). Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 13630-5.
- Matsubara H. (1998). Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ. Res.* **83**: 1182-91.
- Matsumoto T., Sagawa N., Mukoyama M., Tanaka I., Itoh H., Goto M., Horiuchi M., Dzau VJ., Mori T. et Nakao K. (1996). Type 2 angiotensin II receptor is expressed in human myometrium and uterine leiomyoma and is down-regulated during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 4366-72.
- McClellan G., Weisberg A., Rose D. et Winegrad S. (1994). Endothelial cell storage and release of endothelin as a cardioregulatory mechanism. *Circ. Res.* **75**: 85-96.
- Mebazaa A., Martin LD., Robotham JL., Maeda K., Gabrielson EW. et Wetzel RC. (1993). Right and left ventricular cultured endocardial endothelium produces prostacyclin and PGE<sub>2</sub>. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**: 245-8.
- Mebazaa A., Mayoux E., Maeda K., Martin LD., Lakatta EG., Robotham JL. et Shah AM. (1993a). Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. *Am. J. Physiol.* **265**: H1841-6.
- Meulemans AL., Andries LJ. et Brutsaert DL. (1990). Does endocardial endothelium mediate positive inotropic response to angiotensin I and angiotensin II? *Circ. Res.* **66**: 1591-601.



- Meulemans AL., Andries LJ. et Brutsaert DL. (1990). Endocardial endothelium mediates positive inotropic response to alpha 1-adrenoceptor agonist in mammalian heart. *J. Molec. Cell. Cardiol.* **22**: 667-85.
- Meyer J., Mischeck U., Veyhl M., Henzel K. et Galla HJ. (1990). Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* **514**: 305-9.
- Merjan AJ., Kanashiro CA., Krieger JE., Han SW. et Paiva AC. (2001). Ligand-induced endocytosis and nuclear localization of angiotensin II receptors expressed in CHO cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**: 1175-83.
- Mezzano SA., Ruiz-Ortega M. et Egido J (2001). Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension.* **38**: 635-638.
- Michel JB., Feron O., Sase K., Prabhakar P. et Michel T. (1997). Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **272**: 25907-12.
- Michel T. et Feron O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* **100**: 2146-52.
- Millan MA., Jacobowitz DM., Aguilera G. et Catt KJ. (1991). Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 11440-4.
- Mintz IM., Sabatini BL. et Regehr WG. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron.* **15**: 675-88.
- Mitra R. et Morad M. (1986). Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 5340-4.
- Mohan P., Brutsaert DL., Paulus WJ. et Sys SU. (1996). Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation.* **93**: 1223-9.
- Mohan P., Sys SU. et Brutsaert DL. (ed) (1995). Mechanisms of endocardial endothelium modulation of myocardial performance. In: *Molecular and subcellularcardiology: Effects of structure and function*. Plenum Press, New York, pp: 249-60.
- Molenaar P., O'Reilly G., Sharkey A., Kuc RE., Harding DP., Plumpton C., Gresham GA. et Davenport AP. (1993). Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ. Res.* **72**: 526-38.

Molloy CJ., Taylor DS. et Weber H. (1993). Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 7338-45.

Moncada S., Palmer RM. et Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-42.

Monton M., Lopez-Farre A., Mosquera JR., Sanchez de Miguel L., Garcia-Duran M., Sierra MP., Bellver T., Rico L. et Casado S. (1997). Endogenous angiotensin II produced by endothelium regulates interleukin-1beta-stimulated nitric oxide generation in rat isolated vessels. *Hypertension.* **30**: 1191-7.

Moody CJ., Dashwood MR., Sykes RM., Chester M., Jones SM., Yacoub MH. et Harding SE. (1990). Functional and autoradiographic evidence for endothelin 1 receptors on human and rat cardiac myocytes. Comparison with single smooth muscle cells. *Circ. Res.* **67**: 764-9.

Morgan HE. et Baker KM. (1991). Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation.* **83**: 13-25.

Mukoyama M., Nakajima M., Horiuchi M., Sasamura H., Pratt RE. et Dzau VJ. (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* **268**: 24539-42.

Nahmias C. et Strosberg AD. (1995). The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**: 223-229.

Navar LG., Inscho EW., Majid SA., Imig JD., Harrison-Bernard LM. et Mitchell KD. (1996). Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol. Rev.* **76**: 425-536.

Ng KK. et Vane JR. (1967). Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature.* **216**: 762-6.

Niggli E. et Lederer W.J. (1991). Real-time confocal microscopy and calcium measurements in heart muscle cells: towards the development of a fluorescence microscope with high temporal and spatial resolution. *Cell Calcium.* **11**: 121-30.

Niggli E., Piston D.W., Kirby M.S, Cheng H., Sandison D.R., Webb W.W. et Lederer W.J. (1994). A confocal laser scanning microscope designed for indicators with ultraviolet excitation wavelengths. *Am. J. Physiol.* **266**: 303-10.

Niluis B. et Cateels R. (1994). Biology of the vascular wall and its interaction with migratory and blood cells. In: *Comprehensive Human Physiology*, edited by Greger, R. and Windhorst, U. Berlin: Springer-Verlag, p. 1981-1994.

- Nilius B. et Droogmans G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* **81**: 1415-59.
- Nilius B. et Riemann D. (1990). Ion channels in human endothelial cells. *Gen. Physiol. Biophys.* **9**: 89-111.
- Nilius B., Viana F. et Droogmans G. (1997). Ion channels in vascular endothelium. *Ann. Rev. Physiol.* **59**: 145-70.
- Nilsson H., Jensen P.E. et Mulvany M.J. (1994). Minor role for direct adrenoreceptor-mediated calcium entry in rat mesenteric small arteries. *J. Vasc. Res.* **31**: 314-21.
- Nio Y., Matsubara H., Murasawa S., Kanasaki M. et Inada M. (1995). Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* **95**: 46-54.
- Nosaka S., Hashimoto M., Sasaki T., Ku K., Saitoh Y., Yamauchi M., Tanabe Y., Nakaki T., Hishikawa K., Masumura S., Nakayama K. et Tamura K. (1997). The effects of transmural pressure on prostacyclin release from porcine endocardial endothelial cells--comparison with vascular endothelial cells. *Pflugers Archiv.* **433**: 848-50.
- Nishizuka Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* **308**: 693-8.
- Nowycky MC., Fox AP. et Tsien RW. (1985). Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist Bay K 8644. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 2178-82.
- Nosaka S., Hashimoto M., Sasaki T., Ku K., Saitoh Y., Hanada T., Yamauchi M., Masumura S., Nakayama K. et Tamura K. (1997). Antithrombotic effects of endocardial endothelial cells-comparison with coronary artery endothelial cells. *Prostaglandins.* **53**: 305-19.
- Ohkubo H., Nakayama K., Tanaka T. et Nakanishi S. (1986). Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J. Biol. Chem.* **261**: 319-23.
- Ohkubo N., Matsubara H., Nozawa Y., Mori Y., Murasawa S., Kijima K., Maruyama K., Masaki H., Tsutumi Y., Shibasaki Y., Iwasaka T. et Inada M. (1997). Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation.* **96**: 3954-62.
- Page C., Rose M., Yacoub M. et Pigott R. (1992). Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* **141**: 673-83.

- Pak Y., O'Dowd BF., Wang JB. et George SR. (1999). Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **274**: 27610-6.
- Palmer RM., Ashton DS. et Moncada S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* **333**: 664-6.
- Pappenheimer JR., Renkin JR. et Borrero LM. (1951). Filtration, diffusion, and molecular sieving through peripheral capillary membranes : A contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am. J. Physiol.* **167**: 13-46.
- Parton RG. (1996). Caveolae and caveolins. *Curr. Op. Cell Biol.* **8**: 542-8.
- Patel V., Brown C., Goodwin A., Wilkie N. et Boarder MR. (1996). Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production. *Biochem. J.* **320**: 221-6.
- Paul M. et Schunkert H. (1992). Detection of angiotensin converting enzyme mRNA in the rat heart by use of the polymerase chain reaction (PCR). *Agents Actions Suppl.* **38**: 384-91.
- Paul M., Bachmann J. et Ganten D. (1992). The tissue renin-angiotensin systems in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **2**: 94-99.
- Paul M., Wagner D., Metzger R., Ganten D., Lang RE., Suzuki F., Murakami K., Burbach JH. et Ludwig G. (1998). Quantification of renin mRNA in various mouse tissues by a novel solution hybridization assay. *J. Hypertension.* **6**: 247-52.
- Paulus WJ., Vantrimpont PJ. et Shah AM. (1994). Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation.* **89**: 2070-8.
- Payraastre B., Nievers M., Boonstra J., Breton M., Verkleij AJ. et Van Bergen en Henegouwen PM. (1992). A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **267**: 5078-84.
- Peach MJ. (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* **57**: 313-70.
- Peach MJ. et Dostal DE. (1990). The angiotensin II receptor and the actions of angiotensin II. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16**: S25-30.
- Pederson T. et Politz JC. (2000). The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *J. Cell Biol.* **148**: 1091-5.

- Pfeffer MA., Braunwald E., Moye LA., Basta L., Brown EJ Jr., Cuddy TE., Davis BR., Geltman EM., Goldman S. et Flaker GC. (1992). Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *New Engl. J. Med.* **327**: 669-77.
- Pitt B. et Konstam MA. (1998). Overview of angiotensin II-receptor antagonists. *Am. J. Cardiol.* **82**: S47-49.
- Prabhakar P., Thatte HS., Goetz RM., Cho MR., Golan DE. et Michel T. (1998). Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **273**: 27383-8.
- Prendergast BD., Anning PB., Lewis MJ. et Shah AM. (1997). Regulation of left ventricular relaxation in the isolated guinea-pig heart by endogenous endothelin. *Cardiovasc. Res.* **33**: 131-8.
- Pueyo ME., N'Diaye N. et Michel JB. (1996). Angiotensin II-elicited signal transduction via AT1 receptors in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 79-84.
- Qian J., Colmers WF. et Saggau P. (1997). Inhibition of synaptic transmission by neuropeptide Y in rat hippocampal area CA1: modulation of presynaptic Ca<sup>2+</sup> entry. *J. Neurosci.* **17**: 8169-77.
- Rasmussen H. et Barret PQ. (1984). Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol. Rev.* **64**: 938-984.
- Regan LJ., Sah DW. et Bean BP. (1991). Ca<sup>2+</sup> channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron.* **6**: 269-80.
- Regehr WG. et Mintz IM. (1994). Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses. *Neuron.* **12**: 605-13.
- Rhodin J. (1974). Histology. A text and Atlas. New York: Oxford University Press. p. 803.
- Robertson AL Jr. et Khairallah PA. (1971). Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. *Science.* **172**: 1138-9.
- Rockel TD. et von Mikecz A. (2002). Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J. Struct. Biol.* **140**: 189-199.
- Romero JC. et Reckelhoff JF. (1999). State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension.* **34**: 943-9.

- Rosenthal JH., Pfeifle B., Michailov ML., Pschorr J., Jacob IC. et Dahlheim H. (1984). Investigations of components of the renin-angiotensin system in rat vascular tissue. *Hypertension*. **6**: 383-90.
- Rotrosen D. et Gallin JJ. (1986). Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J. Cell Biol.* **103**: 2379-87.
- Rubanyi GM. et Polokoff MA. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46**: 325-415.
- Ruzicka M., Skarda V. et Leenen FH. (1995). Effects of ACE inhibitors on circulating versus cardiac angiotensin II in volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circulation*. **92**: 3568-73.
- Ryan JW., Ryan US., Schultz DR., Whitaker C. et Chung A. (1975). Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (kininase II). *Biochem. J.* **146**: 497-9.
- Sader S. (2002). Évolution de l'expression du NPY et de ses récepteurs dans l'endothélium endocardique au cours du développement fœtal chez l'humain; rôle du NPY dans l'homéostasie calcique intracellulaire. *Université de Sherbrooke*.
- Sadoshima J. et Izumo S. (1995). Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **77**: 1040-52.
- Sadoshima J. et Izumo S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Ann. Rev. Physiol.* **59**: 551-71.
- Sadoshima J., Qiu Z., Morgan JP. et Izumo S. (1995). Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. *Circ. Res.* **76**: 1-15.
- Samyn ME., Petershack JA., Bedell KA., Mathews MS. et Segar JL. (1998). Ontogeny and regulation of cardiac angiotensin types 1 and 2 receptors during fetal life in sheep. *Pediatr. Res.* **44**: 323-9.
- Sayeski PP., Ali MS., Harp JB., Marrero MB. et Bernstein KE. (1998). Phosphorylation of p130Cas by angiotensin II is dependent on c-Src, intracellular Ca<sup>2+</sup>, and protein kinase C. *Circ. Res.* **82**: 1279-88.
- Schelling JR., Hanson AS., Marzec R. et Linas SL. (1992). Cytoskeleton-dependent endocytosis is required for apical type 1 angiotensin II receptor-mediated phospholipase C activation in cultured rat proximal tubule cells. *J. Clin. Invest.* **90**: 2472-80.

- Schelling P., Fischer H. et Ganten D. (1991). Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J. Hypertension*. **9**: 3-15.
- Schmitz U., Ishida T., Ishida M., Surapisitchat J., Hasham MI., Pelech S. et Berk BC. (1998). Angiotensin II stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells: role in activation of JNK. *Circ. Res.* **82**: 1272-8.
- Schunkert H., Dzau VJ., Tang SS., Hirsch AT., Apstein CS. et Lorell BH. (1990). Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J. Clin. Invest.* **86**: 1913-20.
- Sealey JE., White RP., Laragh JH. et Rubin AL. (1977). Plasma prorenin and renin in anephric patients. *Circ. Res.* **41**: 17-21.
- Severs NJ. (2000). The cardiac muscle cell. *Bioessays*. **22**: 188-99.
- Shah AM., Andries LJ., Meulemans AL. et Brutsaert DL. (1989). Endocardium modulates myocardial inotropic response to 5-hydroxytryptamine. *Am. J. Physiol.* **257**: H1790-7.
- Shah AM., Grocott-Mason RM., Pepper CB., Mebazaa A., Henderson AH., Lewis MJ. et Paulus WJ. (1996). The cardiac endothelium: cardioactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **39**: 263-84.
- Shah AM., Lewis MJ. et Henderson AH. (1991). Effects of 8-bromo-cyclic GMP on contraction and on inotropic response of ferret cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **23**: 55-64.
- Shah AM., Meulemans AL. et Brutsaert DL. (1989a). Myocardial inotropic responses to aggregating platelets and modulation by the endocardium. *Circulation*. **79**: 1315-23.
- Shah AM., Spurgeon HA., Sollott SJ., Talo A. et Lakatta EG. (1994). 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to  $Ca^{2+}$  in intact cardiac myocytes. *Circ. Res.* **74**: 970-8.
- Shao Q., Seward L., Zahradka P. et Dhalla NS. (1998).  $Ca^{2+}$  mobilization in adult rat cardiomyocytes by angiotensin type 1 and 2 receptors. *Biochem. Pharmacol.* **55**: 1413-8.
- Shubeita HE., McDonough PM., Harris AN., Knowlton KU., Glembotski CC., Brown JH. et Chien KR. (1990). Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **265**: 20555-62.

- Smith JA., Shah AM. et Lewis MJ. (1991). Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J. Physiol.* **439**: 1-14.
- Spedding M. et Paoletti R. (1992). Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rev.* **44**: 363-76.
- Spencer AG., Woods JW., Arakawa T., Singer II. et Smith WL. (1998). Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.* **273**: 9886-93.
- Stoll M., Steckelings UM., Paul M., Bottari SP., Metzger R. et Unger T. (1995). The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **95**: 651-7.
- Streatfeild-James RM., Williamson D., Pike RN., Tewksbury D., Carrell RW. et Coughlin PB. (1998). Angiotensinogen cleavage by renin: importance of a structurally constrained N-terminus. *FEBS Letters.* **436**: 267-70.
- Takahashi E., Abe J. et Berk BC. (1997). Angiotensin II stimulates p90rsk in vascular smooth muscle cells. A potential Na(+)-H-exchanger kinase. *Circ. Res.* **81**: 268-73.
- Takahashi T. et Momiyama A. (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature.* **366**: 156-8.
- Takanashi M. et Endoh M. (1991). Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am. J. Physiol.* **261**: H611-9.
- Takano H., Komuro I., Zou Y., Kudoh S., Yamazaki T. et Yazaki Y. (1996). Activation of p70 S6 protein kinase is necessary for angiotensin II-induced hypertrophy in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Letters.* **379**: 255-9.
- Takeda K. et Klepper M. (1990). Voltage-dependent and agonist-activated ionic currents in vascular endothelial cells: a review. *Blood Vessels.* **27**: 169-183.
- Takeda K., Schini V. et Stoeckel H. (1987). Voltage-activated potassium, but not calcium currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch.* **410**: 385-393.
- Tang SS., Rogg H., Schumacher R. et Dzau VJ. (1992). Characterization of nuclear angiotensin-II-binding sites in rat liver and comparison with plasma membrane receptors. *Endocrinology.* **131**: 374-80.
- Taoudi-Benchekroun M., Gros-Louis N., Bkaily G. et D'Orléans-Juste P. (1995). R-type calcium channel involved in endothelin-1 induced contraction of newborn rabbit aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**: S300-2.



The SOLVD Investigators. (1992). Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *New. Engl. J. Med.* **327**: 685-691.

Timmermans PB., Benfield P., Chiu AT., Herblin WF., Wong PC. et Smith RD. (1992). Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am. J. Hypertension.* **5**: S221-235.

Timmermans PB., Wong PC., Chiu AT., Herblin WF., Benfield P., Carini DJ., Lee RJ., Wexler RR., Saye JA. et Smith RD. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* **45**: 205-51.

Trejo J. et Coughlin SR. (1999). The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J. Biol. Chem.* **274**: 2216-24.

Triggle DJ. (1999). The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur. J. Pharmacol.* **375**: 311-25.

Tsien RW., Lipscombe D., Madison DV., Bley KR. et Fox AP. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* **11**: 431-8.

Tsuzuki S., Ichiki T., Nakakubo H., Kitami Y., Guo DF., Shirai H. et Inagami T. (1994). Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 1449-54.

Turner JR (ed) (1994). Cardiovascular Reactivity and Stress: Patterns of Physiological Response. Plenum Press, New York, pp: 22.

Ullian ME. et Linas SL. (1989). Role of receptor cycling in the regulation of angiotensin II surface receptor number and angiotensin II uptake in rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **84**: 840-6.

Valiquette M., Bonin H., Hnatowich M., Caron MG., Lefkowitz RJ. et Bouvier M. (1990). Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human beta 2-adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 5089-93.

van Kats JP., de Lannoy LM., Jan Danser AH., van Meegen JR., Verdouw PD. et Schalekamp MA. (1997). Angiotensin II type 1 (AT1) receptor-mediated accumulation of angiotensin II in tissues and its intracellular half-life in vivo. *Hypertension.* **30**: 42-9.

van Kesteren CA., van Heugten HA., Lamers JM., Saxena PR., Schalekamp MA. et Danser AH. (1997). Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *J. Molec. Cell. Cardiol.* **29**: 2147-57.

- Ventura C., Maioli M., Pintus G., Posadino AM. et Tadolini B. (1998). Nuclear opioid receptors activate opioid peptide gene transcription in isolated myocardial nuclei. *J. Biol. Chem.* **273**: 13383-6.
- Ventura C., Zinellu E., Maninchedda E., Fadda M. et Maioli M. (2003). Protein kinase C signaling transduces endorphin-primed cardiogenesis in GTR1 embryonic stem cells. *Circ. Res.* **92**: 617-22.
- Vigne P., Breittmayer JP. et Frelin C. (1992). Thapsigargin, a new inotropic agent, antagonizes action of endothelin-1 in rat atrial cells. *Am. J. Physiol.* **263**: H1689-94.
- Vinson GP., Ho MM., Puddefoot JR., Teja R., Barker S., Kapas S. et Hinson JP. (1995). Internalisation of the type I angiotensin II receptor (AT1) and angiotensin II function in the rat adrenal zona glomerulosa cell. *Endocr. Res.* **21**:211-7.
- Viswanathan M. et Saavedra JM. (1992). Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides.* **13**: 783-6.
- Wang DH., Qiu J. et Hu Z. (1998). Differential regulation of angiotensin II receptor subtypes in the adrenal gland: role of aldosterone. *Hypertension.* **32**: 65-70.
- Wang J. et Morgan JP. (1992). Endocardial endothelium modulates myofilament Ca<sup>2+</sup> responsiveness in aequorin-loaded ferret myocardium. *Circ. Res.* **70**: 754-60.
- Wang JM., Llona I. et De Potter WP. (1994). Receptor-mediated internalization of angiotensin II in bovine adrenal medullary chromaffin cells in primary culture. *Regul. Pept.* **53**: 77-86.
- Wang JX., Paik G. et Morgan JP. (1991). Endothelin 1 enhances myofilament Ca<sup>2+</sup> responsiveness in aequorin-loaded ferret myocardium. *Circ. Res.* **69**: 582-9.
- Ward BJ., Bauman KF. et Firth JA. (1988). Interendothelial junctions of cardiac capillaries in rats: their structure and permeability properties. *Cell Tissue Res.* **252**: 57-66.
- Watanabe K., Yoshida M. et Jaffe EA. (1990). Influence of lipopolysaccharide on angiotensin converting enzyme activity expressed by human umbilical vein endothelial cells in culture. *Jap. J. Thoracic Dis.* **28**: 1214-9.
- Wheeler DB., Sather WA., Randall A. et Tsien RW. (1994). Distinctive properties of a neuronal calcium channel and its contribution to excitatory synaptic transmission in the central nervous system. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **29**: 155-71.
- White GE., Gimbrone MA Jr. et Fujiwara K. (1983). Factors influencing the expression of stress fibers in vascular endothelial cells in situ. *J. Cell Biol.* **97**: 416-24.

- Whitebread S., Mele M., Kamber B. et de Gasparo M. (1989). Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**: 284-91.
- Wickman K. et Clapham DE. (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiol. Rev.* **75**: 865-85.
- Williams ME., Brust PF., Feldman DH., Patthi S., Simerson S., Maroufi A., McCue AF., Velicelebi G., Ellis SB. et Harpold MM. (1992). Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science.* **257**: 389-95.
- Woditsch I. et Schror K. (1992). Prostacyclin rather than endogenous nitric oxide is a tissue protective factor in myocardial ischemia. *Am. J. Physiol.* **263**: H1390-6.
- Wu LG. et Saggau P. (1994). Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *J. Neurosci.* **14**: 5613-22.
- Wysolmerski RB. et Lagunoff D. (1988). Inhibition of endothelial cell retraction by ATP depletion. *Am. J. Pathol.* **132**: 28-37.
- Xiao F., Puddefoot JR. et Vinson GP. (2000). The expression of renin and the formation of angiotensin II in bovine aortic endothelial cells. *J. Endocrinol.* **164**: 207-14.
- Xie X., Wu G., Lu ZH. et Ledeen RW. (2002). Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *J. Neurochem.* **81**: 1185-95.
- Yamada T., Horiuchi M. et Dzau VJ. (1996). Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 156-60.
- Yamauchi A. (1980). Fine structure of the fish heart. In: Hearts and heart-like organs. New York: Academic, voll, p: 119-143.
- Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K. et Masaki T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* **332**: 411-5.
- Yokota R. (1984). Occurrence of long non-myelinated axonal segments intercalated in myelinated, presumably sensory axons: electron microscopic observations in the dog atrial endocardium. *J. Neurocytol.* **13**:127-43.
- York JD., Odom AR., Murphy R., Ives EB. et Wente SR. (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science.* **285**: 96-100.

Zhang J., Ferguson SSG., Barak LS., Menard L. et Caron MG. (1996). Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **271**: 18302-5.

Zhang J. et Pratt RE. (1996). The AT2 receptor selectively associates with Gialpha2 and Gialpha3 in the rat fetus. *J. Biol. Chem.* **271**: 15026-33.

Zhu M., Gelband CH., Moore JM., Posner P. et Sumners C. (1998). Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid. *J. Neurosci.* **18**: 679-86.