

**UNIVERSITE DE LIMOGES**  
**ECOLE DOCTORALE Science – Technologie - Santé**  
**FACULTE de MEDECINE**

**Année : 2005**

**Thèse N° .....**

**Thèse**  
**pour obtenir le grade de**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**  
**Discipline : Biologie Sciences Santé**

**présentée et soutenue par**  
**Sébastien FAURE**

**le 12 octobre 2005**

**ANGIOTENSINE-IV ET CEREBROPROTECTION**

**Thèse dirigée par : Prof Jean Michel ACHARD et Prof Nicole OUDART**

**JURY**

Monsieur le Professeur Raymond ARDAILLOU	Examineur
Monsieur Daniel HENRION, Directeur de Recherche INSERM	Rapporteur
Monsieur Jean-Baptiste MICHEL, Directeur de Recherche INSERM	Rapporteur
Monsieur le Professeur Albert FOURNIER	Examineur
Monsieur le Professeur Jean-Michel ACHARD	Directeur
Madame le Professeur Nicole OUDART	Directeur

## Remerciements

A notre Président de Jury,

Monsieur le Professeur Raymond Ardaillou,

Professeur Emérite de Physiologie,

Secrétaire adjoint de l'Académie Nationale de Médecine,

Vous nous faites le grand honneur de présider notre jury  
de thèse,

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre gratitude et  
notre profond respect.

A nos juges,

Monsieur Jean-Baptiste Michel,

Directeur de recherche INSERM au CHU Bichat, Paris,

Directeur de l'Unité INSERM U698,

A Monsieur Daniel Henrion,

Directeur de recherche INSERM au CNRS à l'Université  
d'Angers,

Directeur de l'Unité CNRS – UMR 6188,

A Monsieur le Professeur Albert Fournier,

Chef du service de Médecine interne - Néphrologie -  
Réanimation au CHU d'Amiens,

Nous vous sommes extrêmement reconnaissants de votre  
intérêt pour ce travail et d'avoir accepté de participer au  
jury de cette thèse.

Soyez assurés de notre immense gratitude.

A nos juges, Directeurs de thèse,

Monsieur le Professeur Jean-Michel Achard,

Professeur de Physiologie à la Faculté de Médecine de  
Limoges,

Madame le Professeur Nicole Oudart,

Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Pharmacie de  
Limoges,

Membre de l'Académie Nationale de Pharmacie,

Depuis le premier jour de cette thèse, vous avez fait  
preuve d'une implication sans faille, d'une disponibilité  
permanente, et d'une grande gentillesse.

Nous avons apprécié votre rigueur scientifique, vos  
précieux conseils et vos encouragements dans la  
réalisation de ce travail.

Soyez assurés de notre immense reconnaissance et notre  
profond respect.

A Monsieur James Javellaud,

Ingénieur à la Faculté de Pharmacie de Limoges,

Merci pour ton aide quotidienne, ton soutien et tes si  
précieux conseils.

A Dominique, Valérie, Claire, David, Bertrand, Jean-  
Marc, Serge, François, Florence, Sylvie, Marie-Jeanne,  
Francis, Brigitte, Joëlle, Gaëlle, Monsieur le Professeur  
René Chapot, Monsieur le Professeur Philippe Cardot,  
Monsieur le Professeur Louis Gastinel, Monsieur Patrick  
Cardi, Monsieur le Doyen Gérard Habrioux,

Merci de votre précieuse collaboration tout au long de ces  
années de recherche.

A toute ma famille, mes parents, ma sœur, mes grands-parents, Aurore, ...

A tous ceux qui me sont chers aussi, Nico, Stéphan, Sandra, Vince, Nath, Bean, Cathy, Marie-Pierre, Clairette, Fanny, Nath B, Pierrick, Doudou, Nono, Xav, Pierre, Julien, Tonio, JB, Julie, ...

Et tout ceux que j'oublie ici mais à qui je pense...

# Plan

## Abréviations

### 1. LE SYSTÈME RÉNINE - ANGIOTENSINE

#### 1.1. INTRODUCTION

#### 1.2. LE SYSTEME RENINE – ANGIOTENSINE : UN SYSTEME COMPLEXE

##### 1.2.1. Métabolisme des angiotensines, peptides hormonaux

###### 1.2.1.1. L'angiotensinogène

###### 1.2.1.2. Les angiotensines II et III

###### 1.2.1.3. L'angiotensine-(1-7)

###### 1.2.1.4. L'angiotensine IV

###### 1.2.1.5. Localisation des composants du système rénine -angiotensine dans le cerveau

##### 1.2.2. Les récepteurs du système rénine - angiotensines

###### 1.2.2.1. Récepteurs de la (pro) rénine

###### 1.2.2.2. Récepteurs des angiotensines II et III

###### 1.2.2.3. Récepteur de l'angiotensine-(1-7)

###### 1.2.2.4. Récepteur de l'angiotensine IV

###### 1.2.2.5. Les récepteurs aux angiotensines dans le cerveau

##### 1.2.3. Le système rénine - angiotensines : un système pléiotrope

#### 1.3. DONNÉES EXPÉRIMENTALES POUR UN EFFET PROTECTEUR DES ANGIOTENSINES DURANT L'ISCHÉMIE AIGUË

##### 1.3.1. Effet protecteur de l'angiotensine II dans l'ischémie aiguë du train arrière

##### 1.3.2. Effet protecteur de l'angiotensine II au cours de l'ischémie cérébrale aiguë chez la gerbille

##### 1.3.3. Effet protecteur de l'angiotensine II au cours de l'ischémie cérébrale aiguë chez d'autres espèces mammifères (souris, rat et lapin)

#### 1.4. PERTINENCE CLINIQUE D'UN EFFET PROTECTEUR CÉRÉBRAL DÉPENDANT DE RÉCEPTEURS NON-AT<sub>1</sub> : LES LEÇONS DES GRANDS ESSAIS CLINIQUES

##### 1.4.1. L'essai MRC

##### 1.4.2. L'étude CAPPP : « des résultats controversés »

##### 1.4.3. PROGRESS et PATS : les arguments contre les inhibiteurs de l'ECA

1.4.4. ALLHAT : les diurétiques revisités

1.4.5. HOPE et PROGRESS : le « Bon et le Mauvais »

1.4.6. Le plateau de la mortalité par accident vasculaire cérébral

1.4.7. Sartans et protection cérébrale : les promesses de LIFE, MOSES et ACCESS

1.5. CONCLUSION

## **2. ETUDES RÉALISÉES**

2.1. INTRODUCTION

2.2. **PREMIÈRE PARTIE** : MISE EN ÉVIDENCE DES EFFETS CEREBROPROTECTEURS DE L'ANGIOTENSINE IV

2.2.1. **Première étude** : Effet protecteur de l'angiotensine IV dans l'accident vasculaire cérébral ischémique expérimental médié par les récepteurs AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub>

2.2.2. **Deuxième étude** : Effets protecteurs synergiques de l'érythropoïétine et de l'olmesartan sur la survie et les altérations de la mémoire suite à un accident vasculaire cérébral chez la gerbille

2.3. **DEUXIÈME PARTIE** : ETUDE DES MECANISMES DE PROTECTION DE L'ANGIOTENSINE IV

2.3.1. **Troisième étude** : Effet vasoconstricteur de l'angiotensine IV sur l'artère basilaire de rat indépendant des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>

2.3.2. **Quatrième étude** : L'angiotensine IV inhibe le catabolisme de l'endothéline-1 médié par l'Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP) induit par l'endothéline-1 sur l'artère basilaire de rat

2.3.2.1. Introduction

2.3.2.2. Matériel et méthodes

2.3.2.3. Résultats

2.3.2.4. Discussion

## **3. DISCUSSION**

## **Bibliographie**



## Abréviations

AA II	Antagoniste des récepteurs AT <sub>1</sub> de l'angiotensine II
ACTH	Hormone corticotrophine
Ang-II, Ang-IV	Angiotensine II, Angiotensine IV
ACCESS	Acute candesartan cilexetil therapy in stroke
ALLHAT	Antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial
Amp	Aminopeptidase
AT <sub>1</sub> , AT <sub>2</sub> , AT <sub>4</sub>	Récepteurs à l'angiotensine de type 1, 2, 4
AVC	Accident vasculaire cérébral
BHE	Barrière hématoencéphalique
CAPP	Captopril prevention project
Cbp	Carboxypeptidase
Cyt	Cytoplasme
DOCA	Désoxycorticostérone
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EPN	Endopeptidase neuter
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular regulated kinase
ET-1	Endothéline-1

ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Récepteurs à l'endothéline de type A, B
HOPE	Heart outcomes prevention evaluation
HTA	Hypertension artérielle
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IRAP	Insulin regulated aminopeptidase
LIFE	Losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine methyl ester
MAP	Mitogen activated protein
Mb	Membrane
MRC	Medical research council
Nleu <sup>1</sup> , Leual <sup>3</sup> -angiotensine IV	Norleucine <sup>1</sup> , Leucinal <sup>3</sup> -(reduced peptide bond)-angiotensine IV
NO	Monoxyde d'azote
Olm	Olmesartan
PA	Pression artérielle
PATS	Post-stroke antihypertensive treatment study
PBS	Phosphat-buffered saline
PEP	Prolylendopeptidase
P-LAP	Placental leucine amino-peptidase
PROGRESS	Perindopril protection against recurrent stroke study

Ram	Ramipril
RR	Risque relatif
SHR	Rat spontanément hypertendu
SRA	Système rénine – angiotensine
TBS	Tris buffer saline
VALIANT	Valsartan in acute myocardial infarction trial

# **1. LE SYSTÈME RÉNINE - ANGIOTENSINE**

## 1.1. INTRODUCTION

Durant les vingt dernières années, le système rénine-angiotensine (SRA) a fait l'objet de nombreuses études tant cliniques que fondamentales dans le domaine cardiovasculaire. Impliqué dans de nombreuses régulations, il joue un rôle majeur dans celle du tonus vasculaire. Le SRA apparaît comme un système circulant avec trois composants : la rénine sécrétée par le rein, l'angiotensinogène par le foie et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) par le poumon, permettant la synthèse d'angiotensine II, élément actif du système dont les effets sont médiés principalement par les récepteurs AT<sub>1</sub>. La découverte d'un SRA tissulaire ainsi que la compréhension de son rôle central dans la physiopathologie de l'athérogenèse et des remodelages vasculaires ont constitué une avancée considérable (Dzau VJ et coll., 2002). Plus récemment, des recherches fondamentales ont mis en évidence qu'une partie ou la totalité des éléments du SRA peuvent être présents dans de nombreux tissus. L'enzyme de conversion est retrouvée à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux et la rénine peut être séquestrée dans la paroi vasculaire. Plusieurs tissus expriment les ARN messagers de la rénine, de l'angiotensinogène et de l'enzyme de conversion : le cerveau, les vaisseaux, les reins, le cœur. Ces constatations sont en faveur de SRA complets dans un même organe. Ainsi, il a été mis en évidence l'existence d'un SRA spécifique cérébral (Culman J et coll., 2001) qui ressemble au SRA périphérique. Il participe à la régulation centrale de la pression artérielle. Il complète l'action périphérique vasoconstrictrice du SRA circulant. Comme le SRA périphérique, il est impliqué dans la physiopathologie de maladies cardiovasculaires (HTA, athérosclérose) et de leurs complications cérébrales.

L'activation chronique du SRA est à l'origine de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Des essais cliniques pertinents ayant démontré que le blocage du SRA diminue la morbidité et la mortalité de l'hypertension artérielle (HTA), de l'infarctus du myocarde, de l'insuffisance cardiaque, des complications de l'athérosclérose (coronaropathies, néphropathies) ainsi que celles du diabète, pathologies souvent intriquées, il a été admis que la meilleure stratégie pour la prévention des maladies cardiovasculaires était l'inhibition du SRA (Zaman MA et coll., 2002). L'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) ou d'antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II (AA II) semble

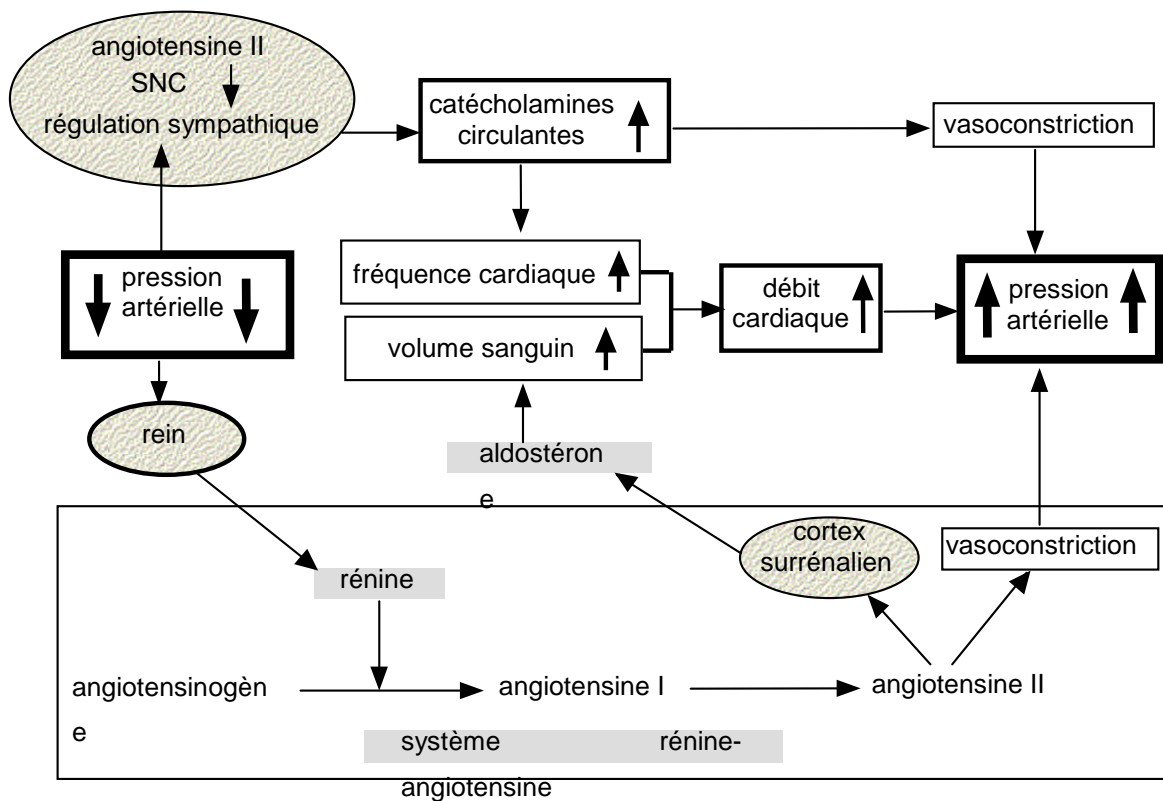
appropriée pour traiter les pathologies cardiovasculaires impliquant le SRA et prévenir les complications attendues.

Ce système intervient aussi sur des fonctions cérébrales comme la mémoire ou l'apprentissage, ce qui permet d'envisager de nouveaux traitements pour prévenir les méfaits dus à l'âge comme les troubles cognitifs.

## 1.2. LE SYSTEME RENINE – ANGIOTENSINE : UN SYSTEME COMPLEXE

La rénine a été découverte par Tigerstedt et Bergman en 1898 comme une substance pressive dans le cortex rénal (Tigerstedt R et Bergman PG, 1898). En 1934, Goldblatt et coll. ont montré que la diminution du flux sanguin dans les artères rénales provoque une augmentation prolongée de la pression artérielle (Goldblatt H et coll., 1934). Il est maintenant démontré que cette hypertension ischémie-dépendante est due à la synthèse d'un agent presseur, l'angiotensine II, à partir d'une chaîne de réactions enzymatiques complexes impliquant la rénine (Fasciolo JC, 1990).

L'angiotensine II apparaît comme l'effecteur peptidique central du SRA, dont le rôle physiologique dans les régulations de l'homéostasie hydrosodée, la fonction rénale et la pression artérielle est bien démontré. En réponse à une chute de pression sanguine, la génération par réaction enzymatique dans la circulation d'angiotensine II, peptide vasoconstricteur, entraîne une augmentation des résistances périphériques ainsi qu'une augmentation de la réabsorption du sodium directement et par l'intermédiaire de l'aldostérone dont elle stimule la sécrétion par le cortex surrénalien, ce qui a pour effet de restaurer la pression artérielle. L'angiotensine II provoque aussi une vasoconstriction par stimulation centrale du système sympathique et libération de noradrénaline, ce qui renforce encore l'effet immédiat sur les artérioles (*Figure 1*).



**Figure 1 : Mise en jeu de l'angiotensine II lors d'une chute de la pression artérielle**

Il a été montré que l'angiotensine II, en plus de réguler la pression artérielle, a des fonctions autocrine et paracrine dans de nombreux organes et tissus où elle est localement générée (cœur, rein, cerveau) (Dzau VJ, 1984). L'angiotensine II stimule l'expression de molécules d'adhésion aux leucocytes, de cytokines inflammatoires et augmente le stress oxydant, lui-même responsable du déséquilibre de la balance endothéliale entre le monoxyde d'azote (NO) et les radicaux libres. Inversement, les cellules inflammatoires génèrent des enzymes telles que l'ECA, favorisant une augmentation de la production locale d'angiotensine II dans la paroi vasculaire, instituant un véritable cercle vicieux. L'angiotensine II agit aussi comme un facteur de croissance pour les cellules musculaires lisses vasculaires et elle induit la néoangiogenèse. La perfusion d'angiotensine II à des souris Apo E - / - entraîne une augmentation de l'athérosclérose (Babamusta F et coll., 2005), (Iwai M et coll., 2005). Chez ces mêmes souris, l'induction d'une HTA rénovasculaire (2 kidneys – 1 clip) entraîne une hyperréactivité à la norépinéphrine et diminue la relaxation endothélium dépendante (Arruda

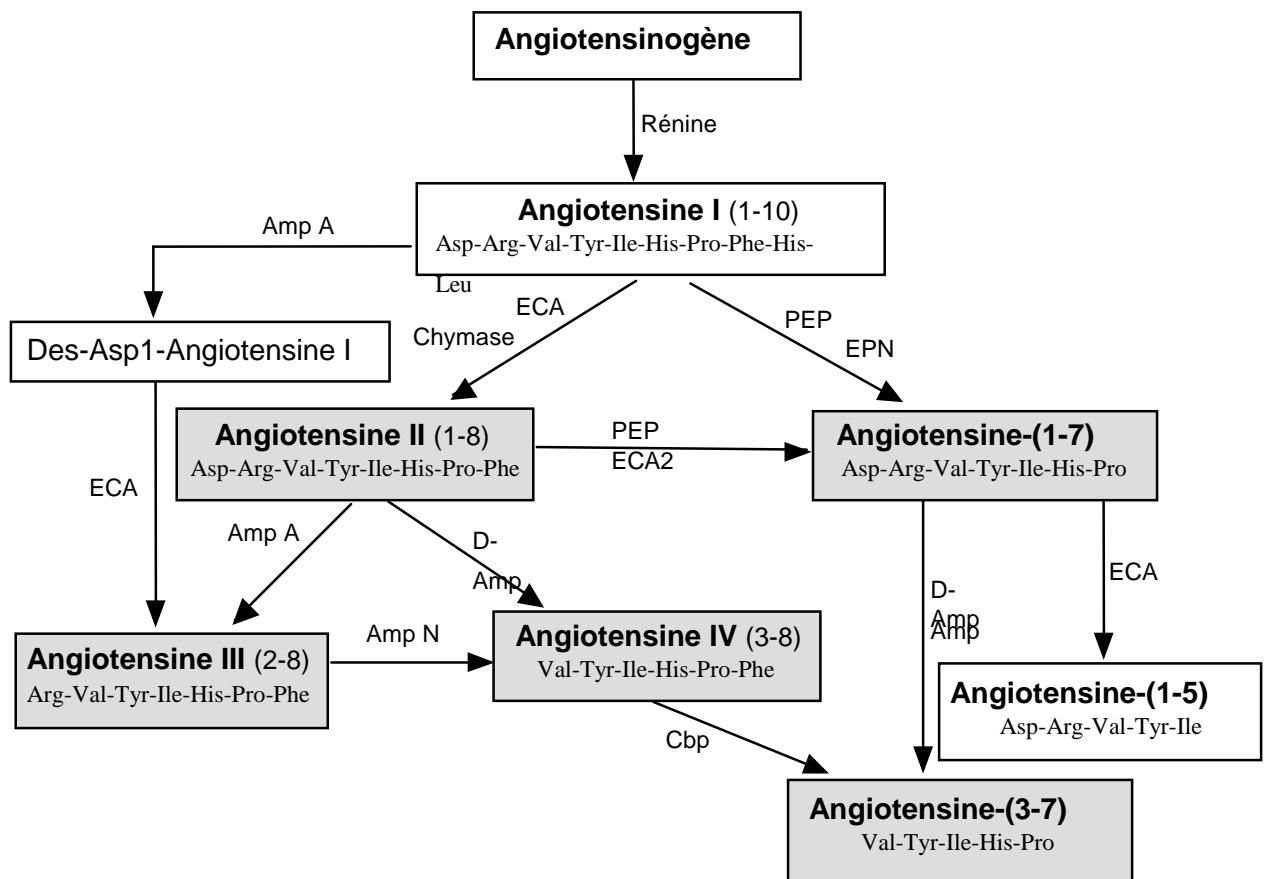


RM et coll., 2005). L'ensemble de ces propriétés va finalement contribuer à la formation, au développement et à la rupture des plaques d'athérome. L'angiotensine II est donc un médiateur essentiel dans les mécanismes physiopathologiques qui débutent avec un dysfonctionnement endothélial et peuvent éventuellement aller jusqu'à la rupture d'une plaque et la thrombose (Dzau VJ, 2001), (Dzau VJ et coll., 2002). Il apparaît donc que la thérapeutique idéale revient à réduire la synthèse de l'angiotensine II ou à bloquer les voies de signalisation mises en jeu par la stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub>. Ainsi il est possible de s'opposer aux mécanismes inflammatoires des complications de l'athérosclérose ainsi qu'au remodelage vasculaire permettant d'obtenir un effet protecteur supplémentaire au delà de la baisse de la pression artérielle.

## 1.2.1. Métabolisme des angiotensines, peptides hormonaux

### 1.2.1.1. L'angiotensinogène

L'angiotensinogène, une glycoprotéine, est le seul précurseur protéique de la famille de ces peptides : angiotensines I, II, III, IV et angiotensine-(1-7). L'angiotensinogène circulant provient essentiellement des hépatocytes, mais cette prohormone est aussi synthétisée dans le cerveau, le cœur, les vaisseaux, les reins et les adipocytes. Dans la circulation, la voie enzymatique principale utilise la rénine qui le transforme en un décapeptide, l'angiotensine I (*Figure 2*). La sécrétion de rénine qui est la première étape de régulation du SRA est un processus endocrine (Ardaillou R et Michel JB, 1999).



**Figure 2 : Schéma simplifié du métabolisme des angiotensines**

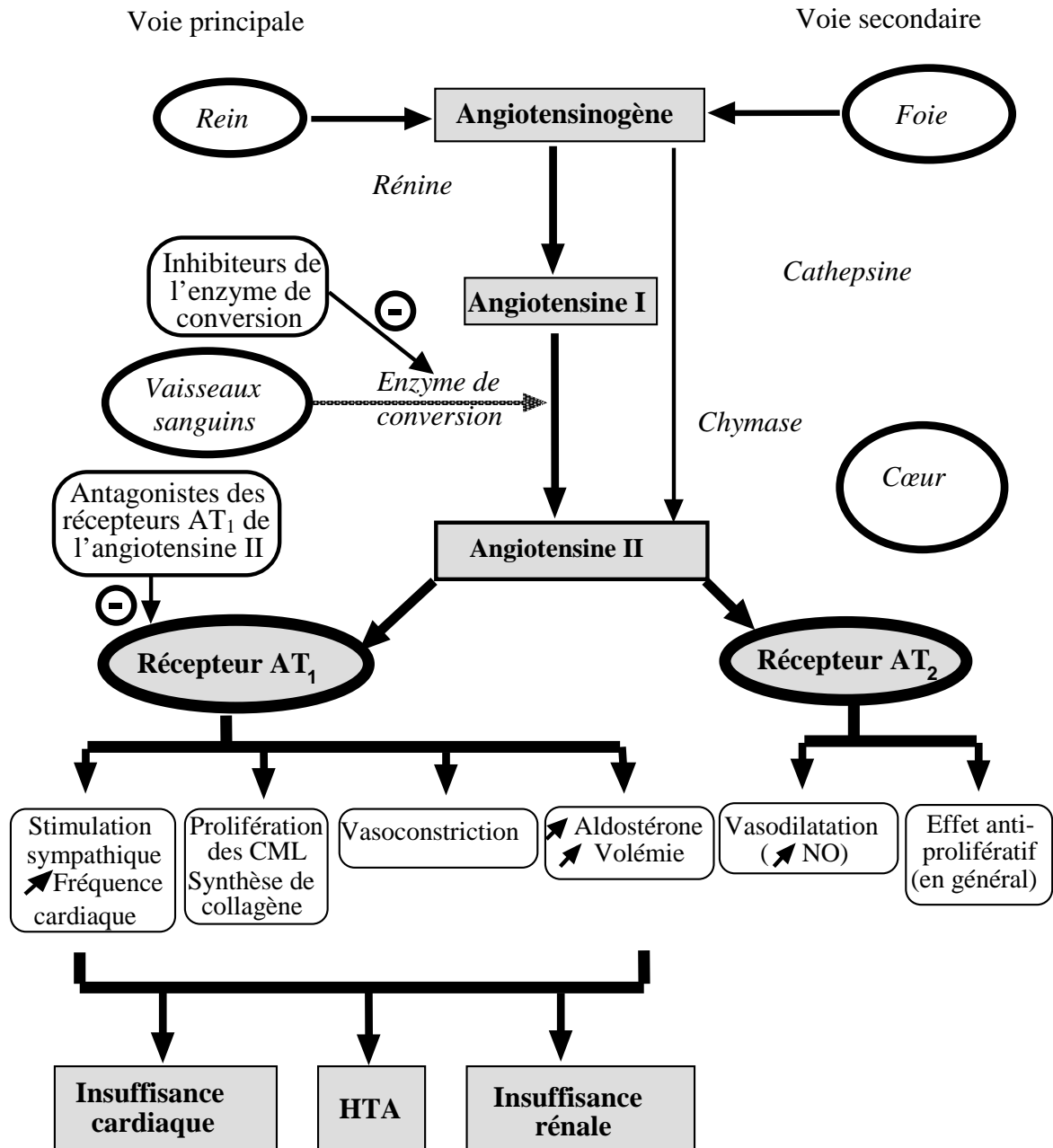
(d'après Santos RA et coll., 2000)

ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine ; Amp, aminopeptidases ; Amp A, aminopeptidase A ; Amp N, aminopeptidase neutre ; D-Amp, dipeptidylaminopeptidase I-III ; Cbp, carboxypeptidases ; EPN, endopeptidase neutre 24.11 (néprylisine) ; ECA2, prolylcarboxypeptidase, homologue de l'ECA ; PEP, prolylendopeptidase.

■ Peptides ayant une activité biologique.

### 1.2.1.2. Les angiotensines II et III

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est une métalloprotéine à zinc : la dipeptidylcarboxypeptidase, ubiquitaire, qui transforme l'angiotensine I (décapeptide inactif) en angiotensine II (décapeptide physiologiquement actif), puissant vasoconstricteur, mais à durée de vie brève ( $t_{1/2} = 90$  secondes). L'ECA n'est pas spécifique et clive un certain nombre d'autres peptides comme la bradykinine, agent vasodilatateur qu'elle inactive. L'ECA est bloquée par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC). L'aminopeptidase de type A produit l'angiotensine III à partir de l'angiotensine II en détachant l'acide aspartique et l'aminopeptidase de type N clive l'angiotensine III en angiotensine IV (Zini S et coll., 1996), (*Figure 2*). L'angiotensine III se fixe aux récepteurs de l'angiotensine II avec la même affinité que cette dernière et donne les mêmes effets. D'autres enzymes comme la cathepsine ou les chymases produites dans certains organes (foie, cœur), constituent des voies parallèles de synthèse de l'angiotensine II (*Figure 3*).



**Figure 3 : Voies de synthèse et effets physiopathologiques de l'angiotensine II dus à la stimulation de ses récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ; sites d'action des inhibiteurs de l'enzyme de conversion et des antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II**

### 1.2.1.3. L'angiotensine-(1-7)

L'angiotensine I peut aussi être transformée en angiotensine-(1-7) par des endopeptidases neutres. Selon le tissu ou l'organe, la synthèse de l'angiotensine-(1-7) est contrôlée par d'autres enzymes telles que la néprilysine (l'endopeptidase neutre 24-11) ainsi qu'un homologue de l'ECA découvert récemment, l'ECA2. C'est une métalloprotéase zinc-dépendante, qui régule négativement le SRA. L'ECA2 est exprimée dans l'endothélium vasculaire au niveau rénal et cardiaque. L'ECA2 dégrade l'angiotensine I en angiotensine-(1-9) le précurseur inactif de l'angiotensine-(1-7), mais aussi l'angiotensine II directement en angiotensine-(1-7) (Santos RA et coll., 2000). La néprylisine et d'autres endopeptidases interviennent aussi dans la dégradation de la bradykinine et du facteur natriurétique atrial. Enfin, l'angiotensine-(1-7) est, comme l'angiotensine I et la bradykinine, un substrat endogène de l'ECA qui la dégrade par clivage en angiotensine-(1-5), un pentapeptide inactif (Chappell MC et coll., 1998) (*Figure 2*).

### 1.2.1.4. L'angiotensine IV

L'angiotensine IV ou angiotensine-(3-8), fragment de la proéolyse de l'angiotensine II, (*Figure 2*) a longtemps été considérée comme un produit de dégradation inactif des angiotensines II et III. La découverte d'un site spécifique, le récepteur AT<sub>4</sub> (de Gasparo M et coll., 2000), exprimé dans de nombreux tissus tels que le cerveau, les reins, le cœur et les vaisseaux, ainsi que la preuve d'effets physiologiques *in vivo*, ont amené à considérer actuellement l'angiotensine IV comme un effecteur du SRA. De plus, elle est transformée par des carboxypeptidases en angiotensine-(3-7) qui potentialise, comme l'angiotensine-(1-7), l'effet hypotenseur de la bradykinine, *in vivo*.

### 1.2.1.5. Localisation des composants du système rénine - angiotensine dans le cerveau

Le SRA est exprimé indépendamment du système circulant dans différents tissus non vasculaires, incluant le système nerveux central (SNC) (Milsted A et coll., 1990), (Humpel C et coll., 1994). Dans le SNC, le rôle du SRA inclut non seulement la régulation des fonctions cardiovasculaires (Morimoto S et coll., 2002) mais peut aussi contrôler la croissance ou la mort cellulaire (Kakinuma Y et coll., 1997), (Kakinuma Y et coll., 1998). Une suractivité du SRA cérébral semble impliquée dans le développement de l'hypertension artérielle dans plusieurs modèles d'hypertension expérimentale et génétique, comme par exemple chez les rats spontanément hypertendus (SHR) ou des souris transgéniques exprimant des transgènes humains de la rénine et de l'angiotensinogène (Davisson RL et coll., 1998).

Tous les composants du SRA, incluant le précurseur et les enzymes nécessaires à la production et à la dégradation des angiotensines ont été identifiés dans le cerveau (Phillips MI, 1987), (Saavedra JM, 1992), (Wright JW et Harding JW, 1995).

#### 1.2.1.5.1. L'angiotensinogène

L'angiotensinogène et son ARN<sub>m</sub> ont été largement retrouvés dans le cerveau, supportant le fait qu'il est synthétisé au niveau du SNC (Thomas WG et Sernia C, 1988). Il a été montré que ce sont principalement les astrocytes qui expriment l'angiotensinogène (Milsted A et coll., 1990), (Humpel C et coll., 1994). Sa présence au niveau de sites différents de ceux normalement impliqués dans la régulation de la pression artérielle et de l'homéostasie des électrolytes suggère que son rôle ne serait peut-être pas limité à ces fonctions de régulation (Bunnemann B et coll., 1992).

#### 1.2.1.5.2. La rénine

Des mesures d'activité (Husain A et coll., 1981) ou immunohistochimiques (Inagami T, 1982) ont suggéré une localisation intraneuronale de la rénine, indiquant un mécanisme intracellulaire de la formation d'angiotensines dans les neurones. A côté de ces populations de neurones localisés en différentes régions du SNC, il a été montré que certaines populations

d'astrocytes pouvaient aussi exprimer la rénine (Morimoto S et coll., 2002). L'expression de rénine a également été retrouvée au sein de certaines populations de macrophages cérébraux. Il n'est cependant pas clair si la rénine produite dans le SNC est sécrétée par les cellules, comme c'est le cas pour les cellules juxtaglomérulaires du rein, alors que la sécrétion d'angiotensinogène par les astrocytes est acceptée, et pourrait contrôler l'angiogénèse (Celerier J et coll., 2002).

#### 1.2.1.5.3. L'angiotensine I

Actuellement peu de données sont disponibles concernant la distribution de l'angiotensine I dans le SNC. L'angiotensine I a simplement été mise en évidence dans des extraits de cerveau par HPLC couplée à une détection radioimmunologique (Hermann K et coll., 1984).

#### 1.2.1.5.4. L'enzyme de conversion de l'angiotensine

Bien que l'ECA soit un élément primordial pour le SRA, ses caractéristiques dans le cerveau restent encore peu connues. Seule la forme pulmonaire de l'ECA semble exprimée dans le cerveau (Whiting P et coll., 1991). Une activité similaire à celle de l'ECA a été retrouvée dans des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (Brownfield MS et coll., 1982). D'anciennes expériences avaient montré que l'activité spécifique de l'ECA existait dans plusieurs régions du cerveau incluant le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus, le cerebellum, ... (Saavedra JM et coll., 1982), (Singh EA et McGeer EG, 1979). De plus, une activité ECA a été retrouvée par marquage radioimmunologique dans de nombreuses aires spécifiques du cerveau du rat, parmi lesquelles l'*area postrema* possédait la plus forte activité, suivie de la substance noire et le *locus coeruleus* (Chevillard C et Saavedra JM, 1982).

#### 1.2.1.5.5. L'angiotensine II

Des neurones contenant de l'angiotensine ont été identifiés par immunohistochimie dans l'hypothalamus, le thalamus, l'hippocampe, l'amygdale (Lind RW et Ganten D, 1990), (McKinley MJ et coll., 2001), (Healy DP et Printz MP, 1984), (Lind RW et coll., 1984), (Pickel VM et Chan J, 1995), (Maley BE, 1996), (Johren O et coll., 1997).

#### 1.2.1.5.6. L'angiotensine III

Dans le système vasculaire cérébral, l'activité aminopeptidase A est relativement faible (Juillerat-Jeanneret L et coll., 2000). Au niveau cérébral, il semblerait que l'angiotensine III soit un peptide effecteur majeur, exerçant un contrôle sur la pression artérielle qui implique une activation sympathique, une inhibition du baroréflexe au niveau du noyau du *tractus solitarius* et la libération de vasopressine (Phillips MI, 1987), (Wright JW et Harding JW, 1995), (Wright JW et Harding JW, 1992). En effet Reaux et coll. ont montré qu'injectées au niveau des ventricules cérébraux, les angiotensines II et III possédaient la même affinité pour les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> et engendraient une réponse pressive comparable alors que l'injection intracérébrovasculaire d'un inhibiteur de l'aminopeptidase A bloquait la réponse pressive à l'angiotensine II, suggérant que la conversion de l'angiotensine II en angiotensine III était nécessaire pour augmenter la pression artérielle (Reaux A et coll., 1999). L'injection intracérébrovasculaire d'angiotensine II et d'angiotensine III induit la libération de vasopressine dans la circulation (Zini S et coll., 1996), (Yamaguchi K et coll., 1979), (Hohle S et coll., 1995). Cet effet est totalement bloqué en présence des antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, losartan et PD123319. Là encore, la conversion de l'angiotensine II en angiotensine III ou un autre métabolite de l'angiotensine III, semble requise pour stimuler la sécrétion de vasopressine (Reaux A et coll., 2001).



#### 1.2.1.5.7. L'angiotensine IV

Aucune donnée n'est aujourd'hui publiée quant à la distribution de l'angiotensine IV dans le SNC. Dans le système vasculaire cérébral, les activités aminopeptidases N et B sont détectables.

#### 1.2.1.5.8. L'angiotensine-(1-7)

Des dosages en HPLC et tests radioimmunologiques ont révélé la présence de l'angiotensine-(1-7) au niveau de l'hypothalamus et de l'amygdale (Chappell MC et coll., 1989).

#### 1.2.1.5.9. Biosynthèse de l'angiotensine II dans le cerveau

La biosynthèse cérébrale de l'angiotensine II suit le modèle général décrit au niveau périphérique. La relativement faible concentration de rénine dans le cerveau et les fortes concentrations de l'angiotensinogène posent plusieurs questions intéressantes sur la distribution de ces deux protéines et leur contribution relative à l'activité du SRA cérébral (Dzau VJ et coll., 1987). Il a été avancé que les cellules gliales pourraient débarrasser l'angiotensinogène des fluides extracellulaires permettant de limiter la demi-vie de la pro-hormone (Printz MP, 1988), ou que l'angiotensinogène serait produit par une population de cellules et transporté par une voie paracrine vers d'autres cellules contenant la rénine où il servirait de substrat à la production d'angiotensine II (Ganong WF, 1994). Cependant le mécanisme exact par lequel l'angiotensine II est générée ou incorporée dans les neurones est inconnu (McKinley MJ et coll., 2003).

En dépit de la démonstration d'une activité biologique de l'angiotensine IV et l'angiotensine-(1-7) dans le cerveau, il n'est pas connu où ces fragments sont localisés.

## 1.2.2. Les récepteurs du système rénine - angiotensines

### 1.2.2.1. Récepteurs de la (pro) rénine

Un récepteur spécifique de la rénine et de la prorénine vient d'être cloné (Nguyen G et coll., 2002). Sa fonction est double, il s'agit d'un cofacteur de la rénine en augmentant son activité catalytique de clivage de l'angiotensinogène (Methot D et coll., 1999) (Prescott G et coll., 2002), et il active des voies de signalisation intracellulaires aboutissant à la phosphorylation de MAP kinases ERK 1 et 2 jouant un rôle dans les processus de prolifération et de fibrogenèse. Les résultats du marquage du récepteur par immunofluorescence sur des coupes de rein et de cœur ont montré que le récepteur était localisé sur les cellules mésangiales glomérulaires et les cellules musculaires lisses vasculaires des artères corticales et coronaires (Nguyen G et coll., 1996). Ceci suggère que le récepteur représente un moyen de capture de la (pro) rénine et permet de concentrer la (pro) rénine à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires, à l'interface avec les cellules endothéliales. Ainsi la génération de l'angiotensine I, puis de l'angiotensine II est beaucoup plus efficace puisque à proximité des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>.

Par sa localisation et par ses propriétés biologiques, le récepteur de la rénine pourrait jouer un rôle direct dans les atteintes tissulaires associées à une activation locale du SRA (Moravski CJ et coll., 2000), (Veniant M et coll., 1996).

### 1.2.2.2. Récepteurs des angiotensines II et III

La *Figure 3* résume les effets de l'angiotensine II médiés par ses deux principaux récepteurs, les conséquences physiopathologiques ainsi que les sites d'action des IEC et des AA II (Oudart N, 2005).

Le premier récepteur de l'angiotensine II a été cloné en 1988 (Jackson TR et coll., 1988) puis l'année suivante, il a été proposé l'existence de deux types de récepteurs, AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> (Chiu AT et coll., 1989), (Whitebread S et coll., 1989). Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept hélices transmembranaires, couplés aux protéines G.

#### 1.2.2.2.1. Récepteur AT<sub>1</sub>

Le récepteur AT<sub>1</sub> est ubiquitaire, avec des localisations préférentielles au niveau des vaisseaux, du cœur, du cerveau et des reins. Il existe sous forme inactive, intermédiaire ou sous différentes formes actives pouvant ainsi rendre compte de sa capacité à activer plusieurs voies de signalisation (Thomas WG et Mendelsohn FA, 2003). Les différents mécanismes de transduction font intervenir :

- la voie de la phospholipase C, permettant entre autres, l'augmentation des flux calciques intracellulaires, responsable de la vasoconstriction ;

- la voie des tyrosines-kinases, avec activation des voies des MAP-kinases conduisant à la transcription de gènes à l'origine de facteurs de croissance ;

- la voie influençant le statut oxydatif de la cellule, directement couplé à la fonction endothéliale et à la genèse des radicaux libres (Wagenaar LJ et coll., 2002).

La plupart des effets de l'angiotensine II sont médiés par le récepteur AT<sub>1</sub> (*Figure 4*) :

- l'augmentation de la sécrétion d'aldostérone, et donc la rétention sodée et l'effet antidiurétique concourent à l'hypervolémie ;

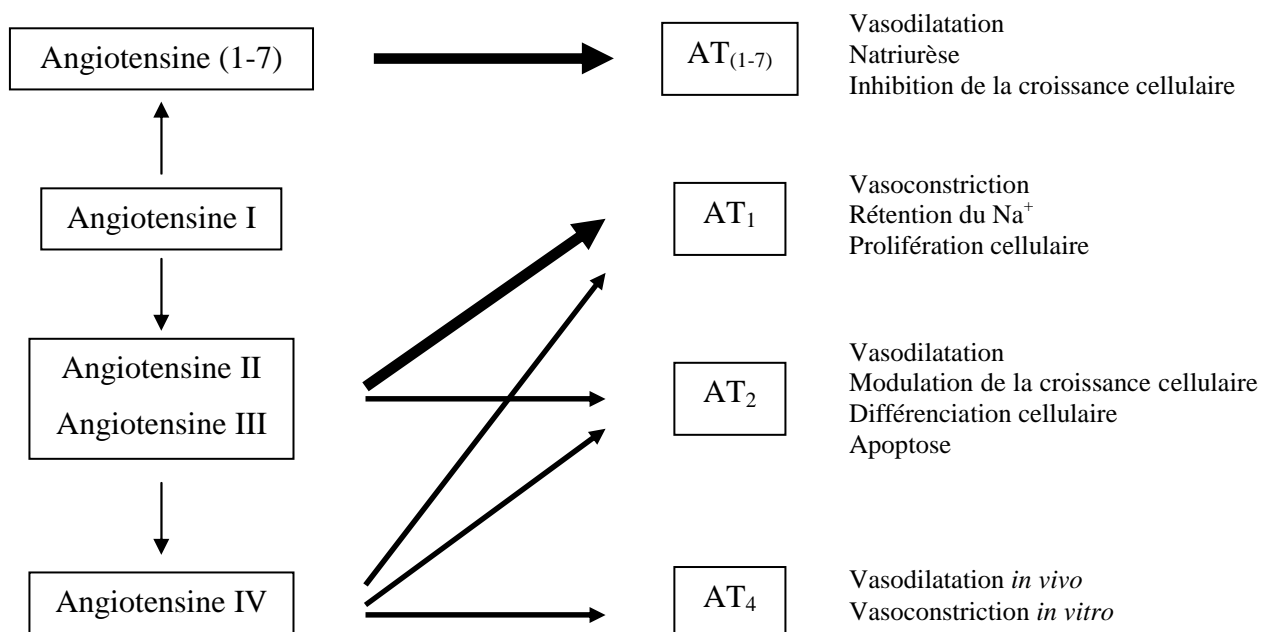
- la contraction des vaisseaux sanguins associée à l'hypervolémie aboutit à une augmentation de la pression artérielle ;

- au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses, les effets directs de l'angiotensine II se traduisent par l'hypertrophie et la prolifération cellulaire, la formation de la matrice extracellulaire, le stress oxydant et les réactions inflammatoires. Les effets trophiques de l'angiotensine II sont initiateurs au niveau des cellules vasculaires, cardiaques et rénales, respectivement d'athérogenèse, d'hypertrophie ventriculaire gauche et de néphropathie, avec implication possible des SRA intrinsèques ;

- au niveau central, l'angiotensine II, introduite dans des zones cérébrales particulières lors d'expérimentations animales, provoque une hypertension artérielle par stimulation du système sympathique et libération de noradrénaline, une augmentation de la sécrétion de vasopressine et d'hormone corticotrophine (ACTH). Elle possède un effet dipsogène.

Cette apparente domination fonctionnelle des récepteurs AT<sub>1</sub> dans la plupart des effets actuellement connus de l'angiotensine II pose le problème de la signification physiologique des récepteurs AT<sub>2</sub>.

Chez les sujets normotendus, le récepteur AT<sub>1</sub> est présent majoritairement sous forme monomérique alors que chez les hypertendus, le récepteur apparaît comme un dimère (Abdalla S et coll., 2004). Cette dimérisation interviendrait sous l'action du facteur XIIIa (transglutaminase) des monocytes. De plus, ces dimères présenteraient une activité supérieure aux récepteurs monomériques.



**Figure 4 : Les récepteurs aux angiotensines**

#### 1.2.2.2.2. Récepteur AT<sub>2</sub>

Après leur découverte et leur caractérisation moléculaire, le rôle des récepteurs AT<sub>2</sub> est resté longtemps énigmatique. Comme ils sont fortement exprimés chez le fœtus, on a supposé qu'ils étaient impliqués dans le développement embryonnaire et qu'ils contrôlaient la différenciation cellulaire. Chez l'adulte où leur répartition est moindre, leur rôle semblait limité à la régulation de la mort cellulaire programmée ainsi qu'à la protection et à la

régénération tissulaire (Unger T, 1999). Il a ensuite été admis la possibilité d'une balance fonctionnelle entre la stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> par l'angiotensine II. En effet les récepteurs AT<sub>2</sub> ne présentent que 32 % d'homologie avec les récepteurs AT<sub>1</sub>. Ils se lient avec des sous-unités différentes des protéines G. Ils activent d'autres voies de signalisation intracellulaires expliquant les effets souvent opposés.

La voie du monoxyde d'azote, couplée à l'activation de la guanylyl-cyclase, et l'implication possible de la bradykinine explique leur rôle dans le contrôle de la pression artérielle. Des études effectuées sur certains modèles animaux (Ichiki T et coll., 1995), (Barber MN et coll., 1999; Gigante B et coll., 1998) ont permis de démontrer que la stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub> entraîne une vasodilatation et peut s'opposer aux effets AT<sub>1</sub>-dépendants de l'angiotensine II circulante tels que la rétention sodée et l'élévation de la pression artérielle.

Le mécanisme de transduction impliquant la voie des phosphatases va finalement, en s'opposant aux MAP-kinases activées par le récepteur AT<sub>1</sub>, inhiber la prolifération cellulaire par stimulation de l'apoptose (Li JS et coll., 1998). L'angiotensine II en se fixant sur le récepteur AT<sub>2</sub> va aussi activer le facteur nucléaire  $\kappa$ B impliqué dans les phénomènes inflammatoires permettant de supposer que les récepteurs AT<sub>2</sub> participent à la physiopathologie de l'athérosclérose (Wagenaar LJ et coll., 2002). De plus il a été constaté une ré-expression du récepteur AT<sub>2</sub> dans les situations de souffrance ou d'ischémie tissulaire (Nio Y et coll., 1995), (Viswanathan M et Saavedra JM, 1992) et il est maintenant admis que les récepteurs AT<sub>2</sub> peuvent être impliqués dans la régulation du remodelage vasculaire au moins dans certaines conditions pathologiques. Il reste encore à expliquer pourquoi, selon le modèle physiopathologique ou le niveau de développement cellulaire, la stimulation des AT<sub>2</sub> entraîne une inhibition ou une augmentation de la croissance cellulaire. Parallèlement, il a été démontré que l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> peut favoriser l'apoptose neuronale (Horiuchi M et coll., 1998), (Yamada T et coll., 1996) ou, au contraire, la régénération s'il existe une lésion neuronale (Lucius R et coll., 1998).

De nombreuses études ont confirmé cependant la prédominance de la densité en récepteurs AT<sub>1</sub> dans la plupart des organes où ils sont rapidement internalisés après fixation de l'angiotensine II. Leur expression est sous la dépendance des récepteurs AT<sub>2</sub> qui, par un mécanisme NO-dépendant, diminuent l'expression des récepteurs AT<sub>1</sub> (Jin XQ et coll., 2002).

Inversement, la fixation sur le récepteur AT<sub>1</sub> d'un ligand endogène ou d'un antagoniste provoque une augmentation de l'expression des AT<sub>2</sub> à la surface cellulaire (de Paolis P et coll., 1999).

### 1.2.2.3. Récepteur de l'angiotensine-(1-7)

Dans le même temps, alors que le concept selon lequel l'action physiologique du SRA est due à l'équilibre entre la stimulation par l'angiotensine II des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, l'équipe de Ferrario mettait en évidence un autre peptide régulateur du SRA : l'angiotensine-(1-7) (Ferrario CM et Iyer SN, 1998). La mise en évidence d'un site spécifique de fixation de l'angiotensine-(1-7) remonte à une dizaine d'années (Santos A et coll., 1994). Le récepteur de l'angiotensine-(1-7) (AT<sub>1-7</sub>) a été défini par ses propriétés pharmacologiques : spécificité pour son ligand agoniste, l'angiotensine-(1-7), et pour l'antagoniste A779 [(7-D-ALA) angiotensine-(1-7)]. Ce récepteur couplé à une protéine G est codé par le proto-oncogène Mas (Santos RA et coll., 2003).

Les premiers effets décrits indiquent que l'angiotensine-(1-7) mime certaines actions de l'angiotensine II. Cependant elle n'a pas d'effet vasoconstricteur, n'entraîne pas d'augmentation d'origine centrale de la pression artérielle, ne déclenche pas le mécanisme dypsique. Ferrario a montré un effet dépresseur, vasodilatateur et une action antihypertensive de ce peptide (Ferrario CM et coll., 1997). En effet, l'angiotensine-(1-7) augmente la synthèse et la sécrétion de prostaglandines relaxantes, potentialise l'action de la bradykinine et stimule la sécrétion de monoxyde d'azote, comme l'indiquent un certain nombre de travaux expérimentaux (Brosnihan KB et coll., 1996), (Iyer SN et coll., 2000). Enfin de nombreux travaux ont montré qu'elle s'oppose à l'action proliférative et au remodelage vasculaire dus à l'angiotensine II (Freeman EJ et coll., 1996), (Strawn WB et coll., 1999).

Finalement l'angiotensine-(1-7) est une hormone dont le rôle essentiel est une régulation négative des effets presseurs et trophiques de l'angiotensine II. La découverte récente d'un homologue de l'ECA, l'ECA2, qui régule négativement le SRA conforte cette thèse (Donoghue M et coll., 2000). Le couple ECA2 / angiotensine-(1-7) apparaît comme un élément essentiel de la contre-régulation des actions du couple ECA / angiotensine II.

#### 1.2.2.4. Récepteur de l'angiotensine IV

L'angiotensine IV, fragment protéolytique de l'angiotensine II initialement considéré comme un produit de dégradation inactif, possède des activités biologiques attribuées à son site de fixation spécifique de haute affinité dénommé AT<sub>4</sub>. L'angiotensine IV augmente le flux sanguin dans le cortex rénal, la cochlée et le cerveau, par le biais d'un effet vasodilatateur (Thomas WG et Mendelsohn FA, 2003). Cette vasodilatation est médiée par le récepteur AT<sub>4</sub>, bloquée par l'antagoniste des récepteurs AT<sub>4</sub> mais non altérée par des antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub>.

Cependant, dans de nombreux lits vasculaires, l'angiotensine IV montre un effet vasoconstricteur. Cette vasoconstriction est médiée par le récepteur AT<sub>1</sub> sur lequel l'angiotensine IV se fixe avec une affinité plus faible que l'angiotensine II (*Figure 4*).

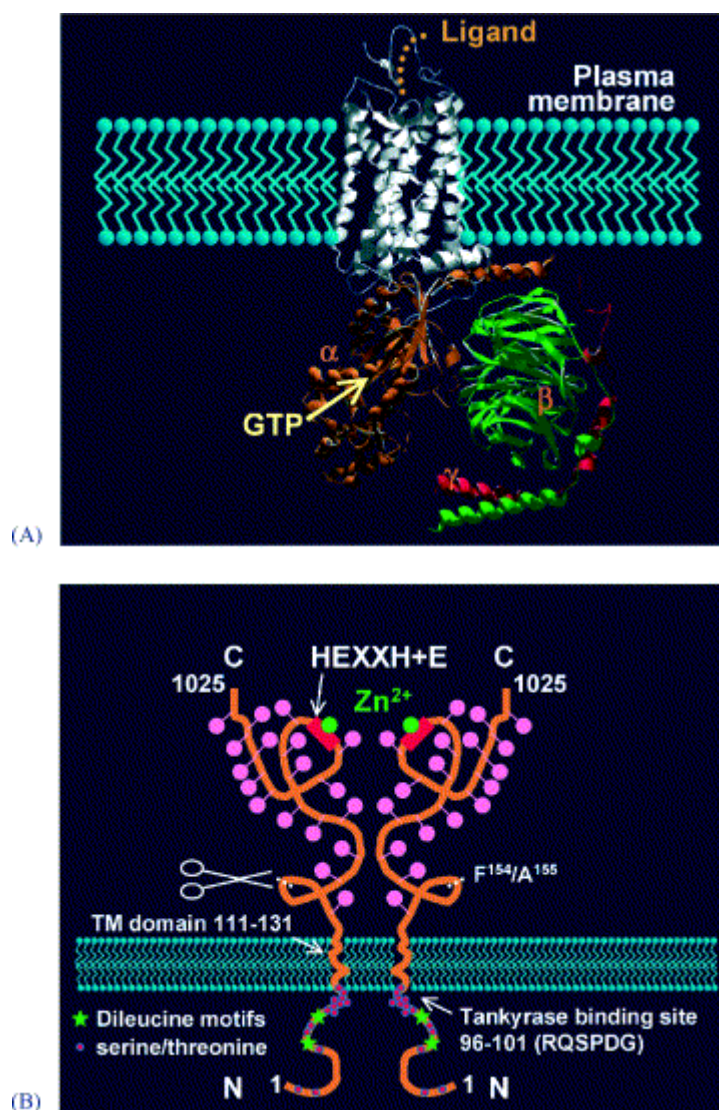
Dans la circulation pulmonaire du rat, à la fois le L-NAME et un inhibiteur de la cyclooxygénase déplacent la courbe de réponse vasoconstrictrice à l'angiotensine IV vers la gauche, indiquant que l'angiotensine IV induirait la libération de NO et de prostaglandines vasodilatatrices, ce qui balancerait partiellement l'effet vasoconstricteur médié par les récepteurs AT<sub>1</sub>. De plus, l'antagoniste spécifique des récepteurs AT<sub>2</sub>, le PD123319, augmente la réponse pressive, suggérant que la stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub> par l'angiotensine IV balancerait l'effet vasoconstricteur médié par les récepteurs AT<sub>1</sub>. En effet, Loufrani et coll. (Loufrani L et coll., 1999) ont montré sur des artères mésentériques de rat fraîchement isolées et perfusées que l'angiotensine IV induisait une vasoconstriction mais qu'un prétraitement par le candesartan démasquait un effet vasodilatateur qui était aboli par le PD123319. Quand à la fois les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> étaient bloqués par leurs antagonistes spécifiques, l'angiotensine IV montrait toujours un effet vasoconstricteur. Ensemble, ces résultats indiquent que l'angiotensine IV est une angiotensine réellement active mais que ses effets sont complexes.

Le « récepteur » AT<sub>4</sub> a été récemment identifié comme étant l'Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP), une métallopeptidase zinc-dépendante insérée dans la membrane, et initialement identifiée à l'origine dans les cellules adipeuses et les cellules musculaires (Keller SR et coll., 1995). Le clonage de l'ocytocinase placentaire humaine (P-LAP pour Placental Leucine Amino-Peptidase), a révélé que IRAP et P-LAP sont en fait les homologues

chez le rat et l'Homme de la même protéine. Situé dans des vésicules intracellulaires avec le transporteur de glucose GLUT-4, IRAP est externalisé en réponse à l'insuline et au facteur de croissance insulinaire (IGF-1), l'ocytocine et l'endothéline-1 (ET-1) (Keller SR, 2003), (Wu-Wong JR et coll., 1999). Bien que *in vivo* les substrats d'IRAP restent à identifier, IRAP clive et inactive *in vitro* un certain nombre de peptides comme l'ocytocine, la vasopressine, la somatostatine, la dynorphine, et la met-enképhaline. Le ligand endogène du récepteur AT<sub>4</sub> / IRAP, l'angiotensine IV, inhibe son activité catalytique.

Le récepteur AT<sub>4</sub> / IRAP n'est pas un récepteur à sept hélices transmembranaires ; il possède un important fragment extracellulaire qui porte le site catalytique, un fragment transmembranaire et un unique domaine intracellulaire (*Figure 5*). Il ne semble pas que le mécanisme de transduction intracellulaire mette en jeu un second messager (Thomas WG et Mendelsohn FA, 2003).





**Figure 5 : Comparaison structurale entre le récepteur AT<sub>1</sub> à 7 domaines transmembranaires (A) et le récepteur AT<sub>4</sub> (B)**

(d'après Thomas WG et Mendelsohn FA, 2003)

*In vitro*, l'IRAP dégrade et inactive certains peptides comme la vasopressine, l'ocytocine, la somatostatine (Matsumoto H et coll., 2000) la dinorphine et la met-enképhaline (Matsumoto H et coll., 2001). Keller (Keller SR, 2003) a montré que le traitement de cellules par des peptides exogènes tels que l'insuline ou l'ocytocine augmente l'activité de l'aminopeptidase suggérant que l'AT<sub>4</sub> / IRAP pourrait réguler négativement les actions de certains peptides circulants ou sécrétés localement. Or la fixation de l'angiotensine IV sur son récepteur inactive l'activité enzymatique de celui-ci ; aussi peut-on penser qu'une des

fonctions de l'angiotensine IV est de prolonger les effets des peptides circulants en ralentissant leur dégradation (Lew RA et coll., 2003).

Du fait de la multiplicité de peptides qui pourraient potentiellement être substrat de l'activité catalytique d'IRAP *in vivo*, et étant donnée la forte expression du récepteur AT<sub>4</sub> / IRAP dans de nombreux tissus, ces récents résultats ouvrent la possibilité d'une contribution de l'angiotensine IV dans différents processus comme la régulation de l'hémodynamique locale, le métabolisme et la croissance de tissus sous le contrôle de l'insuline, l'homéostasie du sodium par le rein ou encore les adaptations hémodynamiques durant la grossesse. En d'autres termes, la capacité de l'angiotensine IV à inhiber la boucle de régulation négative autocrine de peptides de signalisation extracellulaire offre au SRA des opportunités de moduler l'action de nombreuses autres hormones. Le rôle potentiel de l'angiotensine IV pourrait être d'une importance particulière dans le cerveau, où le récepteur AT<sub>4</sub> / IRAP est fortement exprimé et où l'angiotensine III, son précurseur immédiat, est présente à des concentrations plus fortes que l'angiotensine II (Llorens-Cortes C et Mendelsohn FA, 2002), (Rozenfeld R et coll., 2003). De plus, plusieurs substrats de l'activité catalytique d'IRAP (vasopressine, met-enképhaline, ocytocine) sont des neuromédiateurs établis dans des aires cérébrales spécifiques où l'angiotensine III est aussi présente. Actuellement, on a montré que l'angiotensine IV serait capable d'augmenter le débit sanguin cérébral en impliquant spécifiquement les récepteurs AT<sub>4</sub> (Kramar EA et coll., 1997), (Kramar EA et coll., 1998) ; elle jouerait aussi un rôle dans la mémoire, l'apprentissage et les fonctions cognitives (Wright JW et coll., 1999), (Albiston AL et coll., 2004), (Lee J et coll., 2004).

#### 1.2.2.5. Les récepteurs aux angiotensines dans le cerveau

Des sites spécifiques de fixation des angiotensines existent dans le cerveau (*Tableau I*, (de Gasparo M et coll., 2000))

**Tableau I : Localisation des récepteurs AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub> dans le cerveau**  
**déterminée par immunohistochimie et autoradiographie**  
(d'après von Bohlen Und Halbach O, 2005)

<b>Aires</b> \ <b>Récepteurs</b>	<b>AT<sub>1</sub></b>	<b>AT<sub>2</sub></b>	<b>AT<sub>4</sub></b>
<b>Cortex</b>	++	+ / -	+++
<b>Hippocampe</b>	+++	++	++
<b>Amygdale</b>	+++	++	+
<b>Thalamus</b>	+ / -	++	+++
<b>Hypothalamus</b>	+++	+	+++
<b>Mésencéphale</b>	++	++	+++
<b>Cerebellum</b>	++	++	+++

### 1.2.3. Le système rénine - angiotensines : un système pléiotrope

Il est maintenant reconnu que le SRA agit par le biais d'un grand nombre de facteurs (peptides, peptidases et récepteurs) eux-mêmes soumis à de multiples interactions. En fait, l'action des angiotensines est très complexe d'une part parce que l'angiotensine II est synthétisée puis dégradée par l'ECA qui dégrade aussi la bradykinine, puissant agent vasodilatateur mais aussi parce que le SRA n'est pas le seul système impliqué puisque d'autres voies enzymatiques participent à la synthèse de l'angiotensine II comme par exemple les chymases et la cathepsine. La régulation est essentiellement assurée par la rénine. Enfin, la dégradation enzymatique et l'endocytose déterminent la durée d'action des angiotensines.

Finalement, le concept classique qui fait jouer au système rénine-angiotensine un rôle vasoconstricteur exclusif constitue une simplification caricaturale de la complexité de ce système. D'une part, il est maintenant connu que le SRA n'est pas seulement un système hormonal circulant, mais qu'il existe dans une grande variété de tissus un SRA local,

vraisemblablement impliqué dans des régulations paracrines. D'autre part, il est aussi bien établi que d'autres peptides que l'angiotensine II, comme l'angiotensine-(1-7) et l'angiotensine IV, initialement considérés comme des catabolites inactifs, sont capables d'exercer des effets physiologiques médiés par des récepteurs propres, et sont en fait vasodilatateurs dans plusieurs lits vasculaires. Enfin, un degré supplémentaire de complexité est apparu avec la preuve que les principaux effets de l'angiotensine II sont médiés par deux types de récepteurs distincts : les récepteurs AT<sub>1</sub> qui rendent compte de la majorité des effets physiologiques et physiopathologiques de l'angiotensine II, et les récepteurs AT<sub>2</sub> qui semblent s'opposer en miroir aux effets des AT<sub>1</sub>.

Cette complexité dynamique remet en cause le concept général du « blocage pharmacologique du SRA », qui fait référence à l'idée que l'effet de l'angiotensine, considérée comme délétère en toutes circonstances et seulement médiée par l'angiotensine II et le récepteur AT<sub>1</sub>, pourrait être réduit de façon similaire en réduisant la formation d'angiotensine par des inhibiteurs de l'ECA (IEC) ou en bloquant la signalisation de l'angiotensine par des antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> (AA II aussi appelés sartans) (*Tableau II*).

**Tableau II : Modification de la concentration des peptides angiotensines et de l'activité des récepteurs avec des inhibiteurs de l'ECA (IEC) ou des bloqueurs des récepteurs AT<sub>1</sub> (Sartans)**

	IEC	Sartans
<b>[Angiotensines plasmatiques]</b>		
Ang-I	↓	↑
Ang-II	↓	↑
Ang-IV	↓	↑
Ang-(1-7)	↑	↑
Bradykinine / NO	↑	↑
<b>Activation des récepteurs</b>		
AT <sub>1</sub>	↓	↓
AT <sub>2</sub>	↓	↑
AT <sub>4</sub>	↓	↑
AT <sub>(1-7)</sub>	↑	↑
BK <sub>2</sub>	↑	↑

En fait, bien que l'inhibition de l'ECA augmente initialement la concentration d'angiotensine I et diminue celles d'angiotensine II et d'aldostérone, les taux plasmatiques d'angiotensine II ne seraient pas totalement supprimés au cours de la thérapie chronique. Les augmentations des taux circulants de rénine et d'angiotensine I induites par les inhibiteurs de l'ECA pourraient surmonter la capacité inhibitrice de ces derniers et fournir plus de substrat pour la formation d'angiotensine II par la voie alternative des chymases. Le fait qu'en dépit de la suppression transitoire d'angiotensine II, la pression artérielle demeure abaissée, suggère

que le mécanisme inhibiteur de l'ECA diminuant la pression artérielle pourrait être, au moins en partie, médié par l'inhibition simultanée de l'activité de la kininase de l'ECA, et par des taux élevés d'angiotensine-(1-7), résultant en une augmentation de la libération de bradykinine tissulaire.

Les antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II, en inhibant les rétrocontrôles négatifs qu'exerce l'angiotensine II sur la sécrétion de rénine, augmentent les concentrations circulantes d'angiotensines II, III, IV (Shibasaki Y et coll., 1999), et de l'angiotensine-(1-7), ainsi que l'expression des récepteurs AT<sub>2</sub> et des récepteurs de la bradykinine (Tschope C et coll., 2004). Ils favorisent donc les effets non-AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II : AT<sub>2</sub>, ainsi que les effets dus à la stimulation des récepteurs AT<sub>4</sub> et AT<sub>1-7</sub>, ce qui renforcerait l'effet bénéfique des AA II dans le traitement de l'hypertension artérielle à rénine haute ainsi que dans l'insuffisance cardiaque. Un certain nombre de travaux expérimentaux supportent l'idée que les angiotensines, précisément au travers des récepteurs non-AT<sub>1</sub>, jouent un rôle protecteur au cours de l'ischémie cérébrale.

Il semble acquis que certains sartans comme des IEC traversent la barrière hématoencéphalique (BHE). En effet, il a été montré d'une part que le candesartan administré au niveau périphérique par voie intra-veineuse inhibait les effets centraux de l'angiotensine II médiés par des récepteurs AT<sub>1</sub> localisés dans des régions cérébrales périventriculaires chez des rats conscients (Gohlke P et coll., 2002). De plus, Wang et coll. ont rapporté une diminution dose-dépendante de la fixation d'angiotensine II marquée à l'iode 125 sur les récepteurs AT<sub>1</sub> à l'extérieur comme à l'intérieur de la BHE après l'administration unique sous cutanée de losartan ou d'embusartan. La liposolubilité supérieure de l'embusartan lui confère cependant une meilleure pénétration au travers de la BHE lors d'une administration chronique, et donc un blocage plus important des récepteurs AT<sub>1</sub>. Le blocage des récepteurs AT<sub>1</sub> était totalement perdu 36 heures après la dernière administration de l'une ou l'autre des deux molécules (Wang JM et coll., 2003). D'autre part, une inhibition de l'ECA cérébrale a été retrouvée chez des rats Wistar soumis à un traitement par voie sous cutanée par lisinopril ou trandolapril. De la même façon que pour les sartans, si l'inhibition enzymatique de l'ECA était comparable au niveau périphérique pour les deux substances, la molécule la plus lipophile, le trandolapril, était plus efficace à faible et moyenne doses au niveau central (Tan J et coll., 2005).

# 1.3. DONNÉES EXPÉRIMENTALES POUR UN EFFET PROTECTEUR DES ANGIOTENSINES DURANT L'ISCHÉMIE AIGUË

## 1.3.1. Effet protecteur de l'angiotensine II dans l'ischémie aiguë du train arrière

Le rôle paradoxal de l'angiotensine II dans la protection des organes contre l'ischémie aiguë a été pour la première fois établi par le groupe de Leonardo Fernandez à l'Université de Yale, il y a plus de 20 ans. Dans une étude où une hypertension consécutive à une ischémie rénale unilatérale était induite par une ligature aortique entre les artères rénales de rats, la réduction brutale de l'alimentation en sang des muscles après la ligature résultait en une paralysie du train arrière (Fernandez LA et coll., 1982). Pour les animaux chez qui le rein gauche ischémique n'était pas touché, la paralysie était transitoire et la récupération obtenue en deux heures alors que les animaux pour lesquels une néphrectomie gauche était réalisée, restaient paralysés pendant plus de 24 heures après la chirurgie. Cet effet protecteur était mimé par la perfusion exogène d'angiotensine II chez les rats néphrectomisés, supprimé par l'antagoniste de l'angiotensine, la saralazine, mais était indépendant de la pression artérielle, du fait de sa persistance après normalisation de la pression artérielle par la réserpine.

Les mesures du débit sanguin dans le muscle de la patte arrière à différents temps après la ligature aortique, utilisant des microsphères marquées radioactives, montraient qu'une diminution significative du débit suivait immédiatement la ligature. Après 24 heures, le flux sanguin réduit était récupéré dans les groupes pour lesquels le rein gauche restait intact et chez les rats néphrectomisés perfusés par de l'angiotensine II exogène. La même tendance était observée sur les animaux ligaturés traités par la réserpine, qui présentaient une pression artérielle normalisée. A l'inverse, le débit sanguin restait faible chez les animaux ayant subi une ligature aortique et une néphrectomie gauche normalisant la pression artérielle et chez les rats préparés de façon similaire mais rendus hypertensifs par l'administration de

désoxycorticostérone (DOCA) et de sel. Une forte corrélation était retrouvée entre l'absence d'anormalité de la marche, le débit sanguin restauré et l'activité plasmatique de la rénine élevée. Des aortographies montraient que la restauration du débit sanguin distal était la conséquence du recrutement de voies collatérales provenant de la circulation mésentérique.

Ces résultats indiquaient que l'angiotensine II, par un mécanisme indépendant de la pression artérielle, contribuait à restaurer le débit sanguin dans les tissus ischémiés, amenant ce groupe à examiner si des mécanismes similaires pouvaient être observés dans un modèle d'ischémie cérébrale.

### 1.3.2. Effet protecteur de l'angiotensine II au cours de l'ischémie cérébrale aiguë chez la gerbille

La gerbille (*Meriones unguiculatus*) dont l'arborisation vasculaire cérébrale est caractérisée par l'absence de polygone de Willis complet, développe une ischémie cérébrale focale ipsilatérale à la suite d'une ligature brutale d'une artère carotide, avec un taux de mortalité d'approximativement 50 % 48 heures après la chirurgie. La perfusion d'angiotensine II exogène diminuait le taux de mortalité à approximativement 15 % mais augmentait la pression artérielle à un niveau similaire avec celui obtenu par un traitement par le metaramidol qui, lui, ne diminuait pas la mortalité (Fernandez LA et coll., 1986).

Cet effet bénéfique était associé avec une récupération partielle du débit sanguin focal frontal ipsilatéral plus rapide. La ligature en deux temps d'une carotide, complète mais progressive, permettait d'engendrer des processus d'adaptation, résultant en des infarctus cérébraux bien moins sévères et permettant de réduire la mortalité. Chez des gerbilles perfusées pendant 4 heures soit par un inhibiteur de l'ECA, l'enalaprilat, soit par un antagoniste compétitif de l'angiotensine II, la saralasin, la mortalité des animaux ligaturés progressivement était fortement augmentée en comparaison avec les contrôles et n'était pas différente de celle des animaux ligaturés brutalement (Kaliszewski C et coll., 1988), indiquant que l'adaptation à l'ischémie cérébrale progressive impliquerait un mécanisme dépendant de l'angiotensine II.



Dans une autre étude, les effets d'un prétraitement avec l'énalaprilat et l'antagoniste spécifique des récepteurs AT<sub>1</sub>, le losartan, étaient comparés dans un modèle de ligature brutale unilatérale de l'artère carotide (Fernandez LA et coll., 1994). Le prétraitement avec le losartan augmentait significativement le taux de survie mais l'énalaprilat abolissait totalement l'effet protecteur du sartan. Chez les gerbilles prétraitées soit par une solution saline, soit par du losartan, soit par l'énalaprilat, l'artère rénale gauche était ligaturée pour stimuler la production de rénine et d'angiotensine II. Alors qu'à la fois l'énalaprilat et le losartan palliaient à l'augmentation de pression artérielle induite par la ligature de l'artère rénale, seule l'addition de l'inhibiteur de l'ECA augmentait de façon marquée le taux de mortalité.

Ces résultats ont été indépendamment confirmés par notre groupe. Pour la même diminution de pression artérielle en comparaison avec les contrôles traités par une solution saline, le losartan et le candesartan ne diminuaient pas le taux de survie (respectivement 65 et 60 % au bout de 3 jours) alors que l'énalaprilat et le lisinopril le diminuait à 25 et 18 % et abolissaient l'effet protecteur des sartans (Dalmay F et coll., 2001a).

Ensembles, ces études expérimentales fournissaient de fortes preuves indiquant que chez la gerbille, l'angiotensine II possède un effet protecteur contre l'ischémie cérébrale qui s'opère *via* des récepteurs non AT<sub>1</sub>. Le récepteur AT<sub>2</sub> est certainement un candidat potentiel incontournable. Du fait de la sur-expression des récepteurs AT<sub>2</sub> dans le cerveau ischémié (Makino I et coll., 1996), et comme leur activation déclenche une vasodilatation NO-dépendante, leur activation pourrait conduire à une redistribution du débit sanguin vers les zones ischémiées. Cette hypothèse a été examinée sur le modèle de ligature aiguë de l'artère carotide chez la gerbille par le groupe de Fernandez. De façon surprenante, le prétraitement par un antagoniste des récepteurs AT<sub>2</sub>, le PD123319, seul, induisait une diminution significative de la mortalité comparée avec des animaux prétraités par une solution saline. De plus, malgré l'action protectrice du losartan, l'effet bénéfique du récepteur AT<sub>2</sub> n'était pas significativement inhibé par un prétraitement par l'énalaprilat (Fernandez LA et coll., 1994). L'interprétation proposée par cette équipe est que le PD123319 diminuait la mortalité en stimulant les récepteurs AT<sub>2</sub> en tant qu'agoniste. Le récepteur AT<sub>2</sub> de la gerbille a récemment été cloné par le groupe de Savedraa (Hoe KL et coll., 2003), mais il n'est toujours pas connu si ce récepteur, contrairement au récepteur AT<sub>2</sub> des autres espèces de mammifères, pourrait être activé plutôt qu'inhibé par le PD123319. Cependant, les résultats inattendus de Fernandez

pourraient aussi indiquer qu'un autre récepteur, non-AT<sub>1</sub> et non-AT<sub>2</sub>, serait impliqué dans l'effet protecteur de l'angiotensine.

Le groupe de Wright (Kramar EA et coll., 1997), a montré que la perfusion d'angiotensine IV augmentait de manière dose-dépendante le débit sanguin cérébral sans modification significative de la pression artérielle et que cet effet n'était pas affecté par des bloqueurs des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> mais supprimé par l'antagoniste des récepteurs AT<sub>4</sub>, le divalinal. De plus, l'angiotensine IV restaurait le débit sanguin cérébral à la suite d'une hémorragie sous-arachnoïdienne (Naveri L et coll., 1994). De façon intéressante, il a été documenté dans des modèles animaux et chez des humains que l'ischémie cérébrale ou l'hémorragie cérébrale augmentaient l'ET-1 intracérébrale et que dans l'une et l'autre de ces conditions, l'ET-1 induisait une expression fonctionnelle du récepteur AT<sub>4</sub> dans les cardiomyocytes (Wu-Wong JR et coll., 2000) et sur l'artère basilaire. Il avait par conséquent été choisi, d'étudier au sein du laboratoire, l'effet de la perfusion d'angiotensine IV dans le modèle de ligature brutale unilatérale de la carotide chez la gerbille. Chez les gerbilles prétraitées par le candesartan, l'angiotensine IV réduisait le taux de mortalité au bout de trois jours, modérément et de façon non significative (43 *versus* 57 %) mais réduisait significativement l'augmentation de mortalité induite par un prétraitement par le lisinopril (64 *versus* 88 %) (Dalmay F et coll., 2001b), suggérant que la stimulation des récepteurs AT<sub>4</sub> contribuerait à l'effet protecteur de l'angiotensine II.

Le rôle protecteur établi de l'angiotensine dans le modèle d'ischémie cérébrale aiguë chez la gerbille soulève cependant une importante question : le développement de mécanismes adaptatifs du débit sanguin cérébral en réponse à l'ischémie aiguë observé chez la gerbille est-il partagé parmi tous les mammifères du fait de la particularité anatomique de sa vascularisation cérébrale ?

### 1.3.3. Effet protecteur de l'angiotensine II au cours de l'ischémie cérébrale aiguë chez d'autres espèces mammifères (souris, rat et lapin)

Haberl et coll. ont évalué la réponse d'artérioles cérébrales à l'angiotensine II chez des rats équipés d'une fenêtre crânienne fermée. L'application topique d'angiotensine II induisait une vasodilatation artériolaire dose-dépendante. La dilatation en réponse à l'angiotensine II était bloquée par le bleu de méthylène. L'illumination à la lumière au mercure de vaisseaux

cérébraux après injection intraveineuse de fluorescéine, une technique qui altère la fonctionnalité des cellules endothéliales, réversait la vasodilatation induite par l'angiotensine II en une contraction, suggérant que l'angiotensine II produirait une réponse vasodilatatrice des artérioles cérébrales de rat par la libération d'un facteur dérivé de l'endothélium (Haberl RL et coll., 1990).

Utilisant la même méthode de fenêtre crânienne sur des lapins anesthésiés, ce groupe a étudié l'effet de l'application topique de rénine à la surface du cerveau sur le calibre des artérioles cérébrales et le débit sanguin cérébral mesuré simultanément par laser Doppler. La rénine induisait une dilatation des artérioles cérébrales en deux minutes et le débit augmentait graduellement jusqu'à un pic obtenu cinquante minutes après l'application de rénine. Le diamètre et la variation de débit étaient inhibés par un prétraitement intraveineux ou topique de captopril. Les taux sanguins jugulaires d'angiotensine I, mesurés par dosage radioimmunologique, étaient augmentés jusqu'à un pic, quarante minutes après l'application topique de rénine alors que les taux d'angiotensine II dans le sang jugulaire n'étaient pas modifiés (Haberl RL et coll., 1996).

Comme chez le rat, l'application topique d'angiotensine II ou d'angiotensine III sur la surface du cerveau entraînait une dilatation artériolaire cérébrale qui était supprimée en présence de bleu de méthylène. L'amastatine, un inhibiteur des aminopeptidases et bloqueur de la dégradation enzymatique de l'angiotensine, inhibait aussi la réponse à l'angiotensine II et l'angiotensine III. L'angiotensine IV ne montrait pas de réponse artériolaire mais une vasodilatation (21 %) était observée quand l'angiotensine IV était appliquée topiquement à la suite de L-arginine, alors que la L-arginine elle-même induisait une légère vasodilatation de l'ordre de 4 %. Cette réponse dilatatrice à l'angiotensine IV après la L-arginine était inhibée par le bleu de méthylène mais n'était pas affectée par l'amastatine (Haberl RL et coll., 1991). La coapplication topique de losartan ou de PD123319 produisait une inhibition de respectivement 55 et 62 % de la réponse dilatatrice à l'angiotensine II. L'application combinée des antagonistes entraînait 79 % d'inhibition. Chacun de ces antagonistes bloquait presque totalement la réponse à la L-arginine / angiotensine IV, alors que la dilatation d'artérioles du cerveau de lapin induite par l'acétylcholine n'était pas affectée par ces antagonistes (Haberl RL, 1994).

Ces études suggèrent que la dilatation endothélium-dépendante induite par l'angiotensine II sur les artérioles cérébrales de lapin et du rat serait indirectement médiée par l'angiotensine IV, plus que par l'angiotensine II elle-même. Cette conclusion est en concordance avec les résultats de Kramar et coll. (Kramar EA et coll., 1998) selon lesquels l'angiotensine IV administrée dans la carotide augmente le débit sanguin cérébral par un mécanisme NO-dépendant médié par le récepteur AT<sub>4</sub>. L'effet similaire surprenant du losartan et du PD123319, rappelant l'observation rapportée par Fernandez chez la gerbille, pourrait cependant suggérer que l'effet final résulterait d'une interaction complexe entre les trois sous-types de récepteurs.

Maktabi et coll. ont mesuré le débit sanguin cérébral sur des lapins anesthésiés au pentobarbital, soumis à 30 minutes d'hypoxie stable suivi par quinze minutes de réoxygénation. Le débit sanguin cérébral était mesuré quatre fois : sous les conditions contrôles, 15 et 30 minutes après l'hypoxie et 15 minutes après la réoxygénation. L'effet de l'administration de 10 mg / kg d'un inhibiteur de l'ECA, le captopril, avant la mesure contrôle ou de la perfusion d'un antagoniste non sélectif de l'angiotensine, la saralasin, débutée au début de l'hypoxie et poursuivie le temps de la réoxygénation jusqu'à la fin de l'expérience était examiné. Sous les conditions contrôles, le débit sanguin cérébral était similaire dans tous les groupes. Pendant l'hypoxie, le débit sanguin cérébral était augmenté dans tous les groupes mais le captopril ou la saralasin réduisaient significativement l'augmentation adaptative du débit sanguin cérébral en comparaison avec les contrôles non traités. Bien que cette étude ne s'adressait pas spécifiquement à un modèle d'ischémie cérébrale, ces résultats indiquent que chez le lapin, la libération endogène d'angiotensine II contribuerait à l'augmentation adaptative du débit sanguin cérébral quand l'apport en oxygène au cerveau est réduit de façon aiguë (Maktabi MA et coll., 1995).

Walther et coll. ont étudié la contribution respective des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> dans le modèle d'ischémie cérébrale focale par occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne chez des souris déficientes en récepteurs à l'angiotensine. Une large pénombre et une lésion d'aire plus petite étaient trouvées après une heure d'ischémie chez les souris déficientes en récepteurs AT<sub>1</sub> par rapport à leurs homologues sauvages (Walther T et coll., 2002). Par contre, chez les souris déficientes en récepteurs AT<sub>2</sub>, l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne engendrait un infarctus de taille plus grande en comparaison avec les souris sauvages. Cette différence chez les souris déficientes en récepteur AT<sub>2</sub> était liée à une

réduction marquée du débit sanguin cérébral à la fois dans la pénombre et le centre, à une heure (Mies G et coll., 2004). Avec une autre technique de mesure du débit sanguin cérébral, Iwai et coll. ont indépendamment confirmé que les souris déficientes en récepteur AT<sub>2</sub> présentaient de plus sévères déficits neurologiques que leurs homologues sauvages, en association avec une plus forte réduction du débit sanguin cérébral autour du centre ischémié (Iwai M et coll., 2004). Ensemble, ces résultats supportent un effet protecteur du récepteur AT<sub>2</sub> sur la sévérité des lésions ischémiques cérébrales s'opposant à un effet délétère de la stimulation AT<sub>1</sub>, et suggèrent que l'effet bénéfique du récepteur AT<sub>2</sub> serait médié par l'amélioration de la perfusion dans l'aire ischémiée.

Ainsi, un faisceau convergent d'arguments indique que les angiotensines possèderaient un effet protecteur dans l'ischémie cérébrale aiguë chez la gerbille, le rat, le lapin et la souris et que cet effet protecteur serait lié à une redistribution du débit sanguin cérébral vers les aires ischémiées médiée par des récepteurs non-AT<sub>1</sub> (Achard JM et coll., 2001).

De plus, la possibilité que sous ces mécanismes hémodynamiques, une stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub> amène une meilleure résistance des neurones à l'anoxie doit être prise en considération. Cette hypothèse examinée par le groupe de Unger était supportée par le fait que les neurones expriment les récepteurs à l'angiotensine, et que l'angiotensine, à travers son récepteur AT<sub>2</sub> est un facteur neurotrophique *in vitro* et *in vivo* qui promeut la différenciation neuronale et la régénération axonale suivant la lésion. Dai et coll. (Dai WJ et coll., 1999) ont démontré l'effet protecteur de l'injection intraventriculaire d'irbesartan à la suite d'une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne de rats normotendus. Du fait de l'absence de modification de la pression artérielle par l'irbesartan intracérébral, son effet protecteur était nécessairement lié à un effet pharmacologique sur des récepteurs et non vasculaires périphériques. La question restée sans réponse était de savoir si l'effet du sartan était dû à une inhibition du récepteur AT<sub>1</sub> ou à une stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub>. Ceci a été par la suite appréhendé sur le même modèle par Blume et coll (Blume A et coll., 2000). Une ischémie focale du cerveau de rats normotendus était associée avec une forte induction de l'expression de c-Fos et c-Jun dans le cortex et l'hippocampe. Des rats prétraités par du losartan intraventriculaire présentaient un déficit neurologique plus bas et une expression de c-Jun diminuée. Le traitement par le PD123177 seul n'avait pas d'effet sur la récupération de l'accident cérébral mais abolissait l'effet protecteur du losartan sur le statut neurologique et l'expression de c-Jun. Cette étude indiquait aussi que l'effet bénéfique du sartan sur l'état

neurologique résultait d'un mécanisme médié par le récepteur AT<sub>2</sub> et suggérait que la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> déclenchait des évènements moléculaires permettant d'augmenter la résistance des neurones à l'ischémie.

Il a été montré que le candesartan administré par voie périphérique traverse la barrière hémato-encéphalique efficacement et inhibe des réponses médiées par les récepteurs AT<sub>1</sub> localisés dans les régions cérébrales périventriculaires (Gohlke P et coll., 2002). Dans le modèle d'ischémie cérébrale suivie de reperfusion, un traitement chronique pendant cinq jours par une administration systémique sous cutanée de candesartan était aussi capable d'améliorer l'état neurologique et de diminuer la taille de l'infarctus et de l'œdème de l'hémisphère cérébral ipsilatéral (Groth W et coll., 2003).

Ensembles, ces études supportent l'idée que dans l'installation de l'ischémie cérébrale aiguë, les angiotensines, agissant au travers de récepteurs non-AT<sub>1</sub>, contribueraient à une protection hémodynamique et / ou directement neuronale.

Sur un modèle de ligature unilatérale transitoire de l'artère cérébrale moyenne, Li et coll. ont montré récemment une surexpression des récepteurs AT<sub>2</sub> dans les neurones des zones bordant l'infarctus 2 jours après la ligature (Li J et coll., 2005). Les récepteurs AT<sub>1</sub> étaient quant eux principalement exprimés dans les astrocytes. Le blocage des récepteurs AT<sub>2</sub> par le PD123177 abolissait les effets neuroprotecteurs du blocage des récepteurs AT<sub>1</sub> centraux par l'irbesartan sur la taille de l'infarctus et le score neurologique. Ces résultats démontraient clairement que les récepteurs AT<sub>2</sub> cérébraux exercent des effets neuroprotecteurs en réponse aux lésions neuronales induites par l'ischémie, vraisemblablement en favorisant la survie neuronale dans les aires cérébrales infarcies.

## 1.4. PERTINENCE CLINIQUE D'UN EFFET PROTECTEUR CÉRÉBRAL DÉPENDANT DE RÉCEPTEURS NON-AT<sub>1</sub> : LES LEÇONS DES GRANDS ESSAIS CLINIQUES

Abaisser la pression artérielle réduit le risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) mais dans la plupart des essais cliniques dans lesquels une réduction du risque d'AVC a été démontrée, la thérapie anti-hypertensive était basée sur les diurétiques. La question de savoir si toutes les molécules anti-hypertensives préviennent de manière égale les AVC pour une diminution de pression artérielle comparable reste largement débattue (Fournier A et Achard JM, 2004), (Lawes CM et coll., 2004).

### 1.4.1. L'essai MRC

L'étude pionnière du « Medical Research Council » en 1985 (MRC Working Party, 1985) a pointé la première que le diurétique bendroflumethiazide était 2,5 fois plus efficace que le bêta-bloqueur propranolol dans la prévention des AVC. Dans certains groupes de patients comme les fumeurs, le propranolol, en dépit de la baisse de pression artérielle, n'avait même aucun effet protecteur contre les AVC. Dans l'essai MRC chez les personnes âgées (MRC Working Party, 1992), les patients étaient stratifiés selon la pression artérielle systolique : pour une pression artérielle systolique donnée, le taux d'AVC était de manière consistante plus bas dans le groupe traité avec le diurétique. Alors, en comparaison avec les bêta-bloquants ou le placebo, les diurétiques semblaient fournir une protection spécifique contre les AVC indépendamment de leur effet de baisse de la pression artérielle. Dans une large métaanalyse incluant plus de 48000 patients, Psaty et coll. (Psaty BM et coll., 1997) ont trouvé que de fortes doses de diurétiques réduisaient le risque d'AVC de 51 % alors que les bêta-bloqueurs ne réduisaient ce risque que de 29 %, c'est-à-dire 43 % en moins. L'effet protecteur contre l'AVC obtenu de manière plus importante avec les diurétiques, qui stimulent la formation d'angiotensine, en comparaison avec les bêta-bloquants, qui eux inhibent la

libération de rénine, a amené Brown et Brown à proposer en 1985 l'hypothèse provocatrice que l'angiotensine II pourrait protéger contre les AVC (Brown MJ et Brown J, 1986). Leur hypothèse avait cependant rapidement été oubliée, alors que s'imposait le concept que le blocage du SRA par les puissants inhibiteurs de l'ECA, récemment disponibles, offrait une arme magique dans la prévention cardiovasculaire.

#### 1.4.2. L'étude CAPPP : « des résultats controversés »

Les résultats de l'étude « Captopril Prevention Project » (CAPPP) (Hanson L et coll., 1999), le premier essai de grande ampleur précisément construit pour prouver la supériorité de l'inhibition de l'ECA sur les thérapies conventionnelles, étaient par conséquent attendus avec impatience. Un total de 10985 patients avec une pression artérielle diastolique supérieure à 100 mm de Hg ont été randomisés et répartis dans les groupes soit captopril soit diurétique et bêta-bloquant. Dans l'analyse en intention de traiter, tous les paramètres comme la mortalité cardiovasculaire et les taux d'infarctus du myocarde ou d'insuffisance cardiaque congestive étaient similaires. Cependant, le risque relatif (RR) des AVC fatals et non fatals était augmenté avec le captopril (RR de 1,25 avec un intervalle de confiance à 95 % compris entre [1,01 – 1,55],  $p = 0,04$ ). Cette différence était encore plus importante dans l'analyse sous traitement (RR de 1,43, IC<sub>95%</sub> de [1,2 – 1,82],  $p = 0,0004$ ). La randomisation n'était pas centralisée, avec pour conséquence une différence significative entre les deux groupes pour l'âge, le sexe et la pression artérielle systolique. Bien que le risque relatif rapporté ait été ajusté pour ces dissimilarités, il devenait aisé pour les détracteurs de considérer cet essai comme biaisé et par conséquent de rejeter simplement le risque d'AVC supérieur de 43 % avec le captopril comparé au traitement conventionnel.

#### 1.4.3. PROGRESS et PATS : les arguments contre les inhibiteurs de l'ECA

Rapidement après, l'étude « Perindopril Protection Against Recurent Stroke Study » (PROGRESS) (PROGRESS collaborative group, 2001) cependant moins discutable, a fourni



des arguments contre l'inhibition de l'ECA dans la protection cérébrale secondaire. Chez les patients avec une maladie cérébrovasculaire, la thérapie combinée par un diurétique, l'indapamide avec un inhibiteur de l'ECA, le perindopril, réduisait le risque d'AVC de 43 %. Cependant, le perindopril seul abaissait ce risque de façon marginale (5 %) et non significative, malgré une diminution de la pression artérielle de 5 mm de Hg, suggérant que la plupart si pas tous les bénéfices observés chez les patients sous thérapie combinée étaient liés au diurétique. En fait, les résultats de l'étude « Post-stroke Antihypertensive Treatment Study » (PATS) (PATS collaborating group, 1995) supportent fortement cette conclusion. Dans une population étudiée très similaire, l'indapamide seul abaissait la pression artérielle des mêmes 5 mm de Hg comme le perindopril seul dans PROGRESS, mais réduisait le risque d'AVC de 29 %.

#### 1.4.4. ALLHAT : les diurétiques revisités

La récente étude « Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial » (ALLHATT), incluait 33357 patients soumis à trois traitements différents (ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group, 2002), et fournissait de solides arguments supportant l'hypothèse de Brown et Brown. La meilleure réduction des AVC était obtenue avec l'amlodipine et le diurétique chlorthalidone n'était pas significativement inférieur à l'amlodipine mais les patients sous lisinopril présentaient une situation significativement moins bonne.

Pour tester l'hypothèse que les médicaments antihypertensifs qui stimulent la formation d'angiotensine (diurétiques, dihydropyridines à longue durée d'action et antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub>) seraient plus efficaces dans la prévention des AVC que les médicaments qui inhibent la formation d'angiotensine (inhibiteurs de l'ECA et bêta-bloquants), il a été réalisé une méta-analyse de 34 essais cliniques prospectifs, randomisés, incluant un total de 204496 patients parmi lesquels un total de 8907 AVC étaient observés (Fournier A et Achard JM, 2004). Ces essais étaient sélectionnés parce qu'une différence de génération d'angiotensine pouvait être attendue entre les deux choix thérapeutiques sur la base de l'effet pharmacologique des médicaments.

Quand seulement les essais contrôlés par le placebo, étaient comparés avec les médicaments modifiant les taux d'angiotensine, le risque d'AVC était significativement plus élevé avec les molécules qui diminuaient les taux d'angiotensine par rapport avec celles qui augmentaient les taux circulants d'angiotensine (RR de 0,85, IC<sub>95%</sub> = [0,77 – 0,94] *versus* RR = 0,65, IC<sub>95%</sub> = [0,58 – 0,73],  $p < 0,0001$ ). Cependant, la pression artérielle était significativement plus faible avec les médicaments qui diminuaient les taux d'angiotensine (-6,9 *vs* -11,7 mm Hg pour la pression systolique,  $p = 0,005$  et -3,5 et -5,0 mm Hg pour la pression diastolique,  $p < 0,01$ ). Dans les essais comparant directement les produits diminuant les taux d'angiotensine à ceux les augmentant, le risque d'AVC était significativement augmenté avec un RR de 1,34 (IC<sub>95%</sub> = [1,11 – 1,61],  $p < 0,002$  et la pression artérielle était plus forte mais seulement de 1,47 et 0,3 mm de Hg avec les drogues qui abaissaient les taux d'angiotensine par rapport à celles qui augmentaient ce taux. Depuis que Lawes et coll. (Lawes CM et coll., 2004) ont montré qu'une différence de 10 mm de Hg de la pression artérielle systolique correspondait à une différence de 31 % de risque d'AVC dans les essais aussi bien que dans les méta analyses d'études de cohorte, il semble manifeste que le risque d'AVC plus élevé de 34 % ne peut pas être expliqué par la modique différence de pression artérielle et supporte la pertinence clinique de l'effet cérébroprotecteur de la stimulation de la formation d'angiotensine II mise en évidence dans les modèles expérimentaux. Même si la baisse de pression artérielle reste le déterminant le plus puissant dans la prévention des AVC, les drogues qui augmentent la formation d'angiotensines apparaissent comme fournissant une meilleure protection contre les AVC que les molécules qui diminuent leur formation à baisse de pression artérielle comparable.

#### 1.4.5. HOPE et PROGRESS : le « Bon et le Mauvais »

Il a bien été reconnu que les bases expérimentales pour défendre les bénéfices du blocage du SRA au-delà du seul effet de baisse de la pression artérielle étaient convaincantes, du fait que l'angiotensine était impliquée dans des processus relevant de la physiopathologie des perturbations structurales et fonctionnelles du système cardiovasculaire mais les bénéfices de l'inhibition de l'ECA semblent être particulièrement impliqués dans la protection contre la maladie ischémique cardiaque. La plupart des grands essais de prévention primaire ont randomisé des patients hypertendus avec un relativement faible risque de maladie cardiaque, à

l'exception notable de HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators, 2000). L'étude HOPE, dans laquelle les patients étaient inclus sur la base du risque cardiaque et non de la pression artérielle, a clairement démontré le bénéfice de l'inhibition de l'ECA. Comparé au placebo, le ramipril abaissait le risque d'une issue primaire combinée de 25 %, d'un infarctus du myocarde de 22 % et d'AVC de 33 %. Que le bénéfice cardiovasculaire soit meilleur ou pas que celui attribuable à la baisse de pression artérielle (3,4 mm de Hg en pression artérielle systolique), comme le concluent les investigateurs de l'étude, a soulevé un interminable débat. Il suffit de dire que le ramipril diminue le risque d'AVC de 33 % chez les patients à haut risque cardiaque alors que par contre le perindopril dans PROGRESS, en dépit d'un effet de baisse de la pression artérielle deux fois plus prononcé, échouait à réduire significativement le risque d'AVC chez les patients avec une maladie cérébrovasculaire. Partager l'HTA comme facteur de risque commun ne peut pas faire de la maladie cardiaque ischémique et de l'AVC une seule entité reposant sur la même pathogénie. A la différence de l'hypertension non compliquée où les AVC sont souvent lacunaires et étroitement liés à une maladie des petites artères cérébrales, les AVC associés à une maladie du cœur et des gros vaisseaux sont le plus souvent emboliques ou liés à la déstabilisation de la plaque d'athérome. Klungel et coll. ont montré que parmi 1237 hypertendus sans antécédents cardiovasculaires traités en monothérapie, le risque relatif d'AVC ischémique était plus de deux fois supérieur parmi les utilisateurs d'antagonistes calciques, de bêta-bloquants ou d'inhibiteurs de l'ECA, que parmi les utilisateurs de diurétiques (Klungel OH et coll., 2001). Chez les patients avec une maladie cardiovasculaire, les diurétiques conféraient encore un risque d'AVC plus faible que les autres médicaments mais la différence était considérablement plus faible. Les conclusions de l'étude HOPE, sur laquelle la revendication de la supériorité de l'inhibition de l'ECA sur les autres produits est fondée, sont seulement valides dans la population spécifique des patients avec un fort risque cardiaque. Elles ne diminuent certainement pas le poids de l'ensemble des preuves cliniques démontrant que chez les patients hypertendus non compliqués, les diurétiques fournissent une protection contre les AVC particulièrement efficace, ni l'ensemble de celles expérimentales démontrant un effet positif protecteur des angiotensines dans l'ischémie cérébrale dépendant de récepteurs non-AT<sub>1</sub>.

#### 1.4.6. Le plateau de la mortalité par accident vasculaire cérébral

La mortalité par tranches d'âge des AVC a fortement chuté durant les années 70 mais le taux de décroissance s'est progressivement ralenti dans les années 80 et semblait atteindre un plateau au cours des années 90 aux Etats-Unis (Howard G et coll., 2001) et en Europe de l'ouest (Sarti C et coll., 2001). Sur la même période, d'un côté le contrôle de la pression artérielle était de mieux en mieux maîtrisé, passant de 10 à 30 % (Lenfant C et Roccella EJ, 1999) et d'un autre côté, étrangement, la mortalité par tranche d'âge de maladie cardiaque ischémique continuait de décroître, comme le prévoyait le meilleur contrôle de la pression artérielle (Cooper R et coll., 2000). Comme la thérapie hypertensive dans les années 70 était essentiellement basée sur les diurétiques, et entre les années 80 et 90, le rapport entre diurétiques et les produits qui suppriment le SRA (bêta-bloquants, et inhibiteurs de l'ECA) diminuait de plus de cinq fois (Fournier A et coll., 2002b), on peut penser que le déclin progressif de l'utilisation des diurétiques ait pu contribuer à l'échec du contrôle des AVC.

#### 1.4.7. Sartans et protection cérébrale : les promesses de LIFE, MOSES et ACCESS

Les arguments expérimentaux et cliniques développés précédemment supportent le concept d'une protection cérébrale spécifiquement médiée par des récepteurs non-AT<sub>1</sub>. L'idée que les antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> pourraient être particulièrement bien adaptés à la prévention des AVC est attrayante. Le blocage des récepteurs AT<sub>1</sub> par les sartans pourrait conférer la même protection cardiaque que l'inhibition de l'ECA, en même temps qu'augmentant la stimulation des récepteurs non-AT<sub>1</sub>, spécialement s'ils sont potentialisés par les diurétiques, et donc optimiser la prévention des AVC. Contrairement aux résultats obtenus avec les inhibiteurs de l'ECA, qui ont, au mieux, échoué à démontrer une réduction du risque d'AVC dans les essais en face à face avec des comparateurs actifs, le losartan dans l'essai LIFE était supérieur au bêta-bloqueur atenolol (Dahlof B et coll., 2002). Dans cet essai randomisé en double aveugle, avec des groupes parallèles, 9193 patients âgés de 55 à 80 ans avec une hypertension essentielle, étaient suivis pendant au moins 4 ans. Dans le même temps, la pression artérielle baissait de 30,2 / 16,6 et 29,1 / 16,8 mm de Hg respectivement dans les groupes losartan et atenolol et le risque d'AVC fatal et non fatal était 25 % plus

faible avec le losartan (RR de 0,75, IC<sub>95%</sub> = [0,63 – 0,89], p = 0,001). Du fait de la différence très significative du résultat obtenu dans les deux bras, comparant deux substances actives produisant une baisse similaire de la pression artérielle systolique et diastolique, toutes les substances antihypertensives ne sont probablement pas équivalentes et diminuer la pression artérielle est certes nécessaire mais pas suffisant pour optimiser la prévention contre les AVC. L'essai LIFE établit que chez les patients hypertendus essentiels avec une hypertrophie ventriculaire gauche, les sartans partagent avec les diurétiques et les dihydropyridines, une supériorité claire et nette sur les bêta-bloqueurs pour réduire le risque d'AVC.

L'étude « Morbidity and Mortality after Stroke, Eprosartan compared with Nitrendipine for Secondary prevention » (MOSES), avait pour but de comparer un AA II, l'eprosartan, et un inhibiteur calcique, la nitrendipine, sur les événements cérébrovasculaires en prévention secondaire. Mille quatre cent cinq patients présentant un antécédent d'AVC dans les 24 derniers mois étaient randomisés. Pour une baisse de pression artérielle comparable, 102 événements cérébrovasculaires étaient recensés chez les patients traités par l'eprosartan contre 134 chez ceux traités par nitrendipine (RR = 0,75, IC<sub>95%</sub> = [0,58 – 0,97], p = 0,03). Le sartan apparaît donc comme étant un meilleur protecteur cérébral que l'inhibiteur calcique chez les patients à haut risque cérébrovasculaire (Schrader J et coll., 2005).

La promesse des sartans est en plus supportée par la récente étude pilote « Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors » (ACCESS) (Schrader J et coll., 2003) mise en place pour évaluer l'intérêt bénéfique d'une réduction modeste de la pression artérielle dans le traitement précoce des AVC. Cinq cents patients ont été recrutés pour cette étude de phase II prospective, en double bras, multicentrique, *versus* placebo. Les patients étaient randomisés pour recevoir le candesartan en commençant au jour 1 (avec une médiane de 30 heures après l'AVC) ou le placebo du jour 1 jusqu'au jour 6 et commençant le candesartan à partir du jour 7. Cet essai de survie a été stoppé prématurément alors que 342 patients avaient été randomisés du fait de l'importante inégalité entre les résultats des deux bras. La mortalité cumulative au bout de 12 mois et le nombre d'événements vasculaires différaient significativement en faveur du groupe du candesartan cilexetil (RR de 0,475, IC<sub>95%</sub> = [0,252 – 0,895]). Les données démographiques, les facteurs de risque cardiovasculaire et la pression artérielle (à l'admission, au début de l'étude, et durant la totalité de la période d'étude), n'étaient pas significativement différents entre les deux groupes tout comme la dose de candesartan dans les deux groupes après le 7<sup>ème</sup> jour. Alors, le bénéfice significatif ne

pouvait être qu'exclusivement attribué à l'administration plus précoce du candesartan, immédiatement dans la période après l'AVC. Comme souligné par les investigateurs de ACCESS, l'extériorisation bénéfique avait un délai de 3 mois et était due à une meilleure protection des évènements cardiaques plus que de l'AVC, ne constituant pas une explication physiopathologique convaincante. Une meilleure prévention du remodelage vasculaire résultant en un risque cardiaque diminué était proposée par les auteurs. Il est cependant difficile de concevoir que la seule différence de durée de six jours de traitement puisse résulter dans de si importants changements de remodelage vasculaire qui pourraient expliquer la réduction de 52 % des évènements cardiovasculaires après 3 à 12 mois. Clairement, l'administration de sartan dans la phase aiguë de l'ischémie cérébrale, avait prévenu certains effets délétères responsables de risques cardiovasculaires augmentés à long terme. Il est possible que l'administration de candesartan pendant la phase aiguë de l'AVC ait conféré une protection critique des centres cérébraux sympathiques pour lesquels l'altération est connue pour favoriser des complications cardiaques. L'inflammation et les processus d'apoptose résultent dans une perte neuronale progressive se manifestant dans l'aire de pénombre des semaines après un évènement ischémique. En déclenchant des mécanismes anti-ischémiques neuronaux hémodynamiques et non hémodynamiques, centraux, médiés par des récepteurs non-AT<sub>1</sub>, les sartans pourraient protéger les centres sympathiques centraux, expliquant à la fois la réduction du risque cardiaque et son expression clinique retardée. Quel que soit le mécanisme impliqué, le bénéfice clinique considérable observé dans cette étude illustre l'intérêt potentiel de l'utilisation des sartans dans la maladie cérébrovasculaire.

## 1.5. CONCLUSION

En guise d'introduction d'une revue sur le SRA tissulaire, Dzau (Dzau VJ, 2001) citait la phrase suivante de Thomas Kuhn :

« Scientific discoveries are inaugurated by a growing sense that an existing paradigm has ceased to function adequately in the exploration of an aspect of nature to which the paradigm itself had previously led the way » (The structure of scientific revolution, 1970).

Il apparaît de plus en plus clairement que le concept actuel qui considère l'activation du SRA comme le facteur de déséquilibre central responsable à long terme d'effets délétères sur le système cardiovasculaire et des dommages des organes cibles, est un point de vue trop réducteur qui ne permet plus d'expliquer de façon adéquate un certain nombre d'observations expérimentales et cliniques récentes. Une conséquence directe de la compréhension grandissante de la complexité dynamique du SRA est que sa manipulation pharmacologique doit être approchée avec une vue moins conservatrice. Malgré le bénéfice indiscutable des inhibiteurs de l'ECA chez les patients cardiaques et hypertendus avec une maladie vasculaire inflammatoire athérosclérotique progressant activement, il est aussi clair que cela n'est pas extrapolable à tous les patients hypertendus. Au-delà de leur effet sur la pression artérielle, les antihypertenseurs qui réduisent la formation d'angiotensine pourraient être moins bénéfiques chez certains patients que ceux qui stimulent la formation des angiotensines. L'espoir d'augmenter la protection cardiovasculaire par les bloqueurs des récepteurs AT<sub>1</sub> à la place des inhibiteurs de l'ECA ou par combinaison de deux drogues à doses maximales chez les patients à haut risque cardiaque (Pfeffer MA et coll., 2003) a maintenant disparu après les résultats de l'essai « Valsartan in acute myocardial infarction trial » (VALIANT). A l'inverse, baisser la pression artérielle tout en stimulant une protection cérébrale spécifique médiée par des récepteurs non-AT<sub>1</sub> par l'utilisation combinée de sartans et de diurétiques, offre la perspective d'une meilleure protection contre les AVC avec une protection cardiaque comparable. Cela demanderait un essai clinique comparant face à face les sartans et les inhibiteurs de l'ECA chez des patients à haut risque cardiovasculaire dans le but d'obtenir une preuve directe, justifiant l'usage du blocage des récepteurs AT<sub>1</sub> pour optimiser la prévention

des complications les plus dévastatrices de l'hypertension (Fournier A et coll., 2004a), (Fournier A et coll., 2004b), (Fournier A et coll., 2002a), (Brunner HR et Gavras H, 2002).



## **2. ETUDES RÉALISÉES**

## 2.1. INTRODUCTION

Cette étude des mécanismes impliqués dans l'effet protecteur cérébrovasculaire du système rénine – angiotensine a été divisée en deux parties.

Une première partie est composée de deux études s'attachant à montrer l'effet des angiotensines sur des modèles expérimentaux d'AVC *in vivo*. Le premier modèle consiste en la réalisation d'un AVC ischémique embolique chez des rats par injection de microsphères calibrées. Ces rats ont ensuite été soumis à un traitement par des doses pharmacologiques d'angiotensine IV ou à une modulation des taux physiologiques des angiotensines circulantes par l'intermédiaire d'un prétraitement par un antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub> ou un IEC. Le deuxième modèle étudié a été réalisé sur la gerbille où l'AVC ischémique était induit par la ligature complète et brutale d'une carotide. L'effet d'un traitement combiné par érythropoïétine (EPO) et un antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub> a été étudié à la fois sur la survie et les fonctions cognitives à long terme.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes attachés à comprendre par quels mécanismes l'angiotensine pouvait induire un effet protecteur cérébral. Une troisième étude, employant un modèle d'artère basilaire de rat isolée *ex vivo* et perfusée, a exploré le mode d'action de l'angiotensine IV sur les artères cérébrales. Enfin, les mécanismes moléculaires et métaboliques en jeu ont été étudiés dans la quatrième étude, utilisant notamment des modèles d'incubation d'artère basilaire de rat et de cellules musculaires lisses aortiques en culture primaire.

## 2.2. PREMIÈRE PARTIE : MISE EN ÉVIDENCE DES EFFETS CEREBROPROTECTEURS DE L'ANGIOTENSINE IV

### 2.2.1. Première étude : Effet protecteur de l'angiotensine IV dans l'accident vasculaire cérébral ischémique expérimental médié par les récepteurs AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub>

Il est maintenant bien démontré que l'angiotensine II a un effet protecteur direct, anti-apoptotique sur les neurones ischémiques médié par le récepteur AT<sub>2</sub>. Cependant certaines données suggèrent que l'angiotensine II contribue aussi à la cérébroprotection par des mécanismes hémodynamiques intracérébraux. Nous avons examiné l'hypothèse qu'un tel effet hémodynamique soit médié par le métabolite de l'angiotensine II, l'angiotensine IV, par l'intermédiaire de son « récepteur » AT<sub>4</sub>.

Voici le résumé de cette étude :

L'angiotensine II possède un effet direct protecteur dans l'AVC ischémique médié par des récepteurs AT<sub>2</sub> neuronaux. L'angiotensine IV, agissant au travers de son récepteur spécifique AT<sub>4</sub>, augmente le débit sanguin cérébral.

**Méthodes :** Pour examiner si l'angiotensine IV contribuait à l'effet protecteur des angiotensines, nous avons développé un modèle d'AVC ischémique induit par l'injection intracarotidienne de microsphères calibrées (50 µm) sur des rats Sprague-Dawley.

**Résultats :** L'injection intracérébrale de fortes doses d'angiotensine IV (1 nmol) augmentait la survie (90 % vs 47 % ; p < 0,001) et réduisait le déficit neurologique (p < 0,0001) et la taille d'infarctus cérébral (185 ± 19 vs 432 ± 26 mm<sup>3</sup> ; p < 0,0001) à 24 heures. L'antagoniste des récepteurs AT<sub>4</sub>, le divalinal, ou le prétraitement avec le L-NAME

abolissaient tous les deux complètement l'effet protecteur de l'angiotensine IV. Des artériographies cérébrales séquentielles mettaient en évidence que l'angiotensine IV induisait une redistribution du flux sanguin vers les aires ischémiées en quelques minutes. La stimulation de production endogène des angiotensines cérébrales par un prétraitement par le candesartan pendant cinq jours diminuait la mortalité, le déficit neurologique et la taille d'infarctus. A la fois l'antagoniste des récepteurs AT<sub>2</sub>, le PD123319 ou le divalinal abolissaient partiellement l'effet protecteur du blocage des récepteurs AT<sub>1</sub>. L'inhibition de la production d'angiotensine par un prétraitement de 24 heures par le lisinopril, ou le blocage combiné des récepteurs AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub> sur des rats prétraités par cinq jours de candesartan avaient tous deux un effet délétère significatif et similaire.

**Conclusion** : Des doses pharmacologiques d'angiotensine IV sont protectrices contre l'ischémie cérébrale aiguë en recrutant un mécanisme hémodynamique intracérébral NO-dépendant médié par les récepteurs AT<sub>4</sub>. Le blocage des récepteurs pendant 5 jours induisait une production endogène d'angiotensines suffisante pour engager une protection contre l'ischémie cérébrale aiguë médiée à la fois par les récepteurs AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub>.

**Protective effect of angiotensin IV in experimental ischemic stroke mediated by AT<sub>2</sub> and AT<sub>4</sub> receptors**

Sébastien Faure, PharmD, PhD student<sup>1</sup>, René Chapot, MD, PhD<sup>2</sup>, Dominique Tallet, PhD<sup>1</sup>, James Javellaud, PhD<sup>1</sup>, Nicole Oudart, MD, PhD<sup>1</sup>, Jean-Michel Achard, MD, PhD<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Physiologie et Pharmacologie Vasculaire et Rénale, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Limoges, France - <sup>2</sup> Department of Radiology, University Hospital, Limoges

Corresponding author :

Prof Jean-Michel Achard, MD, PhD

Department of Physiology

Faculté de Médecine de Limoges

2 rue du Dr Marcland

87000 Limoges, France

PHONE : (33) 555 43 58 75

FAX : (33) 555 43 58 77

Email : jean-michel.achard@unilim.fr

## Abstract

**Background and Purpose :** The protective role of angiotensin receptor subtypes AT<sub>2</sub> and AT<sub>4</sub> was investigated in a model of embolic stroke induced by carotidian injection of calibrated microspheres (50 μm) in Sprague-Dawley rats.

**Methods and Results :** Intracarotidian injection of angiotensin IV (Ang-IV) (10<sup>-7</sup>M) decreased mortality and reduced neurological deficit and cerebral infarct size at 24 hours. The AT<sub>4</sub> antagonist divalinal, or pretreatment with L-NAME both completely abolished the protective effect of Ang-IV. Sequential cerebral arteriographies evidenced that Ang-IV induced a redistribution of blood flow to the ischemic areas within minutes. Inhibition of endogenous angiotensins production by pretreatment for 24 hours significantly increased mortality, neurological deficit and infarct volume whereas candesartan for 24 hours reduced blood pressure to the same extent but had no deleterious effect. Sustained stimulation of endogenous angiotensins production by pretreatment with candesartan for five days decreased mortality, neurological deficit and infarct size. Both the AT<sub>2</sub> receptor antagonist PD123319 or divalinal partially abolished the protective effect of 5 days AT<sub>1</sub> blockade. Combined blockade of AT<sub>2</sub> and AT<sub>4</sub> completely reversed the protective effect of 5 days candesartan and increased mortality, neurological deficit and infarct volume to the same extent as lisinopril pretreatment.

**Conclusion :** Pharmacological doses of Ang-IV are protective against acute cerebral ischemia by triggering an AT<sub>4</sub>-mediated, NO-dependent intracerebral hemodynamic mechanism. AT<sub>1</sub> blockade for 5 days induces sufficient endogenous angiotensins production to engage additive AT<sub>2</sub>- and AT<sub>4</sub>-mediated cerebral protection against acute ischemia.

### 2.2.2. **Deuxième étude** : Effets protecteurs synergiques de l'érythropoïétine et de l'olmesartan sur la survie et les altérations de la mémoire suite à un accident vasculaire cérébral chez la gerbille

Il n'existe à ce jour malgré les investissements colossaux de l'industrie aucun traitement qui ait fait ses preuves pour améliorer le pronostic de l'AVC ischémique (en dehors de la fibrinolyse qui n'est possible). Nous avons étudié le potentiel des sartans dans l'AVC, ouvert par nos résultats précédents. Nous avons voulu cette étude la plus « préclinique » possible, et l'avons construite sur la base des réflexions suivantes :

Nous avons trouvé chez le rat que le traitement par un sartan recrute une composante Ang-IV-dépendante, alors qu'il est par ailleurs établi dans des modèles expérimentaux animaux que l'Ang-IV, par le biais de « récepteurs » AT<sub>4</sub> neuronaux dans l'hippocampe, a un effet stimulant sur les processus cognitifs et la mémorisation. Ceci nous a conduit à postuler qu'un traitement par un sartan à la phase aiguë de l'AVC pourrait apporter un bénéfice sur les séquelles mnésiques, principale cause de dépendance chez les survivants. L'évaluation des capacités de mémorisation de travail et d'acquisition de mémoire spatiale à un mois a donc été choisie comme « end-point » principal.

L'absence de bénéfice dans les essais cliniques des nombreuses molécules évaluées en raison de leurs propriétés cérébroprotectrices établies dans des modèles expérimentaux invite à évaluer l'intérêt d'une stratégie de multithérapie (une approche qui a fait ses preuves dans le traitement des cancers, du SIDA, ...). L'érythropoïétine (EPO) représente à l'heure actuelle la molécule la plus prometteuse pour le traitement de l'AVC à la phase aiguë. Elle confère une protection spectaculaire dans les modèles expérimentaux animaux, avec une fenêtre thérapeutique de plusieurs heures. Comme pour les sartans, le recul de l'utilisation chez l'homme (dans d'autres indications) est de plus de dix ans, avec des milliers de patients traités. Une étude pilote réalisée chez l'homme dans l'AVC a montré l'innocuité et suggère un bénéfice potentiel.

Nous avons donc retenu le principe de l'évaluation du potentiel de l'association EPO / sartan à la phase aiguë de l'AVC ischémique avec un schéma d'administration des

médicaments compatibles avec les délais incompressibles d'une utilisation en clinique. L'EPO a été administrée 2 heures et 48 heures après l'AVC. Le traitement par le sartan (ou par un IEC à dose isohypotensive) a été débuté 36 heures après l'AVC.

Voici le résumé de cette étude :

**Objectifs :** Une étude clinique pilote suggère que les propriétés protectrices de l'érythropoïétine (EPO) démontrées dans des modèles expérimentaux d'AVC sont transférables à l'Homme. Par ailleurs, les sartans stimulent la production d'angiotensines, et recrutent des mécanismes protecteurs médiés i) par le récepteur AT<sub>2</sub> de l'angiotensine II, et ii) par l'angiotensine IV dont les effets bénéfiques sur les fonctions cognitives et la mémoire sont établis. Nous avons évalué le potentiel d'un traitement combiné par l'EPO et l'olmesartan dans le modèle d'AVC ischémique chez la gerbille.

**Méthodes :** L'EPO (5000 UI / kg, IP) était administrée 2 et 48 heures après la ligature d'une carotide chez la gerbille (n = 50 par groupe). A 36 heures, l'olmesartan (10 mg / kg), le ramipril (2,5 mg / kg) ou rien, étaient rajoutés à l'eau de boisson des survivants traités par l'EPO. Les courbes de survie de Kaplan-Meier à long terme (1 mois) ont été établies, et les survivants à J30 ont été soumis à des tests fonctionnels de mémorisation immédiate (Object Recognition Test (ORT)) et spatiale (Morris Water Maze (MWM)).

**Résultats :** L'EPO augmentait significativement la survie à J30 (38 % *versus* 14 % pour les contrôles, p = 0,016). L'olmesartan avait un effet protecteur additif, alors que le ramipril avait un effet opposé pour une baisse de pression artérielle comparable (survie 56 % *versus* 24 %, p = 0,007, EPO / olmesartan *versus* EPO / ramipril.). Les survivants traités par l'EPO présentaient une altération des performances à la fois pour les tests ORT (p = 0,0001) et MWM (p < 0,0001) comparés aux gerbilles normales sans AVC. Le traitement combiné par l'EPO et l'olmesartan restaurait totalement la réponse normale aux tests de mémoire immédiate et spatiale alors que le ramipril n'avait pas d'effet protecteur.

**Conclusion :** L'association olmesartan / EPO a un effet protecteur synergique sur la survie indépendant de la pression artérielle dans le modèle d'AVC ischémique chez la



gerbille. L'introduction de l'olmesartan à J2 prévient complètement les séquelles cognitives à un mois de la mémoire de travail et de la mémoire spatiale.

**Synergistic protective effects of erythropoietin and olmesartan on ischemic stroke survival and post-stroke memory dysfunctions in the gerbil.**

Sébastien Faure<sup>1</sup>, PharmD, PhD student; Nicole Oudart<sup>1</sup>, MD, PhD ; James Javellaud<sup>1</sup>, PhD ; Albert Fournier<sup>2</sup>, MD ; Jean-Michel Achard<sup>1</sup>, MD, PhD.

<sup>1</sup>Physiologie et Pharmacologie Vasculaire et Rénale (EA 3841), Facultés de Médecine et de Pharmacie, Limoges, France – <sup>2</sup>Médecine Interne, Centre Hospitalo-Universitaire d'Amiens, France.

Corresponding author:

Prof Jean-Michel Achard, MD, PhD

Department of Physiology

Faculté de Médecine

2 rue du Dr Marcland

87000 Limoges, France

Phone : (33) 555 43 58 75

Fax : (33) 555 43 58 77

Email : jean-michel.achard@unilim.fr

## Abstract

**Background and Purpose:** Erythropoietin (EPO) is markedly protective in experimental stroke and emerges as promising in a pilot clinical study. Stimulation of angiotensins production by AT<sub>1</sub> blockade promotes AT<sub>2</sub>-dependent neuroprotective effect, whereas angiotensin IV has facilitating effects on cognitive function and memory.

**Methods:** the synergic potential of EPO and olmesartan combination therapy was examined in the single carotid ligation stroke model in the gerbil. EPO was administered (IP, 5000 UI.kg<sup>-1</sup>) 2 and 48 hours after the stroke. At 36 hours, olmesartan (10 mg.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>), ramipril (2.5 mg.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>) or nothing was added to the tap water of EPO-treated survivors. Long term (1 month) Kaplan-Meyer survival curves were recorded, and survivors were submitted at day 30 to immediate (Object Recognition Test (ORT)) and spatial (Morris Water Maze (MWM)) memory function tests.

**Results:** EPO significantly increased survival at day 30 (38 vs 14 % for controls,  $p = 0.016$ ). For a comparable blood pressure lowering effect, olmesartan further increased survival rate to 56 % whereas ramipril decreased it to 24 % ( $p = 0.007$ , EPO / olmesartan vs EPO / ramipril). EPO-treated survivors had markedly altered performances in both ORT ( $p = 0.0001$ ) and MWM ( $p < 0.0001$ ) tests compared to normal gerbils. Combined therapy with ramipril further deteriorated immediate and spatial memory, whereas EPO / olmesartan treatment fully restored normal response to the memory tests.

**Conclusion:** Treatment with olmesartan combined to early EPO therapy has a BP independent additive protective effect on stroke survival, and completely prevents long term memory dysfunction.

## 2.3. DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE DES MÉCANISMES DE PROTECTION DE L'ANGIOTENSINE IV

### 2.3.1. Troisième étude : Effet vasoconstricteur de l'angiotensine IV sur l'artère basilaire de rat indépendant des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>

Les mécanismes des effets vasomoteurs de l'angiotensine IV sont très mal compris. Alors qu'*in vivo*, elle induit une vasodilatation cérébrale et rénale, les études sur vaisseaux isolés (mésentérique, fémorale, aorte) montrent un effet vasoconstricteur, dont la pertinence physiologique est discutable. Alors que l'angiotensine II n'a pas d'affinité pour le site de liaison AT<sub>4</sub>, l'angiotensine IV se lie aux récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> avec une affinité de l'ordre de 2 log inférieure à celle de l'angiotensine II. Toutes les études rapportant un effet constricteur de l'angiotensine IV ont utilisé des concentrations micromolaires, et l'effet constricteur était inhibé par un bloqueur des récepteurs AT<sub>1</sub>. Le travail le plus convaincant vient du groupe de Bernard Lévy et montre sur l'artère mésentérique de rat que l'angiotensine IV (10<sup>-6</sup> M) est vasoconstrictrice *via* son récepteur AT<sub>1</sub>, vasodilatatrice *via* son récepteur AT<sub>2</sub> en présence d'un bloqueur AT<sub>1</sub>, et qu'un effet vasoconstricteur peut être démasqué quand les deux récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont simultanément bloqués. Nous avons travaillé sur l'artère basilaire de rat isolée perfusée. Dans cette préparation, l'angiotensine II n'a pas d'effet, ni seule ni en présence de candesartan ou de PD123319. L'absence de réponse fonctionnelle à l'angiotensine II offrait ainsi un modèle particulièrement intéressant pour étudier les effets propres de l'angiotensine IV. Alors que la RT-PCR met en évidence la présence des ARN<sub>m</sub> des récepteurs AT<sub>1A</sub> et B, AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub> dans ces artères, l'angiotensine IV n'avait pas d'effet non plus. Puisque nous attendions un effet vasodilatateur de l'angiotensine IV sur les vaisseaux du lit cérébral, nous avons tenté de faciliter sa mise en évidence en précontractant les artères par du KCl et avons eu la surprise d'observer l'apparition d'une réponse contractile, dose-dépendante, AT<sub>4</sub> spécifique, avec une CE<sub>50</sub> compatible avec une pertinence physiologique. L'analyse de cet effet constricteur nous a conduit à la conclusion que l'effet constricteur de l'angiotensine IV était indirect, et médié par l'endothéline-1.

Voici le résumé de cette étude, qui est acceptée pour publication dans J Vasc Res :

**Méthodes :** L'effet de l'angiotensine IV (Ang-IV) a été étudié sur des artères basillaires (AB) de rat fraîchement isolées, perfusées à un débit constant.

**Résultats :** L'Ang-IV n'avait aucun effet sur la pression de perfusion basale des AB, mais induisait une contraction marquée concentration-dépendante sur les vaisseaux précontractés par une solution de 50 mM de KCl ( $CE_{50} = 44,5 \pm 16,0$  nM). Cette contraction n'était pas affectée par l'antagoniste des récepteurs  $AT_1$ , le candesartan ou le bloqueur des récepteurs  $AT_2$ , le PD123319, mais était inhibé de façon dose-dépendante par deux antagonistes différents spécifiques des récepteurs  $AT_4$ , la  $Nle^1$ -Leu<sup>3</sup>Y(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)<sup>3-4</sup>-Ang-IV et le divalinal-Ang-IV. La suppression de l'endothélium abolissait la réponse contractile à l'Ang-IV, et le prétraitement des artères avec un endothélium intact par l'antagoniste des récepteurs  $ET_A / ET_B$ , le PD142893 bloquait de la même façon la contraction induite par l'Ang-IV. Sur des AB prétraitées par de l'ET-1 (0,01 μM), l'Ang-IV induisait une contraction concentration-dépendante, déplacée vers la gauche par rapport à celle observée avec la précontraction au KCl, non affectée par le candesartan mais totalement abolie par la  $Nle^1$ -Leu<sup>3</sup>Y(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)<sup>3-4</sup>-AngIV. L'effet contractile de l'Ang-IV n'était pas affecté par la suppression de l'endothélium en présence d'ET-1 exogène, en contraste avec les AB prétraitées par le KCl, suggérant que l'endothélium était obligatoire pour démasquer l'effet de l'Ang-IV comme une source de libération d'ET-1 endogène.

**Conclusion :** Pris ensemble, ces résultats indiquent que de faibles (nM) concentrations d'Ang-IV entraînent un effet vasoconstricteur médié par son site de fixation spécifique  $AT_4$  sur l'AB de rat, et que cet effet vasoactif est indirect et implique les endothélines endogènes.

**Vasoconstrictive effect of angiotensin IV in isolated rat basilar artery independent of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors**

Sébastien Faure, James Javellaud, Jean-Michel Achard and Nicole Oudart

Physiologie et Pharmacologie Vasculaire et Rénale, EA 3841, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Limoges, France.

Running title: Effect of Angiotensin IV on isolated rat basilar artery

Acknowledgment: this research was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale and Conseil Régional du Limousin

Corresponding author:

Pr Nicole Oudart

Department of Physiology and Pharmacology (EA3841)

Faculté de Pharmacie; Université de Limoges

2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges (France)

Phone: +33 555 43 58 83

Fax: +33 555 43 59 12

e-mail: [nicole.oudart@unilim.fr](mailto:nicole.oudart@unilim.fr)

## Abstract

The effect of angiotensin IV (Ang-IV) was studied in freshly isolated rat basilar arteries (BA) perfused at a constant rate. Ang-IV had no effect on basal BA perfusion pressure, but induced a marked concentration-dependent contraction in vessels precontracted by a 50 mM KCl solution ( $EC_{50} = 44.5 \pm 16$  nM). This contraction was unaffected by the angiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonist candesartan or the angiotensin AT<sub>2</sub> receptor blocker PD123319, but was markedly inhibited by two different specific AT<sub>4</sub> receptor antagonists, Nle<sup>1</sup>-Leu<sup>3</sup>Y(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)<sup>3-4</sup>-AngIV and divalinal-Ang-IV. Removal of the endothelium abolished the contractile response to Ang-IV, and pretreatment of endothelium-intact arteries with the endothelin ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors inhibitor PD142893 blocked to the same extent the Ang-IV induced contraction. In BA pre-treated with ET-1 (0.01 μM), Ang-IV induced a concentration-dependent contraction, shifted to the left compared with that observed with KCl precontraction, unaffected by candesartan but completely abolished by Nle<sup>1</sup>-Leu<sup>3</sup>Y(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)<sup>3-4</sup>-AngIV. The contractile effect of Ang-IV was not affected by endothelium removal in the presence of exogenous ET-1, in contrast to KCl pretreated BA, suggesting that endothelium was mandatory to unmask the effect of Ang-IV as a source for endogenous ET-1 release. Taken together these results indicate that low (nM) concentrations of Ang-IV exert a constrictive effect mediated by its specific binding site AT<sub>4</sub> in the rat BA, and that this vasoactive effect is indirect and involves endogenous endothelin(s).

**Key words:** angiotensin IV, angiotensin IV antagonists, AT<sub>4</sub> receptors, perfused basilar artery.

### 2.3.2. **Quatrième étude** : L'angiotensine IV inhibe le catabolisme de l'endothéline-1 médié par l'Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP) induit par l'endothéline-1 sur l'artère basilaire de rat

(non encore soumise)

#### 2.3.2.1. Introduction

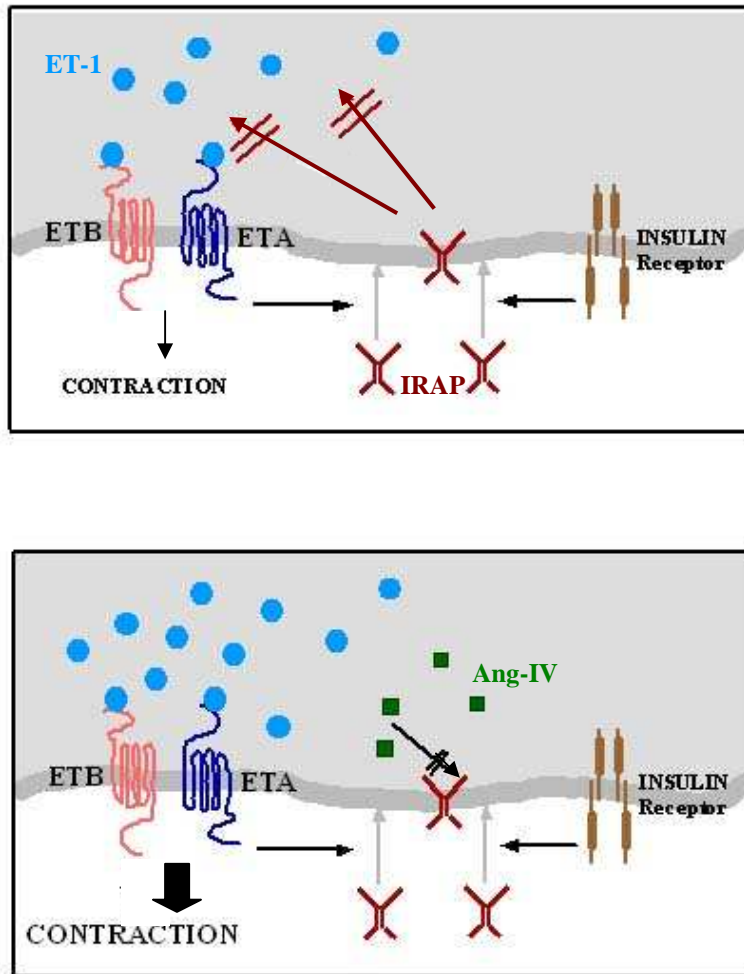
La nature moléculaire du site de liaison spécifique de l'angiotensine IV (Ang-IV), initialement dénommé « récepteur » AT<sub>4</sub> a été identifiée récemment. Il s'agit d'une enzyme, Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP) (Albiston AL et coll., 2001), initialement caractérisée dans les tissus sensibles à l'insuline (adipocyte et muscle strié) (Keller SR et coll., 1995). IRAP est contenu dans des vésicules cytoplasmiques avec le transporteur de glucose GLUT-4 (Keller SR et coll., 1995) ; la stimulation par l'insuline induit leur expression à la membrane (Keller SR, 2003), (Wu-Wong JR et coll., 1999). Insérée dans la membrane, IRAP présente un fragment cytosolique, et un fragment extracellulaire qui contient le site catalytique de l'activité leucine-peptidase zinc-dépendante (Thomas WG et Mendelsohn FA, 2003). Par ailleurs, il est apparu que IRAP et P-LAP, une leucine aminopeptidase placentaire, sont une seule et même entité (Matsumoto H et coll., 2001). Dans le placenta, P-LAP s'exprime à la membrane cellulaire en réponse à l'ocytocine. Les substrats *in vivo* d'IRAP / P-LAP ne sont pas connus, mais *in vitro* elle clive la vasopressine, l'ocytocine, les met-enkephalines, ... (Matsumoto H et coll., 2001), (Rogi T et coll., 1996), (Lew RA et coll., 2003). L'Ang-IV se fixe sur la partie extracellulaire d'IRAP et inhibe son activité catalytique. Le fait que dans le placenta l'ocytocine induise l'expression à la membrane d'une enzyme dont l'ocytocine est précisément substrat a ainsi conduit à proposer l'hypothèse générale qu'un rôle physiologique d'IRAP, qui est exprimée dans de très nombreux tissus, pourrait être de permettre une boucle de rétrocontrôle négatif autocrine de la signalisation peptidique extracellulaire. L'effet facilitateur de la vasopressine et de l'ocytocine sur l'acquisition mnésique dans l'hippocampe est bien établi. Il est ainsi postulé, mais non démontré, que l'effet facilitateur de l'Ang-IV sur les processus de mémorisation soit la



conséquence de l'inhibition par l'Ang-IV de la dégradation de la vasopressine et / ou de l'ocytocine.

L'ensemble de ces considérations, la mise en évidence que dans des cardiomyocytes en culture l'endothéline-1 induit l'expression à la membrane d'IRAP (Wu-Wong JR et coll., 2000), et les données rapportées par notre laboratoire suggérant que sur l'artère basilaire, l'Ang-IV induit une vasoconstriction médiée par l'endothéline-1 (ET-1) nous a conduit à postuler un modèle pour rendre compte de l'effet vasculaire de l'Ang-IV.

L'ET-1 induirait dans la cellule musculaire lisse comme dans le cardiomyocyte l'expression d'IRAP à la membrane (*Figure 1*). L'exposition extracellulaire du site catalytique d'IRAP permettrait la dégradation de l'endothéline extracellulaire, limitant ainsi son action. En inhibant l'activité catalytique d'IRAP, l'Ang-IV augmenterait la concentration nette péricellulaire d'ET-1 et amplifierait son action constrictrice. En l'absence d'ET-1, IRAP resterait confinée dans les vésicules cytoplasmiques et l'Ang-IV n'aurait pas d'effet. Pour rendre compte de notre observation que la préincubation par le KCl démasque l'action constrictrice de l'Ang-IV, nous postulons que le KCl court-circuite la régulation physiologique normale du trafficking d'IRAP à la membrane par l'ET-1. De fait, le calcium cytosolique est un élément central de la signalisation intracellulaire contrôlant l'expression de surface des protéines transmembranaires et des processus d'exocytose, et l'augmentation de la concentration de  $K^+$  extracellulaire entraîne une dépolarisation qui a pour conséquence l'entrée de calcium dans le cytosol.



**Figure 1 : Schéma du mécanisme proposé par lequel l'angiotensine IV entraîne une vasoconstriction médiée par l'ET-1.**

Cette étude avait donc pour but de vérifier expérimentalement les hypothèses sur lesquelles est construit ce modèle.

## 2.3.2.2. Matériel et méthodes

### 2.3.2.2.1. Translocation d'IRAP à la membrane en réponse à l'ET-1

#### a) Western blot des fractions membranaires et cytoplasmiques

Les artères basilaires étaient prélevées et perfusées pendant 15 minutes par une solution de Krebs. Alors, les artères étaient incubées ou non par des solutions d'ET-1 ( $3 \cdot 10^{-8}$  M), d'ET-3 ( $3 \cdot 10^{-8}$  M) ou de KCl (50 mM) puis broyées à l'aide d'un Polytron (UltraTurrax T8, IKA Labortechnik) à faible vitesse pendant 60 secondes dans un tampon d'homogénéisation (20 mM Mops, pH 7,2, 0,25 M sucrose, 1 mM dithiothreitol, avec des inhibiteurs de protéases (1 mM EGTA, 100  $\mu$ M leupeptine, 1 mM PMSF et 1  $\mu$ M pepstatine) et des inhibiteurs de phosphatase (1 mM orthovanadate de sodium et 200  $\mu$ M pyrophosphate de sodium) (Walker AJ et coll., 2001). L'homogénat était centrifugé à 800 g pendant 10 minutes à 4 °C afin d'obtenir le culot de faible vitesse contenant les noyaux et le tissu non homogénéisé. Le surnageant était recentrifugé à 100.000 g pendant 60 minutes à 4 °C pour collecter les fractions cellulaires membranaire et cytoplasmique. La fraction membranaire était lavée par du TBS et incubée dans un tampon de lyse (50 mmol / L Tris-HCl pH 8,0, 150 mmol / L NaCl, 0,02 % sodium azide, 100  $\mu$ g / mL fluorure de phénylméthylsulfonyl, 1  $\mu$ g / mL aprotinine, et 1 % de Triton X-100). Les échantillons étaient dissous dans 20  $\mu$ L de tampon (quantité correspondante à 80  $\mu$ g de protéines totales), dénaturés à 95 °C et soumis à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide à 10 %. Les protéines étaient transférées sur des membranes de nitrocellulose. Après blocage avec le tampon de blocage (0,05 % de Tween 20, 8 g / L de lait écrémé dans du TBS) à température ambiante pendant une heure, les membranes étaient incubées avec un anticorps polyclonal de lapin anti-IRAP (Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA) (Keller SR et coll., 1995) dilué dans 200 volumes de solution TBS (10 mmol / L Tris-HCl pH 8,0, 150 mmol / L NaCl, et 0,05 % Tween 20) contenant 15 % de solution de lait écrémé à 4 °C pendant une nuit. Après cinq lavages successifs avec du TBS pendant 5 minutes, les membranes étaient incubées avec un anticorps secondaire IgG de chèvre anti-lapin (BioRad Laboratories) dilué dans 3000 volumes de TBS contenant 15 % de lait écrémé à température ambiante pendant une heure, puis lavées encore 5 fois avec du TBS pendant 5 minutes, alors visualisées par chemiluminescence (ECL reaction, Amersham).

## b) Microscopie confocale

L'anticorps anti-IRAP du commerce donne en immunohistochimie un marquage non spécifique intense qui interdit son utilisation dans cette technique. Nous avons donc utilisé un anticorps dirigé contre GLUT-4, (dont l'expression à la membrane accompagne celle d'IRAP), pour visualiser en microscopie confocale l'expression de GLUT-4 à la membrane de cellules musculaires lisses d'aorte de rat en culture primaire.

Afin de déterminer la localisation cellulaire de GLUT-4, des études d'immunofluorescence ont été réalisées sur des cultures primaires de cellules musculaires lisses vasculaires d'aorte de rat. Ces cellules musculaires lisses étaient mises en croissance sur des lames coatées à la polylysine dans du milieu Dulbecco's modified Eagle supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal et ensuite fixées par 2 % de paraformaldehyde dans du PBS à 4 °C et perméabilisées dans 0.3 % de Triton X-100 (Walker AJ et coll., 2001), (Arribas SM et coll., 1996). Les cellules étaient incubées avec un anticorps primaire de lapin anti-GLUT-4 dirigé contre le rat (Calbiochem) (James DE et coll., 1989) dilué au 1/1000 une nuit à 4 °C. Après un lavage intensif avec du TBS contenant 0,1 % de Tween 20, l'anticorps IgG secondaire de chèvre dirigé contre le lapin et couplé à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) était incubé une heure à 37 °C. Les lames étaient ensuite montées dans un milieu contenant du Mowiol (Calbiochem) puis examinées en utilisant un microscope confocal Zeiss LSM-510 Meta (Carl Zeiss Jena, Allemagne).

### 2.3.2.2.2. Dégradation de l'ET-1 par IRAP

#### a) Dosage de l'endothéline-1 par test ELISA.

La diminution de la concentration initiale d'ET-1 d'un milieu incubé à 37°C a été mesurée par ELISA à 15, 30, 60, 120 et 180 minutes, en présence et en l'absence d'une artère basilaire.

Une artère basilaire entière mais ouverte sur sa moitié était perfusée par une solution de Krebs pendant 15 minutes et alors incubée pendant une heure dans 30 µL d'une solution d'ET-1 (Cayman Chemical,  $10^{-9}$  M dans la solution de Krebs) (Capobianco E et coll., 2003) sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub> dans 95 % d'O<sub>2</sub> à 37 °C. Le milieu était supplémenté ou pas avec de l'Ang-IV ( $10^{-8}$  M or  $10^{-7}$  M) et / ou un antagoniste des récepteurs AT<sub>4</sub>, la

Norleucine<sup>1</sup>, Leucinal<sup>3</sup>-(reduced peptide bond)-angiotensine IV (Nleu<sup>1</sup>, Leual<sup>3</sup>-angiotensine IV) ( $3 \cdot 10^{-7}$  M). Les échantillons étaient dilués avec le tampon d'ELISA au  $1 / 10^{\text{ème}}$ . Les concentrations d'ET-1 étaient déterminés en utilisant un kit d'ELISA commercial (Cayman Chemical) (Capobianco et coll., 2003). Cet essai immunométrique était basé sur une technique de double anticorps « sandwich ». Chaque puits avait été coaté par un anticorps monoclonal spécifique de l'ET-1. Un conjugué acétylcholinesterase: Fb', qui se fixait sélectivement sur un épitope différent de la molécule d'ET-1, était aussi ajouté dans le puits. La concentration des analytes était alors déterminée en mesurant l'activité enzymatique de l'acétylcholinesterase avec le réactif d'Ellman's par spectrophotométrie. Les résultats étaient exprimés en pg / mL avec l'aide d'un logiciel Deltasoft II et le pourcentage de dégradation de l'ET-1 pendant 15, 30, 60, 120 et 180 minutes était alors calculé. Le pourcentage de disparition de l'ET-1 du milieu attribuable à l'artère a été étudié à 60 minutes.

#### b) HPLC

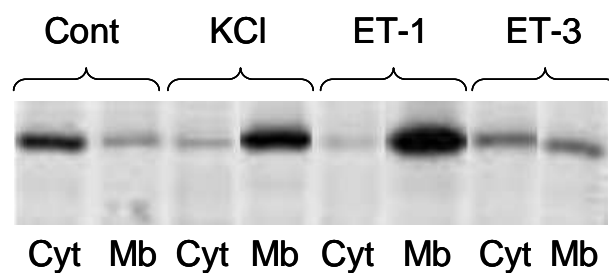
La chaîne de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) consistait en un système de deux pompes associées KONTRON, d'une colonne C18 Stability en phase inverse (10 cm de longueur, 3 mm de diamètre interne, 3  $\mu\text{m}$  de taille de particules, 300 Å de dimension de pores, C.I.L. Cluzeau, France) et d'un détecteur de fluorescence (RF-10Ax1, Shimadzu). Le volume de la boucle d'injection était de 1  $\mu\text{L}$ . L'ET-1 et ses métabolites étaient élués en utilisant un gradient de deux mélanges de solvants : Mix A, 30 % acétonitrile dans l'eau (0,1 % acide trifluoroacétique (TFA)); Mix B, 90 % acétonitrile dans l'eau (0,1 % TFA) (Kumarathasan P et coll., 2001). La composition de la phase mobile était ainsi programmée : la composition initiale était fixée à 100 % de Mix A pendant 1 minute, puis une rampe permettait d'atteindre 100 % de Mix B sur 30 minutes, cette composition restait maintenue constante pendant 10 minutes, et une rampe était alors programmée pour ramener la phase mobile à sa composition initiale (100 % de Mix A) en 15 minutes, laquelle était maintenue pendant 5 minutes. La durée totale de l'expérimentation était de 61 minutes. Le détecteur de fluorescence était optimisé pour une meilleure sensibilité de détection avec une longueur d'onde d'excitation de 280 nm et une longueur d'onde d'émission de 340 nm.

### 2.3.2.3. Résultats

#### 2.3.2.3.1. Translocation d'IRAP à la membrane

##### a) Western Blot (IRAP)

Les western-blot réalisés avec un anticorps anti-IRAP commercial montrent une augmentation du marquage de la fraction membranaire en réponse à l'ET-1 et au KCl mais pas à l'ET-3 (*Figure 2*).

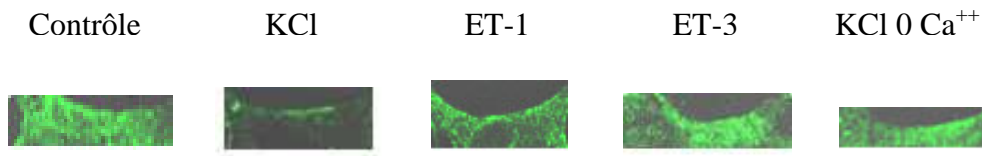


**Figure 2 : Localisation d'IRAP obtenue à partir des fractions cytoplasmiques (Cyt) et membranaires (Mb) des broyats d'artères basillaires incubées ou non en présence de KCl (50 mM), ET-1 ( $3.10^{-8}$  M) ou ET-3 ( $3.10^{-8}$  M).**

L'insuline, le KCl et l'ET-1 induisent une diminution franche du marquage cytoplasmique et un renforcement du marquage membranaire. L'absence d'effet de l'ET-3, ligand sélectif du récepteur  $ET_B$  indique que l'ET-1 entraîne l'expression d'IRAP à la membrane en réponse à la stimulation de son récepteur de type A.

##### b) Microscopie confocale (GLUT-4)

La localisation cellulaire de GLUT-4 dans les conditions basales était cytoplasmique et membranaire (*Figure 3*). L'incubation des cellules musculaires lisses en présence de KCl (50 mM) et d'ET-1 ( $3.10^{-8}$  M) entraînait une translocation de GLUT-4 à la membrane cellulaire alors que l'ET-3 ( $3.10^{-8}$  M) n'avait pas d'effet, et que l'effet du KCl disparaissait en l'absence de calcium extracellulaire (zéro calcium / EDTA).



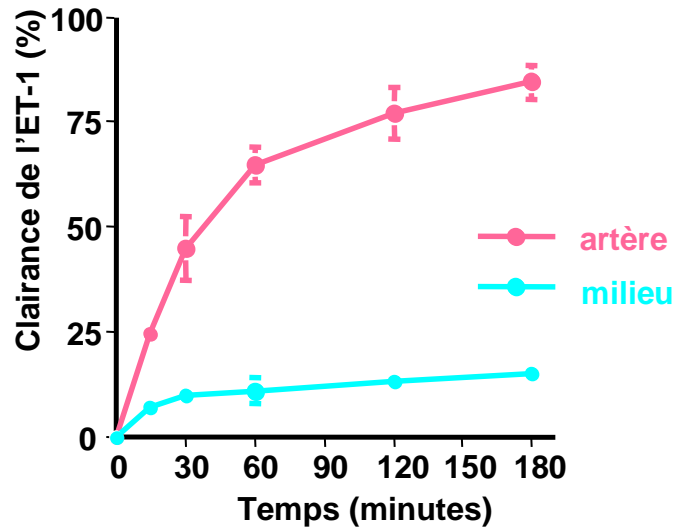
**Figure 3 : Immunolocalisation de GLUT-4 sur les cellules musculaires lisses dans les conditions basales (Contrôle) ou incubées en présence de KCl (50 mM), ET-1 ( $3.10^{-8}$  M), ET-3 ( $3.10^{-8}$  M) ou KCl (50 mM) sans calcium extracellulaire.**

Nous avons confirmé ce résultat fonctionnellement sur l'artère basilaire isolée perfusée : à l'inverse de l'ET-1, le prétraitement par l'ET-3 ne démasquait pas l'effet constricteur de l'Ang-IV.

#### 2.3.2.3.2. Effet de l'Ang-IV sur le métabolisme de l'ET-1 par l'artère basilaire *ex vivo*

##### a) ELISA

Afin d'examiner directement l'hypothèse selon laquelle l'Ang-IV induirait une vasoconstriction en inhibant la dégradation extracellulaire de l'ET-1 par IRAP, le taux de disparition de l'ET-1 exogène était examiné *in vitro* en présence ou en absence d'une artère basilaire (*Figure 4*).



**Figure 4 : Cinétique de clairance de l'ET-1 (en % de la quantité initiale  $10^{-9}$  M) mesurée en ELISA en présence (artère) ou non (milieu) d'une artère basilaire.**

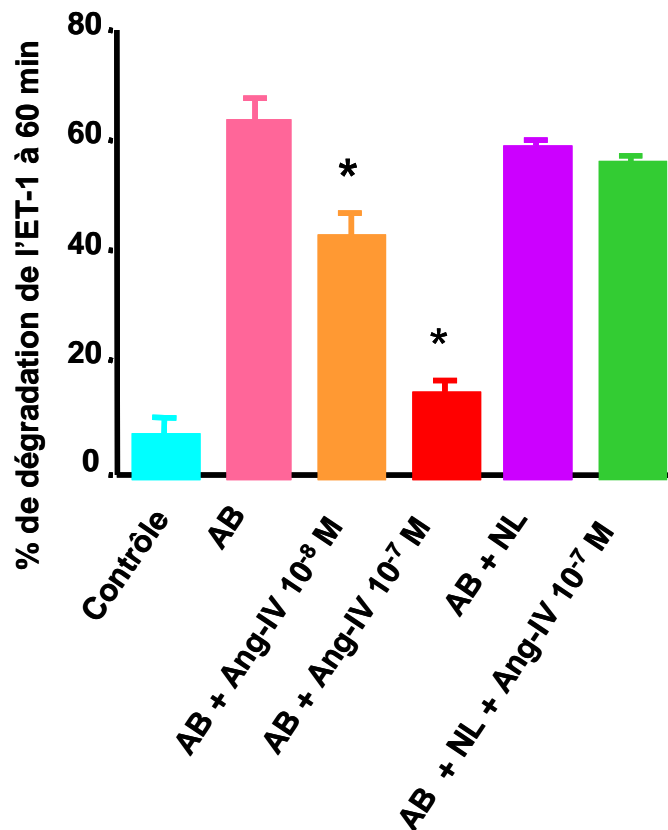
La dégradation spontanée de l'ET-1 était de moins de 10 % au bout de trois heures, et de plus de 70 % en présence de l'artère.

Ce pourcentage est inhibé de façon dose-dépendante par l'addition d'Ang-IV dans le milieu. L'antagoniste de l'Ang-IV, la Nleu<sup>1</sup>, Leual<sup>3</sup>-angiotensine IV, n'a pas d'effet propre, mais bloque complètement l'effet inhibiteur de l'Ang-IV.

Le taux de dégradation spontanée de l'ET-1 suivant l'incubation à 37 °C dans le milieu de perfusion contenant  $10^{-9}$  M d'ET-1 était de  $9,2 \pm 2,8$  % à 60 minutes (*Figure 5*), et était augmenté à  $66,5 \pm 3,9$  % / 60 minutes ( $P < 0,0001$ ) en présence d'une artère basilaire. L'angiotensine IV ( $10^{-8}$  M) réduisait le taux de dégradation à  $42,7 \pm 7,5$  % / 60 minutes ( $P = 0,0013$  *versus* artère basilaire seule) et l'angiotensine IV ( $10^{-7}$  M) réduisait encore plus le taux de dégradation à  $14,5 \pm 4,1$  % / 60 minutes ( $P < 0,0001$  *versus* artère basilaire seule,  $P =$



0,0006 *versus* Ang-IV  $10^{-8}$  M). L'antagoniste de l'angiotensine IV montrait un léger effet agoniste, et réduisait le taux de dégradation de l'ET-1 à  $59,2 \pm 1,5$  % / 60 minutes,  $P = 0,013$  *versus* artère basilaire seule, mais réduisait significativement l'inhibition de la dégradation d'ET-1 induite par l'Ang-IV  $10^{-8}$  M ( $56,25 \pm 2,1$  % / 60 minutes  $P = 0,013$ ).

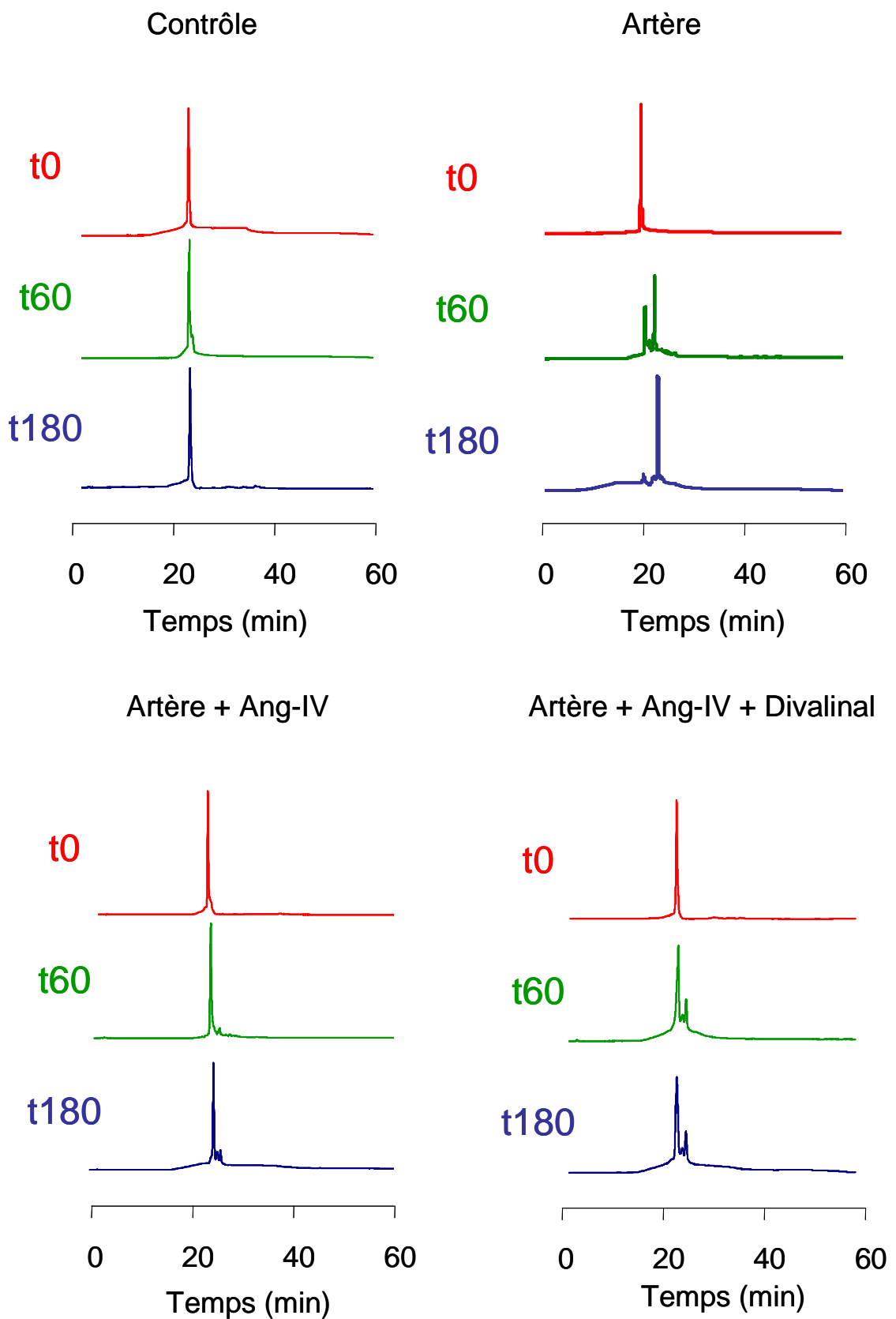


**Figure 5 : Pourcentage de dégradation de l'ET-1 de façon spontanée (contrôle), en présence d'artère basilaire (AB), d'angiotensine IV (Ang-IV) avec ou sans Nleu<sup>1</sup>, Leual<sup>3</sup>-angiotensine IV (NL) au bout de 60 minutes d'incubation**

Ces résultats mettent en évidence la disparition de l'ET-1 du milieu extracellulaire par un mécanisme attribuable à IRAP, compatible avec notre hypothèse de travail. Cependant ils n'apportent pas la preuve formelle de la dégradation de l'ET-1 à l'extérieur de la cellule par IRAP, sa disparition pouvant être la conséquence d'une internalisation préalable suivie d'une dégradation lysosomiale.

## b) HPLC

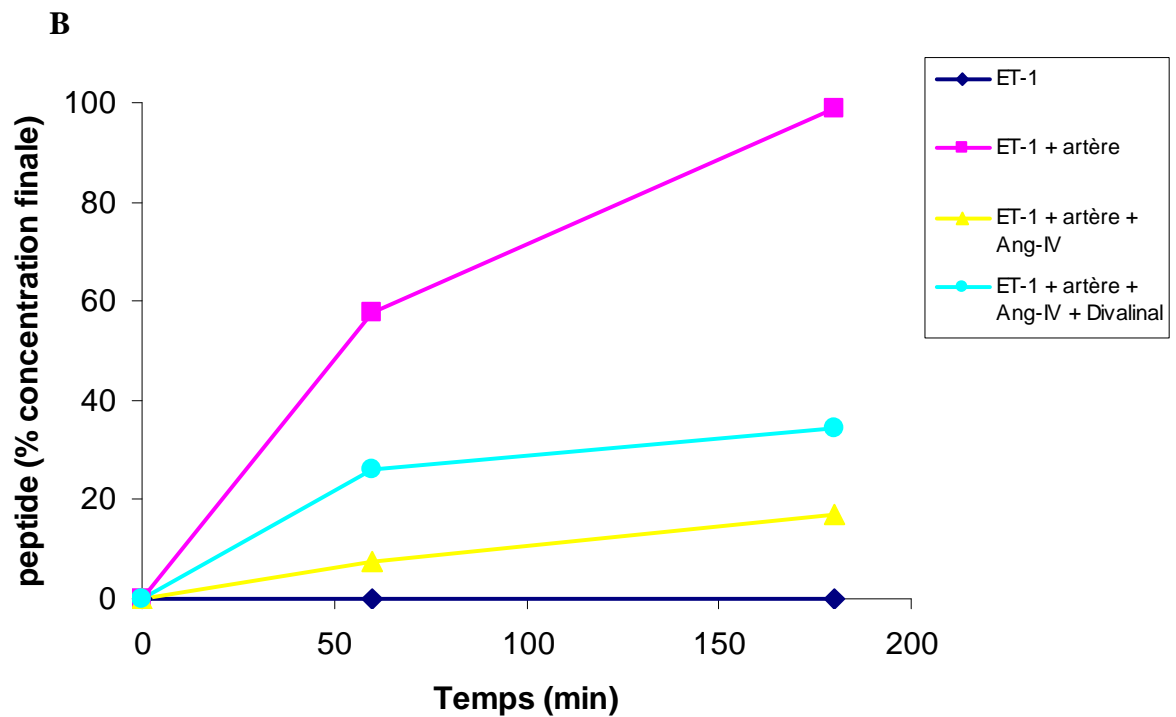
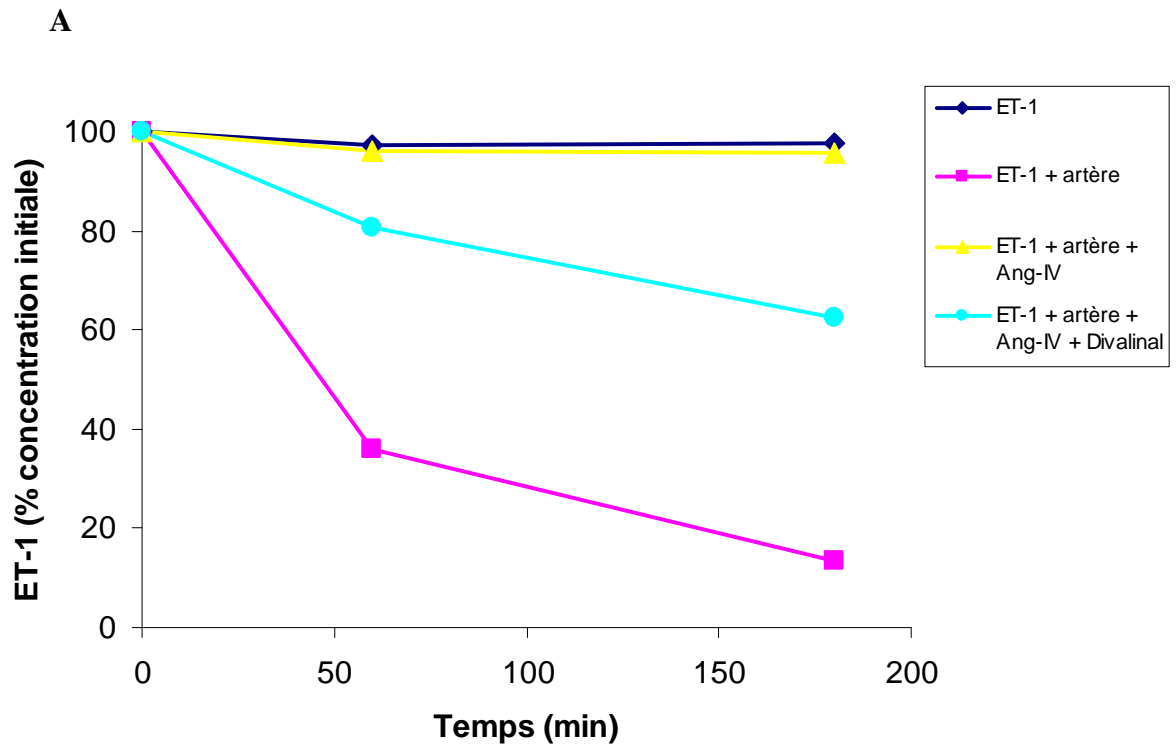
Nous avons étudié en HPLC le milieu de culture incubé aux temps t0, t60 et t180 minutes. Le pic d'ET-1 mesuré en fluorescence n'est pas modifié dans le temps en l'absence d'artère basilaire (*Figure 6 Contrôle*).



**Figure 6 : Chromatogrammes de fluorescence obtenus au bout de 0, 60 et 180 minutes d'incubation de l'ET-1 seule (contrôle), en présence d'une artère basilaire avec ou sans angiotensine IV avec ou sans divalinal**

L'ET-1 est dégradée très faiblement spontanément à une heure et 180 minutes, de l'ordre de 2 à 3 %. En présence de l'artère basilaire, le pic d'ET-1 est diminué à t60 et disparaît quasiment complètement à t180 (*Figure 7 A*), alors qu'en parallèle apparaît à t60 un second pic, qui est très augmenté à t180 (*Figure 7 B*). En présence d'Ang-IV le pic initial d'ET-1 ne diminue pas dans le temps, et le second pic n'apparaît pas. En présence d'Ang-IV et de son inhibiteur spécifique le divalinal, la diminution du pic correspondant à l'ET-1 et l'apparition du second pic réapparaissent. Des résultats comparables ont été obtenus en présence d'aorte de rat dans le milieu de culture.

Ces résultats confirment ceux obtenus en ELISA, et suggèrent la validité de notre hypothèse en mettant en évidence l'apparition d'un peptide qui est très probablement le produit de clivage de l'ET-1 par IRAP.

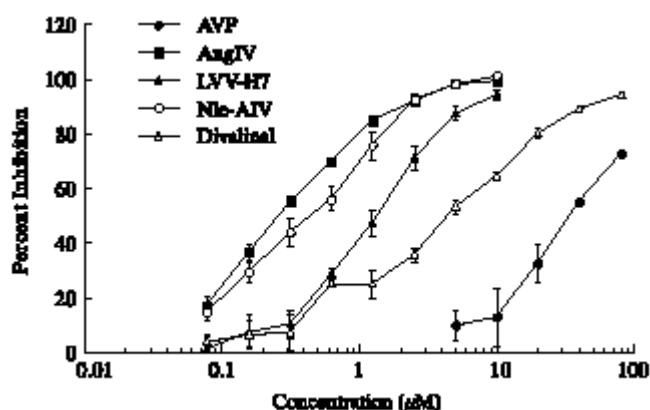


**Figure 7 : Cinétique de disparition de l'ET-1 (exprimée en pourcentage de la dose initiale) mise à incuber en présence ou non de l'artère basilaire, d'Ang-IV et de divalinal (A) et cinétique d'apparition d'un autre peptide dans les mêmes conditions (B)**

#### 2.3.2.4. Discussion

L'ensemble des résultats obtenus suggère la validité du modèle proposé comme hypothèse de travail. L'incubation par l'ET-1 induit l'enrichissement de la préparation de membranes cytoplasmiques par rapport à la fraction cytosolique, indiquant la translocation à la membrane d'IRAP en réponse à l'ET-1. Cet effet est médié par le récepteur ET<sub>A</sub>, puisque l'ET-3, le ligand spécifique du récepteur ET<sub>B</sub> n'a pas d'effet. Ces résultats sont d'ailleurs cohérents avec les observations fonctionnelles sur la contractilité de l'artère basilaire. Alors que comme l'ET-1, l'ET-3 induit une contraction de l'artère basilaire, l'ET-3 ne fait pas apparaître la réponse contractile à l'angiotensine IV. La préincubation avec le KCl induit l'augmentation attendue du marquage de la fraction membranaire par l'anticorps anti-IRAP, et cette augmentation disparaît en l'absence de calcium extracellulaire. L'ensemble de ces résultats est confirmé de façon indirecte par l'étude en microscopie confocale des cellules musculaires lisses d'aortes de rat. La stimulation par l'ET-1 ou le KCl fait clairement apparaître une diminution du marquage cytosolique de GLUT-4, le partenaire d'IRAP dans les vésicules cytosoliques, alors que l'ET-3 ou le KCl en l'absence de calcium extracellulaire n'ont pas d'effet.

Ces résultats soulèvent plusieurs interrogations qui méritent d'être discutées. La première est que l'ensemble des conclusions repose sur l'utilisation de l'antagoniste spécifique de l'angiotensine IV, le divalinal. Le groupe d'Anthony Albiston à Melbourne qui a identifié IRAP comme le récepteur AT<sub>4</sub>, a étudié ses propriétés enzymatiques à partir de préparation de membranes de cellules HEK transfectées avec l'ADNc d'IRAP. La dégradation du substrat d'IRAP, la Leu-bêta-naphthylamide a été mesurée en présence de différents ligands (*Figure 8*) (Lew RA et coll., 2003).



**Figure 8 : Inhibition of IRAP by Ang IV analogues. Substrate (Leu- $\beta$ -NA) was incubated with HEK29T-IRAP membranes in the presence or absence of inhibitor peptides: Ang IV ( $\blacksquare$ ), LVV-H7 ( $\blacktriangle$ ), Nle<sup>1</sup>-Ang IV ( $\circ$ ), divalinal Ang IV ( $\triangle$ ), AVP ( $\bullet$ ) at the indicated concentrations. Data are expressed as the per cent inhibition of substrate cleavage relative to control, and are the mean  $\pm$  SEM of 6–9 replicates from two to three experiments, each performed in triplicate (Lew RA et coll., 2003)**

La conclusion, surprenante, de ce travail est que l'angiotensine IV, mais aussi le divalinal et la LVV-hemorphin-7 sont des inhibiteurs de l'activité catalytique d'IRAP. En d'autres termes, pour cette équipe, le divalinal et la LVV-hemorphin-7 ne sont pas des antagonistes de l'angiotensine IV, mais des agonistes. Une telle conclusion n'est pas seulement en contradiction directe avec nos propres résultats, mais aussi avec l'ensemble des travaux émanant de différentes équipes qui montrent que le divalinal ou la LVV-hemorphin-7 bloquent les effets biologiques de l'angiotensine IV (Chen S et coll., 2000), (Kramar EA et coll., 1997), (Krebs LT et coll., 1996). L'hypothèse qu'IRAP a une double fonctionnalité, à la fois peptidase par son domaine extracellulaire, mais aussi récepteur peptidique plus classique, capable de transduction d'une signalisation intracellulaire par l'intermédiaire de son domaine cytosolique ne peut être exclue formellement. Ainsi, angiotensine IV, divalinal et hémorphines pourraient avoir la même action inhibitrice de l'activité enzymatique d'IRAP, mais l'angiotensine IV serait un agoniste et le divalinal un antagoniste de sa fonction récepteur. Une telle hypothèse n'est toutefois pas compatible avec nos observations que le divalinal atténue l'effet inhibiteur de l'angiotensine IV sur la dégradation de l'ET-1. Nous devons cependant reconnaître que le blocage de l'effet inhibiteur de la dégradation de l'ET-1 par l'angiotensine IV n'est que partiel dans nos expériences conduites en HPLC, alors que ce

blocage était complet avec l'autre antagoniste (Nor-Leu-Ang-IV) dans les expériences réalisées en ELISA. Il est ainsi tout à fait possible que le divalinal soit un antagoniste à activité agoniste partielle.

Le groupe de Melbourne soulève par ailleurs une autre contradiction avec nos résultats, bien plus embarrassante dans la mesure où nous ne pouvons pas, comme pour l'effet antagoniste du divalinal, nous appuyer sur des résultats concordants de la littérature. Matsumoto (Matsumoto H et coll., 2000) a étudié différents substrats potentiels de la forme soluble d'IRAP, spontanément sécrétée par des cellules CHO transfectées, et conclue que l'ET-1 n'est pas clivée par IRAP. A la suite d'échanges de courriels, Antony Albiston a à notre demande examiné dans son modèle si l'ET-1 était substrat d'IRAP, et trouve lui aussi que tel n'est pas le cas. Dans la mesure où nous avons foi en nos résultats et aucune raison de mettre en cause ceux d'Albiston et de Matsumoto, la question posée devient alors de tenter de comprendre comment les différences dans les modèles expérimentaux utilisés pourraient rendre compte de la contradiction apparente.

Matsumoto et Albiston ont étudié les propriétés enzymatiques d'IRAP soluble, soit libérée spontanément dans le milieu de culture, soit extraite de préparations de membranes par un traitement au triton. Il est concevable que ces conditions puissent induire des modifications conformationnelles de la protéine avec pour résultat des modifications des propriétés de l'enzyme native, présente dans son environnement membranaire.

Une explication alternative pourrait être que les conditions expérimentales différentes influencent non pas l'enzyme elle-même, mais les conditions de son interaction avec son substrat, l'ET-1. De très nombreuses hypothèses peuvent alors être évoquées. Il est ainsi possible que le clivage de l'ET-1 en présence d'une artère mais pas en présence d'IRAP soluble soit la conséquence d'une cascade enzymatique dans laquelle IRAP est impliquée. Il est par exemple possible que pour devenir substrat d'IRAP, l'ET-1 doive au préalable subir une première coupure par une autre ectoenzyme. Il est même possible que l'ET-1 ne soit pas directement substrat d'IRAP mais soit clivée par une autre ectoenzyme, active uniquement dans sa forme soluble, et dont le clivage par IRAP serait une étape nécessaire à l'activation, rendant ainsi *in fine* la dégradation de l'ET-1 IRAP-dépendante et expliquant son inhibition par l'angiotensine IV. Enfin il est aussi possible que l'ET-1 circulante ne soit pas directement substrat d'IRAP, mais le devienne après sa liaison préalable à l'un de ses récepteurs. Il a ainsi



par exemple été montré que le récepteur de type B de l'endothéline subit une protéolyse limitée à la surface de la cellule par une métalloprotéase, mais le récepteur n'est clivé que s'il est occupé par son ligand, l'ET-1 (Grantcharova E et coll., 2002).

L'interprétation de nos résultats que nous privilégions reste que l'ET-1 est substrat d'IRAP, car si tel n'était pas le cas, il faudrait admettre alors que la clairance de l'ET-1 du milieu extracellulaire est la conséquence de son internalisation dans les cellules musculaires lisse de la paroi du vaisseau, et que cette internalisation est contrôlée positivement par IRAP. Il faudrait par ailleurs admettre qu'en parallèle, IRAP contrôle positivement la sécrétion ou la libération à partir de la membrane d'un autre peptide dans le milieu extracellulaire. De fait, nous ne serons en mesure d'apporter une réponse définitive que lorsque nous aurons réussi à identifier formellement la nature du peptide qui apparaît en HPLC à mesure que l'ET-1 disparaît. Que ce peptide soit ou pas un fragment d'ET-1, l'ensemble de ce travail nous aura de toute façon conduit à confirmer les conclusions suggérées par notre étude des effets de l'angiotensine IV sur l'artère basilaire isolée perfusée, identifiant l'ET-1 comme le médiateur de l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine IV, puisque nous pouvons maintenant conclure formellement que l'ET-1, par le biais de son récepteur ET<sub>A</sub> induit la translocation à la membrane cellulaire d'IRAP, et que l'angiotensine IV ralentit la disparition de l'ET-1 de l'espace périvasculaire en inhibant un mécanisme IRAP-dépendant.

Si le peptide inconnu est un fragment d'ET-1, ce travail apportera pour la première fois la preuve de l'hypothèse que le (ou un) rôle physiologique d'IRAP est de constituer un mécanisme de rétrocontrôle autocrine négatif de la signalisation extracellulaire par les hormones peptidiques en dégradant (directement ou indirectement) ces peptides dans le milieu extracellulaire. Si ce peptide n'a pas de lien avec l'ET-1, nous serons en mesure de proposer la même conclusion, nuancée par la réserve que, au moins en ce qui concerne l'ET-1, le mécanisme par lequel IRAP accélère la disparition de l'hormone peptidique du milieu extracellulaire par un mécanisme ne repose pas sur une dégradation par IRAP.

### **3. DISCUSSION**

L'ensemble de nos travaux nous a permis de mettre en lumière la participation du métabolite de l'angiotensine II, l'angiotensine IV, aux mécanismes de protection contre l'ischémie cérébrale. Les mécanismes de cet effet protecteur de l'angiotensine IV restent cependant pour l'essentiel obscurs.

Nos observations mettent en évidence que l'angiotensine IV agit probablement en facilitant la préservation du flux sanguin dans la région ischémique, limitant ainsi la taille de l'infarctus en réduisant la zone de pénombre, mais semble aussi avoir spécifiquement un effet favorable sur les séquelles cognitives de l'ischémie, impliquant des mécanismes d'action neuronaux.

Alors que nous avons montré qu'administrée *in vivo* l'angiotensine IV induit une puissante vasodilatation cérébrale, l'étude de ses propriétés vasomotrices sur un vaisseau isolé du lit cérébral met en évidence un effet paradoxalement vasoconstricteur. Cette contradiction apparente est constante dans la littérature puisque les travaux ayant examiné l'effet de l'angiotensine IV administrée *in vivo* rapportent une augmentation des flux sanguins tissulaires (Kramar EA et coll., 1997), (Naveri L et coll., 1994), alors que la plupart des études réalisées *in vitro* rapporte un effet vasoconstricteur de l'angiotensine IV (Li Q et coll., 1995), (Loufrani L et coll., 1999).

Nous avons démontré sur le modèle de l'artère basilaire isolée perfusée que l'angiotensine IV induit une contraction en inhibant un mécanisme autocrine de rétrocontrôle négatif médié par IRAP qui diminue la concentration efficace d'ET-1 (endogène ou exogène). Ces résultats sont à notre sens importants à deux titres. Le premier est qu'ils étayent expérimentalement pour la première fois avec l'exemple de l'ET-1 l'hypothèse qu'un rôle physiologique d'IRAP est de moduler l'amplitude des signaux peptidiques extracellulaires. Le second est que ce modèle nous a permis de mettre en évidence des effets de l'angiotensine IV à des concentrations compatibles avec celles physiologiquement circulantes, alors que l'ensemble des études conduites jusqu'à présent aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* ont utilisé des doses micromolaires, largement surphysiologiques, d'angiotensine IV (Chen S et coll., 2000), (Patel JM et coll., 1998), (Garrison EA et Kadowitz PJ, 1996). En d'autres termes,

nous pensons, même si nous ne l'avons pas mis en exergue dans la discussion de notre manuscrit, que nos résultats apportent la première fois la preuve que l'angiotensine IV est bien un acteur physiologique du système rénine - angiotensine. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer que le rôle physiologique de l'angiotensine IV est d'amplifier les effets vasculaires de l'ET-1.

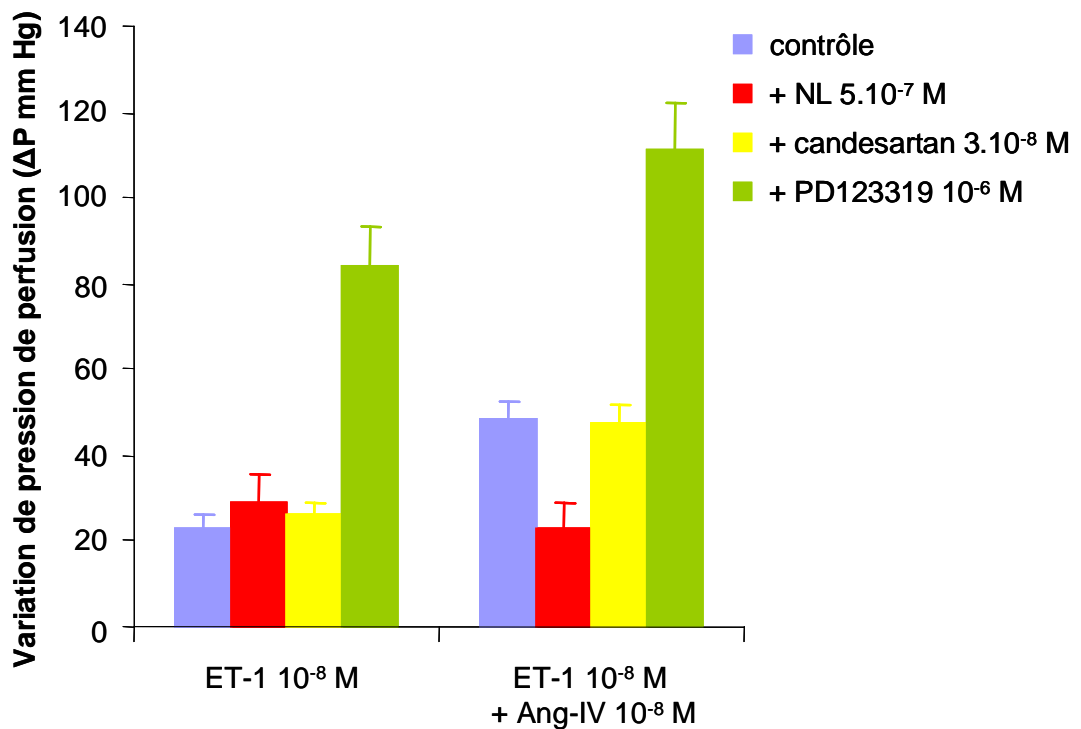
Nos observations sont dans une large mesure le fruit du hasard et d'une succession de résultats déconcertants. Notre hypothèse initiale, basée sur les données de la littérature, était que l'angiotensine IV est un vasoconstricteur sur la plupart des lits artériels (Loufrani L et coll., 1999), mais est vasodilatatrice dans la circulation cérébrale (Kramar EA et coll., 1997). Notre première surprise avec le modèle de l'artère basilaire dans nos conditions expérimentales a été d'observer la contraction attendue aux différents vasoconstricteurs classiques (épinéphrine, ET-1), mais strictement aucune réponse à l'angiotensine II, ni seule, ni en présence d'antagonistes de ses récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Cette absence d'expression fonctionnelle des récepteurs de l'angiotensine II nous offrait avec ce modèle l'opportunité unique de pouvoir étudier les effets de l'angiotensine IV sur son récepteur AT<sub>4</sub> / IRAP sans recruter de stimulation parasite des récepteurs AT<sub>1</sub> et / ou AT<sub>2</sub>, une difficulté présente dans toutes les études *in vitro* publiées (Gardiner SM et coll., 1993), (Le MT et coll., 2002). Dans ce modèle l'angiotensine IV n'avait cependant aucun effet elle non plus. Dans la mesure où nous anticipions un effet vasodilatateur, nous avons tenté de le démasquer classiquement par une précontraction au KCl, et révélé une vasoconstriction. Puisque la précontraction au KCl faisait apparaître la fonctionnalité d'AT<sub>4</sub> / IRAP, et qu'il était connu que dans le cardiomyocyte (Wu-Wong JR et coll., 2000) et l'adipocyte (Wu-Wong JR et coll., 1999) l'ET-1 induit la translocation d'IRAP à la membrane, ces résultats nous invitaient directement à évaluer si une précontraction par l'ET-1 pouvait elle aussi faire apparaître une réponse à l'angiotensine IV.

Dans ce modèle expérimental, l'artère basilaire est exposée aux agents pharmacologiques simultanément par sa lumière et par sa paroi externe, adventitielle, le perfusât et le bain ayant la même composition. Nous avons tout récemment modifié notre dispositif expérimental afin de pouvoir contrôler de façon indépendante la solution de perfusion et celle du bain. Nos résultats préliminaires montrent que l'angiotensine IV après

précontraction au KCl, n'a pas d'action vasoconstrictrice lorsqu'elle est administrée seulement dans la lumière, et qu'au contraire, elle entraîne une vasoconstriction lorsqu'elle est administrée dans le bain, même en l'absence d'Angiotensine IV luminale. Un travail de Mima et coll. a montré que l'injection intraartérielle d'ET-1 n'avait pas d'effet sur le diamètre de la basilaire chez le chat et le chien, alors que l'administration intracérébrale d'ET-1 entraînait une diminution du diamètre de la basilaire de 73 % (Mima T et coll., 1989).

Ces observations ouvrent des perspectives à la compréhension des mécanismes de l'effet vasodilatateur de l'angiotensine IV observé *in vivo*. Il est en effet possible que l'angiotensine IV agisse en inhibant la dégradation de peptides présents non pas dans la lumière, mais dans l'espace interstitiel. Il est à cet égard intéressant de souligner ce que nous avons observé au cours des artériographies cérébrales chez le rat : alors que l'angiotensine IV était administrée sous forme de bolus dans la carotide interne, son effet vasodilatateur était retardé, apparaissant progressivement après cinq minutes pour atteindre un maximum environ dix minutes après l'injection, un délai d'action compatible avec sa pénétration progressive à travers la paroi artérielle ou dans l'interstitium cérébral à partir du lit capillaire. A l'inverse des conditions expérimentales des expériences *ex vivo* dans lesquelles l'ET-1 était le seul substrat potentiel d'IRAP, de nombreux peptides substrats d'IRAP comme la vasopressine et l'ocytocine sont aussi présents dans le tissu cérébral. Ces peptides sont classiquement des vasoconstricteurs. Cependant, l'administration de vasopressine ou d'ocytocine directement dans l'artère vertébrale du chien entraîne une vasodilatation marquée des vaisseaux intracrâniens (Suzuki Y et coll., 1992), (Suzuki Y et coll., 1993). Cet effet vasorelaxant de la vasopressine et de l'ocytocine est aussi retrouvé *in vitro* sur des anneaux d'artères basilaires, alors que ces peptides contractent les anneaux d'artères fémorales (Katusic ZS et coll., 1986). On peut dès lors imaginer qu'*in vivo*, le tonus contractile de base des artères cérébrales est le résultat net de la balance des effets constricteurs de l'ET-1 et des effets dilatateurs de la vasopressine et de l'ocytocine, les concentrations de ces peptides dans l'interstitium cérébral périvasculaire étant elles-mêmes la conséquence de l'équilibre dynamique de leur production et de leur dégradation par IRAP. Si la vasopressine est un meilleur substrat d'IRAP que l'ET-1, alors l'inhibition d'IRAP par l'angiotensine IV entraînerait une modification de l'équilibre résultant en une augmentation du ratio vasopressine / ET-1 expliquant l'effet vasodilatateur net de l'angiotensine IV *in vivo*.

Une autre hypothèse de travail peut être avancée pour rendre compte de l'effet vasodilatateur de l'angiotensine IV *in vivo*. Elle résulte d'une observation déconcertante obtenue dans notre modèle d'artère basilaire perfusée. La précontraction par le KCl démasquant une contraction dose-dépendante à l'angiotensine IV, nous avons étudié si cette contraction impliquait les récepteurs AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub>. Nous avons montré que la réponse à l'angiotensine IV n'était modifiée ni par la présence de candesartan, ni par celle de PD123319, un antagoniste spécifique du récepteur AT<sub>2</sub>. Nous avons ensuite mis en évidence que la précontraction par l'ET-1 entraînait elle aussi l'apparition d'une réponse à l'angiotensine IV, et avons là encore étudié l'effet du candesartan et du PD123319 sur cette réponse. Les résultats (*Figure 6*), que nous avons pris soin de ne pas inclure dans notre manuscrit, montrent que le blocage du récepteur AT<sub>2</sub> est responsable d'une augmentation très significative et très reproductible de l'effet constricteur de l'ET-1.



**Figure 6 : Effet des antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> ou AT<sub>4</sub> sur la contraction de l'artère basilaire de rat stimulée par l'ET-1 10<sup>-8</sup> M, en présence ou non d'Ang-IV**

Ce résultat suggère que, dans ce modèle particulier, l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 est le résultat net de deux effets opposés, une vasoconstriction médiée par l'ET-1 et une vasodilatation AT<sub>2</sub>-dépendante. Puisqu'en l'absence de précontraction par l'ET-1 l'artère basilaire ne répond pas à l'angiotensine II, ni seule ni en présence de candesartan ou de PD123319, cette observation suggère que l'ET-1 induit, comme pour IRAP, l'expression fonctionnelle du récepteur AT<sub>2</sub>, mais aussi l'apparition de son ligand, l'angiotensine, dans la préparation. De très nombreuses interactions ont été décrites entre le système rénine-angiotensine-aldostérone et les endothélines (Rossi GP et coll., 1999). Nous n'avons pas trouvé parmi ces travaux de preuves expérimentales directe que l'ET-1 induise la production d'angiotensine par les cellules vasculaires, toutefois, Kawaguchi et coll. ont montré que l'ET-1 stimule sur des cellules endothéliales *in vitro*, l'activité de l'enzyme de conversion (Kawaguchi H et coll., 1991).

Une troisième piste peut être envisagée pour tenter de comprendre la nature de la réponse à l'angiotensine IV *in vivo*, et en particulier son rôle au cours de l'ischémie cérébrale. L'ischémie cérébrale aiguë stimule la production intracérébrale d'ET-1. La concentration d'ET-1 dans le parenchyme cérébral augmente dans les modèles d'ischémie aiguë, et chez l'homme, les taux d'ET-1 s'élèvent dans le liquide céphalo-rachidien et dans le sang veineux d'origine céphalique à la phase aiguë de l'AVC. Ces observations ont conduit de nombreux auteurs à proposer que l'ET-1 joue un rôle central dans la physiopathologie de l'AVC et contribue à la cascade d'événements aboutissant à l'infarctus cérébral. A l'appui de cette hypothèse, il a été montré dans des modèles expérimentaux que le blocage du récepteur ET<sub>A</sub> par un antagoniste spécifique a un effet protecteur (Wanebo JE et coll., 1998) (Patel TR et coll., 1996).

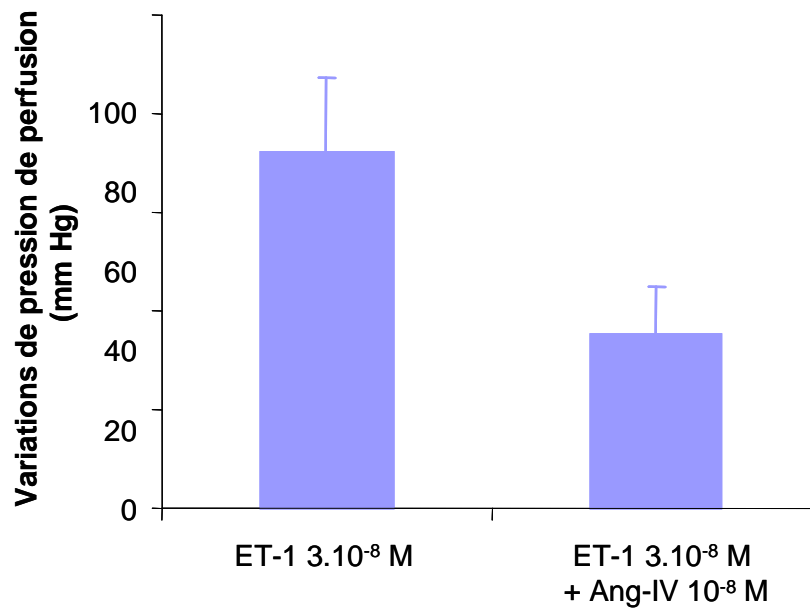
La production d'ET-1 au cours de l'ischémie cérébrale aiguë n'est pas due aux neurones, mais aux cellules de la glie. Dans la mesure où le rôle physiologique central de ces cellules est d'assurer des fonctions ancillaires au service du neurone, on peut s'étonner qu'en réponse à une agression ischémique, ces cellules libèrent un médiateur qui aggrave la souffrance neuronale. On peut dès lors se demander si cette production d'ET-1 en réponse à l'ischémie ne doit pas être interprétée au contraire comme une composante de la réponse adaptative, physiologique, visant à limiter la souffrance ischémique des neurones. Il reste bien sûr possible que dans certaines circonstances, cette réponse dépasse son but et puisse aboutir à un effet délétère. Cependant, aucun argument expérimental définitif ne permet d'exclure l'hypothèse paradoxale que l'ET-1 participe à un mécanisme protecteur. Il est d'ailleurs intéressant de souligner que dans un modèle expérimental d'ischémie cérébrale, si le blocage du récepteur ET<sub>A</sub> a un effet protecteur, celui du récepteur ET<sub>B</sub> aggrave les conséquences de l'ischémie (Siren AL et coll., 2002).

Dans la mesure où l'ET-1 est produite par les cellules gliales ischémiques, il est légitime de penser que l'augmentation de la concentration cérébrale d'ET-1 n'est pas uniforme, et répond à un gradient avec un maximum périlésionnel. Sur notre modèle d'artère basilaire, nous avons montré que la précontraction par une dose modeste d'ET-1 démasque l'effet constricteur de l'angiotensine IV. Des résultats préliminaires nous ont permis



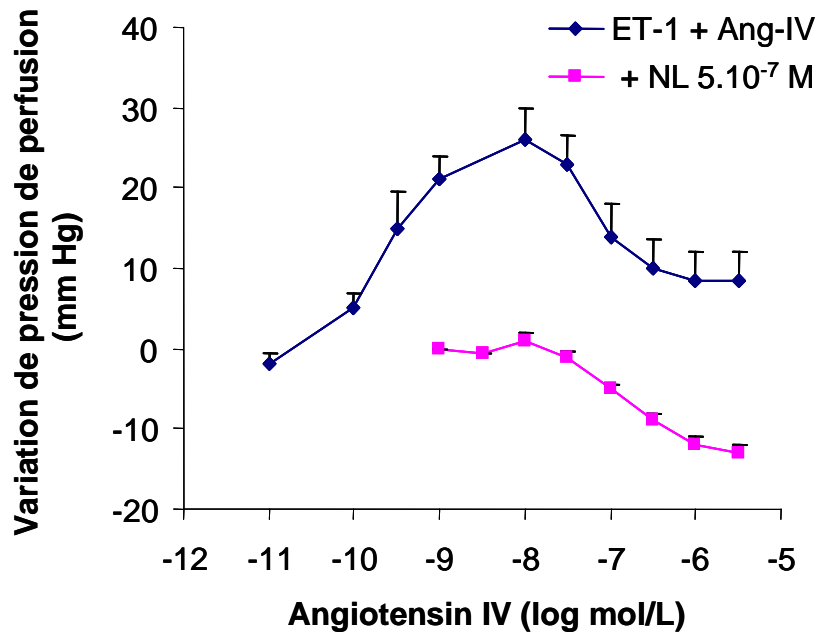
d'observer toutefois que si la précontraction est obtenue avec des doses plus élevées d'ET-1, l'angiotensine IV a cette fois un effet relaxant (*Figure 7 A et B*).

**A**



**Figure 7A : Effet de l'angiotensine IV à 10<sup>-8</sup> M sur des artères basillaires de rat précontractées avec une plus forte dose d'ET-1 (3.10<sup>-8</sup> M) (n = 8)**

**B**



**Figure 7B : Courbes doses-réponse à l'angiotensine IV d'artères basillaires de rat précontractées par l'ET-1 à  $10^{-8}$  M en présence ou de l'antagoniste des récepteurs  $AT_4$ , la Nleu<sup>1</sup>, Leual<sup>3</sup>-angiotensine IV (NL).**

Nous n'avons pas encore étudié dans le détail les mécanismes de cette composante relaxante, qui pourrait être due au recrutement du couple angiotensine /  $AT_2$ , et / ou à celui de la stimulation progressivement majoritaire de la vasodilatation induite par le récepteur  $ET_B$  endothélial avec l'augmentation de la concentration d'ET-1. Quelque soit la nature, probablement complexe, de cette réponse, elle ouvre la perspective d'une hypothèse particulièrement attrayante. Si les concentrations sont très élevées dans le périmètre de la lésion ischémique, et bien plus faibles à distance de celle-ci, alors l'angiotensine IV pourrait conduire à une vasoconstriction en zone saine et une vasodilatation spécifiquement ciblée à la zone d'ischémie. Une telle réponse représenterait un mécanisme de protection particulièrement adapté en réponse à une ischémie focale, en réduisant une perfusion de luxe dans les zones normalement irriguées, et en redirigeant le flux sanguin cérébral vers la zone d'ischémie en ouvrant toutes les collatérales de suppléance qui le perfusent.

L'ensemble de ces réflexions dessine les perspectives, les hypothèses de travail, au demeurant non exclusives les unes des autres, sur lesquelles le travail de recherche initié par cette thèse pourra être poursuivi. Si nous ne sommes pas en mesure à ce jour de proposer un modèle simple du rôle physiologique intégré de l'angiotensine IV dans la régulation de la circulation cérébrale ni de ses mécanismes, nous voyons se dessiner la perspective d'un acteur prépondérant dans les mécanismes de l'adaptation à l'ischémie cérébrale, orchestrant et modulant les interactions complexes de plusieurs effecteurs peptidiques et de leurs récepteurs spécifiques, avec pour implication directe la possibilité d'avancées cliniques importantes.

Nous avons proposé notre étude sur les effets de l'angiotensine IV et des sartans au journal *Stroke*, qui l'a rejeté sans appel. L'argument essentiel avancé par l'expert était le suivant :

“The increase in mortality after administration of lisinopril, an ACE inhibitor is surprising, in view of the very-well documented end-organ protective effects of ACE inhibitors, both in experimental animals and in humans. These results are highly questionable and their interpretation in doubt.”

Pour cet expert, le concept que l'angiotensine puisse avoir des effets protecteurs, et que les sartans puissent conférer une protection par un autre mécanisme que par l'inhibition de la stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub> est à ce point irrecevable intellectuellement qu'il n'a d'autre alternative que de simplement mettre en doute non seulement l'interprétation que nous proposons de nos résultats, mais les résultats eux-mêmes. Ces résultats ne font pourtant que confirmer ceux rapportés par le groupe de Leonardo Fernandez il y a déjà plus de dix ans. Nous observons un effet délétère des IEC quel que soit celui utilisé, aussi bien dans le modèle d'injection de microsphères chez le rat que dans celui de la ligature de la carotide chez la gerbille, et dans ce dernier modèle, aussi bien avec l'administration dans les heures qui précèdent que dans les heures qui suivent l'induction de l'ischémie. Aussi frustrant qu'il soit, le scepticisme soulevé par notre travail ne fait que souligner à nos yeux son intérêt et son importance. Nous apportons un faisceau d'observations expérimentales concordantes qui mettent en lumière que la conception courante sur laquelle est basée l'utilisation thérapeutique des IEC dans la prévention cérébrovasculaire est, sinon erronée, considérablement réductrice. La vision actuelle, hémianopsique, qui consiste à considérer que les sartans ont le même

mécanisme d'action que les IEC, méconnaît le potentiel qu'offre la stimulation des récepteurs non-AT<sub>1</sub> et représente un obstacle conceptuel majeur à une investigation pertinente, expérimentale et clinique, qui permettrait de définir avec précision les avantages respectifs de l'une et l'autre classe en fonction des situations pathologiques précises. Nos résultats obtenus chez la gerbille illustrent comment la conception plus équilibrée que nous proposons de la physiologie du système rénine - angiotensine et de sa pharmacologie ouvrent directement sur des progrès « translationnels » cliniques. Le bénéfice spectaculaire conféré par l'association thérapeutique de l'érythropoïétine et de l'olmesartan dans le post AVC, tant sur la mortalité que sur les séquelles cognitives à moyen terme supporte directement les espoirs suscités par ce concept. Les échecs répétés des tentatives multiples de traduire en progrès clinique les effets protecteurs, parfois marqués, de différentes substances dans des modèles expérimentaux animaux invitent à la prudence. Cependant, l'érythropoïétine comme les sartans se distinguent de l'ensemble de ces molécules puisque dans les deux cas, une étude pilote suggère que leurs propriétés protectrices dans le post AVC sont bel et bien présentes chez l'Homme. Si tel est le cas, alors il est légitime d'attendre que leur synergie (mise en évidence dans un modèle expérimental animal dans lequel le délai de leur administration après l'AVC est compatible avec une utilisation clinique), ait de la même façon une traduction au cours de leur utilisation chez l'Homme. Au-delà de l'intérêt potentiel majeur dans le traitement de l'AVC ischémique à sa phase aiguë, ces résultats ouvrent une voie thérapeutique possible à d'autres situations. Le bénéfice marqué sur les fonctions cognitives conféré par l'olmesartan dans un modèle d'ischémie cérébrale aiguë entraînant un infarctus massif laisse envisager qu'un traitement chronique puisse aussi être protecteur vis-à-vis des microépisodes ischémiques répétés qui font le lit de la démence vasculaire, et pour une part celui de la maladie d'Alzheimer. Il est à cet égard important de souligner que l'élévation des taux circulants d'angiotensine IV induite par le candesartan est toujours présente sans amortissement après trois mois de traitement chez l'Homme comme chez le rat.

## Bibliographie

- AbdAlla S, Lothar H, Langer A, el Faramawy Y et Quitterer U. (2004) Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell*, **119**(3), 343-354.
- Achard JM, Fournier A, Mazouz H, Caride VJ, Penar PL et Fernandez L. (2001) Protection against ischemia : a physiological function of the renin angiotensin system. *Biochem Pharmacol*, **62**, 261-271.
- Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM et Chai SY. (2001) Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*, **276**(52), 48623-48626.
- Albiston AL, Pederson ES, Burns P, Purcell B, Wright JW, Harding JW, Mendelsohn FA, Weisinger RS et Chai SY. (2004) Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms. *Behav Brain Res*, **154**(1), 239-243.
- ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. (2002) Major outcomes in High-Risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic. *JAMA*, **288**(23), 2981-2997.
- Ardailou R et Michel JB. (1999) The relative roles of circulating and tissue renin angiotensin systems. *Nephrol Dial Transplant*, **14**, 283-286.
- Arribas SM, Gordon JF, Daly CJ, Dominiczak AF et McGrath JC. (1996) Confocal microscopic characterization of a lesion in a cerebral vessel of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Stroke*, **27**(6), 1118-1122.
- Arruda RM, Peotta VA, Meyrelles SS et Vasquez EC. (2005) Evaluation of Vascular Function in Apolipoprotein E Knockout Mice With Angiotensin-Dependent Renovascular Hypertension. *Hypertension*, sous presse.
- Babamusta F, Rateri DL, Moorleghen JJ, Howatt DA, Li XA et Daugherty A. (2005) Angiotensin II infusion induces site-specific intra-laminar hemorrhage in macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Atherosclerosis*, sous presse.

- Barber MN, Sampey DB et Widdop RE. (1999) AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension*, **34**(5), 1112-1116.
- Blume A, Funk A, Gohlke P, Unger T et Culman J. (2000) AT2 receptor inhibition in the rat brain reverses the beneficial of AT1 receptor blockade on neurological outcome after focal brain ischemia. *Hypertension*, **36**, 256 (abstract).
- Brosnihan KB, Li P et Ferrario CM. (1996) Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*, **27**(3 Pt 2), 523-528.
- Brown MJ et Brown J. (1986) Does angiotensin II protect against strokes ? *Lancet*, **2**(8504), 427-429.
- Brownfield MS, Reid IA, Ganten D et Ganong WF. (1982) Differential distribution of immunoreactive angiotensin and angiotensin-converting enzyme in rat brain. *Neuroscience*, **7**(7), 1759-1769.
- Brunner HR et Gavras H. (2002) Angiotensin blockade for hypertension : a promise fulfilled - commentary. *Lancet*, **359**(9311), 990-992.
- Bunnemann B, Fuxe K, Metzger R, Bjelke B et Ganten D. (1992) The semi-quantitative distribution and cellular localization of angiotensinogen mRNA in the rat brain. *J Chem Neuroanat*, **5**(3), 245-262.
- Capobianco E, Jawerbaum A, White V, Pustovrh C, Sinner D et Gonzalez ET. (2003) Elevated levels of endothelin-1 and prostaglandin E2 and their effect on nitric oxide generation in placental tissue from neonatal streptozotocin-induced diabetic rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **68**(3), 225-231.
- Celerier J, Cruz A, Lamande N, Gasc JM et Corvol P. (2002) Angiotensinogen and its cleaved derivatives inhibit angiogenesis. *Hypertension*, **39**(2), 224-228.
- Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI et Ferrario CM. (1989) Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem*, **264**(28), 16518-16523.
- Chappell MC, Pirro NT, Sykes A et Ferrario CM. (1998) Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, **31**(1 Pt 2), 362-367.
- Chen S, Patel JM et Block ER. (2000) Angiotensin IV-mediated pulmonary artery vasorelaxation is due to endothelial intracellular calcium release. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**(5), L849-L856.

- Chevillard C et Saavedra JM. (1982) Distribution of angiotensin-converting enzyme activity in specific areas of the rat brain stem. *J Neurochem*, **38**(1), 281-284.
- 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**(1), 196-203.
- Cooper R, Cutler J, Desvigne-Nickens P, Fortmann SP, Friedman L, Havlik R, Hogelin G, Marler J, McGovern P, Morosco G, Mosca L, Pearson T, Stamler J, Stryer D et Thom T. (2000) Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the United States: findings of the national conference on cardiovascular disease prevention. *Circulation*, **102**(25), 3137-3147.
- Culman J, Baulmann J, Blume A et Unger T. (2001) The renin-angiotensin system in the brain: an update. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, **2**(2), 96-102.
- Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S et Wedel H. (2002) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*, **359**(9311), 995-1003.
- Dai WJ, Funk A, Herdegen T, Unger T et Culman J. (1999) Blockade of central angiotensin AT1 receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke*, **30**, 2391-2399.
- Dalmay F, Mazouz H, Allard J, Pesteil F, Achard JM et Fournier A. (2001a) Non AT1-receptor-mediated protective effect of angiotensin against acute ischaemic stroke in the gerbil. *JRAAS*, **2**, 103-106.
- Dalmay F, Pesteil F, Allard J, Nisse-Durgeat S, Fernandez L, Fournier A et Achard JM. (2001b) Angiotensin IV decreases acute stroke mortality in the gerbil. *Hypertension*, **14**(4), 56A (abstract).
- Davisson RL, Yang G, Beltz TG, Cassell MD, Johnson AK et Sigmund CD. (1998) The brain renin-angiotensin system contributes to the hypertension in mice containing both the human renin and human angiotensinogen transgenes. *Circ Res*, **83**(10), 1047-1058.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW et Unger T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, **52**(3), 415-472.

- de Paolis P, Porcellini A, Gigante B, Giliberti R, Lombardi A, Savoia C, Rubattu S et Volpe M. (1999) Modulation of the AT2 subtype receptor gene activation and expression by the AT1 receptor in endothelial cells. *J Hypertens*, **17**(12 Pt 2), 1873-1877.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE et Acton S. (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, **87**(5), E1-E9.
- Dzau VJ. (1984) Vascular wall renin-angiotensin pathway in control of the circulation. A hypothesis. *Am J Med*, **77**(4A), 31-36.
- Dzau VJ. (2001) Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*, **37**(4), 1047-1052.
- Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D et Weber M. (2002) Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther*, **16**(2), 149-160.
- 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**(6), 2334-2338.
- Fasciolo JC. (1990) The experimental observation that led to discovery of angiotensin. 1939 Buenos Aires, Argentina. *Hypertension*, **16**, 194-198.
- Fernandez LA, Caride VJ, Stromberg C, Naveri L et Wicke JD. (1994) Angiotensin AT2 receptor stimulation increases survival in gerbils with abrupt unilateral carotid ligation. *J Cardiovasc Pharmacol*, **24**(6), 937-940.
- Fernandez LA, Caride VJ, Twickler J et Galaray RE. (1982) Renin-angiotensin and development of collateral circulation after renal ischemia. *Am J Physiol*, **243**, H869-H8675.
- Fernandez LA, Spencer DD et Kaczmar T. (1986) Angiotensin II decreases mortality rate in gerbils with unilateral carotid ligation. *Stroke*, **17**(1), 82-85.
- Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB et Diz DI. (1997) Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, **30**(3 Pt 2), 535-541.



- Ferrario CM et Iyer SN. (1998) Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept*, **78**(1-3), 13-8.
- Fournier A et Achard JM. (2004) Clinical relevance of the AT<sub>2</sub>-receptor mediated brain antiischemic mechanisms evidenced by primary and secondary stroke prevention trials in patients. *J Hypertens*, **XXII**(suppl 1), 85S (abstract 290).
- Fournier A, Achard JM, Boutitie F, Mazouz H, Mansour J, Oprisiu R, Fernandez L et Messerli F. (2004a) Is the Angiotensin II type 2 receptor cerebroprotective? *Curr Hypertens Rep*, **6**(3), 182-189.
- Fournier A, Messerli FH, Achard JM et Fernandez L. (2004b) Cerebroprotection mediated by angiotensin II: a hypothesis supported by recent randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*, **43**(8), 1343-1347.
- Fournier A, Oprisiu R, Andrejak M, Godefroy O, Rosa A et Achard JM. (2002a) Age-adjusted stroke incidence increase: could angiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonists enhance stroke prevention? *Stroke*, **33**(3), 881-882.
- Fournier A, Oprisiu R et Mazouz H. (2002b) Stroke death rate annual decrease reversal and prescription decrease of antihypertensive drugs stimulating angiotensin II formation. *Am J Hypertens*, **15**, 106A (abstract).
- Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM et Tallant EA. (1996) Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*, **28**(1), 104-107.
- Ganong WF. (1994) Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, **205**(3), 213-219.
- Gardiner SM, Kemp PA, March JE et Bennett T. (1993) Regional haemodynamic effects of angiotensin II (3-8) in conscious rats. *Br J Pharmacol*, **110**(1), 159-162.
- Garrison EA et Kadowitz PJ. (1996) Analysis of responses to angiotensin I-(3-10) in the hindlimb vascular bed of the cat. *Am J Physiol*, **270**(4 Pt 2), H1172-H1177.
- Gigante B, Piras O, De Paolis P, Porcellini A, Natale A et Volpe M. (1998) Role of the angiotensin II AT<sub>2</sub>-subtype receptors in the blood pressure-lowering effect of losartan in salt-restricted rats. *J Hypertens*, **16**(12 Pt 2), 2039-2043.
- Gohlke P, Kox T, Jurgensen T, von Kugelgen S, Rascher W, Unger T et Culman J. (2002) Peripherally applied candesartan inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **365**(6), 477-483.

- Goldblatt H, Linch J, Hanzal RF et Summerville WW. (1934) Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*, **59**, 347–379.
- Grantcharova E, Furkert J, Reusch HP, Krell HW, Papsdorf G, Beyermann M, Schulein R, Rosenthal W et Oksche A. (2002) The extracellular N terminus of the endothelin B (ETB) receptor is cleaved by a metalloprotease in an agonist-dependent process. *J Biol Chem*, **277**(46), 43933-43941.
- Groth W, Blume A, Gohlke P, Unger T et Culman J. (2003) Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J Hypertens*, **21**(11), 2175-2182.
- Haberl RL. (1994) Role of angiotensin receptor subtypes in the response of rabbit brain arterioles to angiotensin. *Stroke*, **25**(7), 1476-1479 ; discussion 1480.
- Haberl RL, Anneser F, Villringer A et Einhaupl KM. (1990) Angiotensin II induces endothelium-dependent vasodilation of rat cerebral arterioles. *Am J Physiol*, **258**(6 Pt 2), H1840-H1846.
- Haberl RL, Decker-Hermann PJ et Hermann K. (1996) Effect of renin on brain arterioles and cerebral blood flow in rabbits. *J Cereb Blood Flow Metab*, **16**(4), 714-719.
- Haberl RL, Decker PJ et Einhaupl KM. (1991) Angiotensin degradation products mediate endothelium-dependent dilation of rabbit brain arterioles. *Circ Res*, **68**(6), 1621-1627.
- Hanson L, Lindholm L, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmäki K, Dahlöf B, de Faire U, Mörlin C, Karlberg BE, Wester PO, Björck JE et for the Captopril Prevention Project (CAPPP) study group. (1999) Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension : the captopril prevention project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*, **353**, 611-616.
- Healy DP et Printz MP. (1984) Distribution of immunoreactive angiotensin II, angiotensin I, angiotensinogen and renin in the central nervous system of intact and nephrectomized rats. *Hypertension*, **6**(2 Pt 2), I130-I136.
- Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. (2000) Effects of angiotensin - converting-enzyme inhibitor on death from cardiovascular causes, myocardial infarction and stroke in high-risk patients. *New Engl J Med*, **342**, 145-153.

- Hermann K, McDonald W, Unger T, Lang RE et Ganten D. (1984) Angiotensin biosynthesis and concentrations in brain of normotensive and hypertensive rats. *J Physiol (Paris)*, **79**(6), 471-480.
- Hoe KL, Armando I, Baiardi G, Sreenath T, Kulkarni A, Martinez A et Saavedra JM. (2003) Molecular cloning, characterization, and distribution of the gerbil angiotensin II AT2 receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **285**(6), R1373-R1383.
- Hohle S, Spitznagel H, Rascher W, Culman J et Unger T. (1995) Angiotensin AT1 receptor-mediated vasopressin release and drinking are potentiated by an AT2 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, **275**(3), 277-282.
- Horiuchi M, Akishita M et Dzau VJ. (1998) Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res*, **24**(3-4), 307-314.
- Howard G, Howard VJ, Katholi C, Oli MK et Huston S. (2001) Decline in US stroke mortality: an analysis of temporal patterns by sex, race, and geographic region. *Stroke*, **32**(10), 2213-2220.
- Humpel C, Lippoldt A, Stromberg I, Bygdeman M, Wagner J, Hilgenfeldt U, Ganten D, Fuxe K et Olson L. (1994) Human angiotensinogen is highly expressed in astrocytes in human cortical grafts. *Glia*, **10**(3), 186-192.
- Husain A, Smeby RR, Krontiris-Litowitz J et Speth RC. (1981) Brain renin: localization in rat brain synaptosomal fractions. *Brain Res*, **222**(1), 182-186.
- 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**(6551), 748-750.
- Inagami T. (1982) Renin in the brain and neuroblastoma cells: an endogenous and intracellular system. *Neuroendocrinology*, **35**(6), 475-482.
- Iwai M, Chen R, Li Z, Shiuchi T, Suzuki J, Ide A, Tsuda M, Okumura M, Min LJ, Mogi M et Horiuchi M. (2005) Deletion of Angiotensin II Type 2 Receptor Exaggerated Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Null Mice. *Circulation*, sous presse.
- Iwai M, Liu H et Chen R. (2004) Important role of angiotensin II type 2 receptor in focal cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion : study using receptor gene deficient mice. *J Hypertens*, **22**(suppl 1), S9.
- Iyer SN, Averill DB, Chappell, M., Yamada K, Allred AJ et Ferrario CM. (2000) Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. *Hypertension*, **36**(3), 417-422.

- Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M et Hanley MR. (1988) The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*, **335**(6189), 437-440.
- James DE, Hiken J et Lawrence JC Jr. (1989) Isoproterenol stimulates phosphorylation of the insulin-regulatable glucose transporter in rat adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**(21), 8368-8372.
- Jin XQ, Fukuda N, Su JZ, Lai YM, Suzuki R, Tahira Y, Takagi H, Ikeda Y, Kanmatsuse K et Miyazaki H. (2002) Angiotensin II type 2 receptor gene transfer downregulates angiotensin II type 1a receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **39**(5), 1021-1027.
- Johren O, Imboden H, Hauser W, Maye I, Sanvito GL et Saavedra JM. (1997) Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes, and vasopressin in the mouse hypothalamus. *Brain Res*, **757**(2), 218-227.
- Juillerat-Jeanneret L, Lohm S, Hamou MF et Pinet F. (2000) Regulation of aminopeptidase A in human brain tumor vasculature: evidence for a role of transforming growth factor-beta. *Lab Invest*, **80**(6), 973-980.
- Kakinuma Y, Hama H, Sugiyama F, Goto K, Murakami K et Fukamizu A. (1997) Anti-apoptotic action of angiotensin fragments to neuronal cells from angiotensinogen knock-out mice. *Neurosci Lett*, **232**(3), 167-170.
- Kakinuma Y, Hama H, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Murakami K et Fukamizu A. (1998) Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nat Med*, **4**(9), 1078-1080.
- Kaliszewski C, Fernandez LA et Wicke JD. (1988) Differences in mortality rate between abrupt and progressive carotid ligation in the gerbil : role of endogenous angiotensin II. *J Cerebral Blood Flow and Metab*, **8**, 149-154.
- Katusic ZS, Shepherd JT et Vanhoutte PM. (1986) Oxytocin causes endothelium-dependent relaxations of canine basilar arteries by activating V1-vasopressinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **236**(1), 166-170.
- Kawaguchi H, Sawa H et Yasuda H. (1991) Effect of endothelin on angiotensin converting enzyme activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J Hypertens*, **9**(2), 171-174.
- Keller SR. (2003) The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of glut4. *Front Biosci*, **8**, S410-S420.

- Keller SR, Scott HM, Mastick CC, Aebersold R et Lienhard GE. (1995) Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *J Biol Chem*, **270**(40), 23612-23618.
- Klungel OH, Heckbert SR, Longstreth WT Jr, Furberg CD, Kaplan RC, Smith NL, Lemaitre RN, Leufkens HG, de Boer A et Psaty BM. (2001) Antihypertensive drug therapies and the risk of ischemic stroke. *Arch Intern Med*, **161**(1), 37-43.
- Kramar EA, Harding JW et Wright JW. (1997) Angiotensin II- and IV-induced changes in cerebral blood flow. Roles of AT1, AT2, and AT4 receptor subtypes. *Regul Pept*, **68**(2), 131-138.
- Kramar EA, Krishnan R, Harding JW et Wright JW. (1998) Role of nitric oxide in angiotensin IV-induced increases in cerebral blood flow. *Regul Pept*, **74**(2-3), 185-192.
- Krebs LT, Kramar EA, Hanesworth JM, Sardinia MF, Ball AE, Wright JW et Harding JW. (1996) Characterization of the binding properties and physiological action of divalinal-angiotensin IV, a putative AT4 receptor antagonist. *Regul Pept*, **67**(2), 123-130.
- Kumarathasan P, Goegan P et Vincent R. (2001) An automated high-performance liquid chromatography fluorescence method for the analyses of endothelins in plasma samples. *Anal Biochem*, **299**(1), 37-44.
- Lawes CM, Bennett DA, Feigin VL et Rodgers A. (2004) Blood pressure and stroke: an overview of published reviews. *Stroke*, **35**(3), 776-785.
- Le MT, Vanderheyden PM, Szaszak M, Hunyady L et Vauquelin G. (2002) Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation. *J Biol Chem*, **277**(26), 23107-23110.
- Lee J, Albiston AL, Allen AM, Mendelsohn FA, Ping SE, Barrett GL, Murphy M, Morris MJ, McDowall SG et Chai SY. (2004) Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats. *Neuroscience*, **124**(2), 341-349.
- Lenfant C et Roccella EJ. (1999) A call to action for more aggressive treatment of hypertension. *J Hypertens Suppl*, **17**(1), S3-S7.

- Lew RA, Mustafa T, Ye S, McDowall SG, Chai SY et Albiston AL. (2003) Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). *J Neurochem.*, **86**(2), 344-350.
- Li J, Culman J, Hortnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U et Unger T. (2005) Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J*, **19**(6), 617-619.
- Li JS, Touyz RM et Schiffrin EL. (1998) Effects of AT1 and AT2 angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*, **31**(1 Pt 2), 487-492.
- Li Q, Zhang L, Pfaffendorf M et van Zwieten PA. (1995) Comparative effects of angiotensin II and its degradation products angiotensin III and angiotensin IV in rat aorta. *Br J Pharmacol*, **116**(7), 2963-2970.
- Lind RW et Ganten D. (1990) *Neuropeptides in the CNS*.
- Lind RW, Swanson LW et Ganten D. (1984) Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat. *Brain Res*, **321**(2), 209-215.
- Llorens-Cortes C et Mendelsohn FA. (2002) Organisation and functional role of the brain angiotensin system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, **3** (Suppl 1), S39-S48.
- Loufrani L, Henrion D, Chansel D, Ardaillou R et Levy BI. (1999) Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*, **291**(2), 583-588.
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J et Unger T. (1998) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med*, **188**(4), 661-670.
- Magy L, Vincent F, Faure S, Messerli FH, Wang JG, Achard JM et Fournier A (2005) The renin-angiotensin system : evolving pharmacological perspectives for cerebroprotection, *Current Pharmaceutical Design*, **11**, sous presse.
- Makino I, Shibata K, Ohgami Y, Fujiwara M et Furukawa T. (1996) Transient upregulation of the AT2 receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain. *Neuropeptides*, **30**(6), 596-601.
- Maktabi MA, Todd MM et Stachovic G. (1995) Angiotensin II contributes to cerebral vasodilatation during hypoxia in the rabbit. *Stroke*, **26**(10), 1871-1876.
- Maley BE. (1996) Immunohistochemical localization of neuropeptides and neurotransmitters in the nucleus solitarius. *Chem Senses*, **21**(3), 367-376.

- Matsumoto H, Nagasaka T, Hattori A, Rogi T, Tsuruoka N, Mizutani S et Tsujimoto M. (2001) Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. *Eur J Biochem*, **268**(11), 3259-3266.
- Matsumoto H, Rogi T, Yamashiro K, Kodama S, Tsuruoka N, Hattori A, Takio K, Mizutani S et Tsujimoto M. (2000) Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem*, **267**(1), 46-52.
- McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FA et Chai SY. (2003) The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**(6), 901-918.
- McKinley MJ, Allen AM, Mathai ML, May C, McAllen RM, Oldfield BJ et Weisinger RS. (2001) Brain angiotensin and body fluid homeostasis. *Jpn J Physiol*, **51**(3), 281-289.
- Methot D, Silversides DW et Reudelhuber TL. (1999) In vivo enzymatic assay reveals catalytic activity of the human renin precursor in tissues. *Circ Res*, **84**(9), 1067-1072.
- Michel JB. (2004) Tissue consequence of renin-angiotensin system activation. *Bull Acad Natl Med*, **188**(4):611-619.
- Mies G, Olah L et Walther T. (2004) Angiotensin II AT2 receptor deletion increases ischemic injury in experimental stroke. *Stroke*, **35**, 235.
- Milsted A, Barna BP, Ransohoff RM, Brosnihan KB et Ferrario CM. (1990) Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**(15), 5720-5723.
- Mima T, Yanagisawa M, Shigeno T, Saito A, Goto K, Takakura K et Masaki T. (1989) Endothelin acts in feline and canine cerebral arteries from the adventitial side. *Stroke*, **20**(11), 1553-1556.
- Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME, Gilbert RE, Bertram JF, Shahinfar S, Skinner SL et Wilkinson-Berka JL. (2000) Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, **36**(6), 1099-1104.
- Morimoto S, Cassell MD et Sigmund CD. (2002) Glia- and neuron-specific expression of the renin-angiotensin system in brain alters blood pressure, water intake, and salt preference. *J Biol Chem*, **277**(36), 33235-33241.
- MRC Working Party. (1985) MRC trial of treatment of mild hypertension. Principal results. *Br Med J*, **291**, 97-104 (metaanalysis *Br Med J*, 1988, **296**, 1565-1570).

- MRC Working Party. (1992) Medical Research Council trial of treatment of hypertension in older adults. Principal results. *Br Med J*, **304**, 405-412.
- Naveri L, Stromberg C et Saavedra JM. (1994) Angiotensin IV reverses the acute cerebral blood flow reduction after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, **14**(6), 1096-1099.
- Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E et Sraer JD. (1996) Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney Int*, **50**(6), 1897-1903.
- Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T et Sraer JD. (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*, **109**(11), 1417-1427.
- 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**(1), 46-54.
- Oudart N. (2005) The renin-angiotensin system: current data. *Ann Pharm Fr*, **63**(2), 144-153.
- Patel JM, Martens JR, Li YD, Gelband CH, Raizada MK et Block ER. (1998) Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation. *Am J Physiol*, **275**(6 Pt 1), L1061-L1068.
- Patel TR, Galbraith S, Graham DI, Hallak H, Doherty AM et McCulloch J. (1996) Endothelin receptor antagonist increases cerebral perfusion and reduces ischaemic damage in feline focal cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, **16**(5), 950-958.
- PATS collaborating group. (1995) Post-stroke Antihypertensive Study. *Chinese Med J*, **108**, 710-717.
- Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJV, Michelson EL, Olofsson B, Östergren J, Yusuf S et for the CHARM Investigators and Committees. (2003) Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet*, **362**, 759-766.
- Phillips MI. (1987) Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, **49**, 413-435.
- Pickel VM et Chan J. (1995) Co-localization of angiotensin II and gamma-aminobutyric acid in axon terminals in the rat subfornical organ. *Neurosci Lett*, **193**(2), 89-92.
- Prescott G, Silversides DW et Reudelhuber TL. (2002) Tissue activity of circulating prorenin. *Am J Hypertens*, **15**(3), 280-285.



- Printz MP. (1988) Regulation of the brain angiotensin system: a thesis of multicellular involvement. *Clin Exp Hypertens A*, **10**(1), 17-35.
- PROGRESS collaborative group. (2001) Randomized trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet*, **358**, 1033-1041.
- Psaty BM, Smith NL, Siscovick DS et Furberg CD. (1997) Health outcomes associated with antihypertensive therapies used as just live agents. A systematic review and metaanalysis. *JAMA*, **277**, 739-745.
- Reaux A, Fournie-Zaluski MC, David C, Zini S, Roques BP, Corvol P et Llorens-Cortes C. (1999) Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**(23), 13415-13420.
- Reaux A, Fournie-Zaluski MC et Llorens-Cortes C. (2001) Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*, **12**(4), 157-162.
- Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S et Tomoda Y. (1996) Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *J Biol Chem*, **271**(1), 56-61.
- Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M et Pessina AC. (1999) Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res*, **43**(2), 300-307.
- Rozenfeld R, Reaux A, Iturrioz X, Fassot C, Fournie-Zaluski MC, David C, Maigret B, Roque BP, Corvol P et Llorens-Cortes C. (2003) Aminopeptidase A, generating one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, plays a key role in central control of blood pressure. *Proc West Pharmacol Soc*, **46**, 39-44.
- Saavedra JM. (1992) Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev*, **13**(2), 329-380.
- Saavedra JM, Fernandez-Pardal J et Chevillard C. (1982) Angiotensin-converting enzyme in discrete areas of the rat forebrain and pituitary gland. *Brain Res*, **245**(2), 317-325.
- Santos A, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues AR et Gropen C. (1994) Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*, **35**(4), 293-298.
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ et Andrade SP. (2000) Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*, **91**(1-3), 45-62.

- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R et Walther T. (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**(14), 8258-8263.
- Sarti C, Rastenyte D, Cepaitis Z et Tuomilehto J. (2001) International trends in mortality from stroke, 1968 to 1994. *Stroke*, **31**, 1588-1601.
- Schrader J, Luders S, Kulschewski A, Berger J, Zidek W, Treib J, Einhaupl K, Diener HC et Dominiak P. (2003) The ACCESS Study: evaluation of Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. *Stroke*, **34**(7), 1699-1703.
- Schrader J, Luders S, Kulschewski A, Hammersen F, Plate K, Berger J, Zidek W, Dominiak P et Diener HC. (2005) Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared with Nitrendipine for Secondary Prevention: principal results of a prospective randomized controlled study (MOSES). *Stroke*, **36**(6), 1218-1226.
- Shibasaki Y, Mori Y, Tsutumi Y, Masaki H, Sakamoto K, Murasawa S, Maruyama K, Moriguchi Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M et Matsubara H. (1999) Differential kinetics of circulating angiotensin IV and II after treatment with angiotensin II type 1 receptor antagonist and their plasma levels in patients with chronic renal failure. *Clin Nephrol*, **51**(2), 83-91.
- Singh EA et McGeer EG. (1979) Postnatal activity of angiotensin converting enzyme in rat brain. *Dev Neurosci*, **2**(5), 245-248.
- Siren AL, Lewczuk P, Hasselblatt M, Dembowski C, Schilling L et Ehrenreich H. (2002) Endothelin B receptor deficiency augments neuronal damage upon exposure to hypoxia-ischemia in vivo. *Brain Res*, **945**(1), 144-149.
- Strawn WB, Ferrario CM et Tallant EA. (1999) Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension*, **33**(1 Pt 2), 207-211.
- Suzuki Y, Satoh S, Kimura M, Oyama H, Asano T, Shibuya M et Sugita K. (1992) Effects of vasopressin and oxytocin on canine cerebral circulation in vivo. *J Neurosurg*, **77**(3), 424-431.
- Suzuki Y, Satoh S, Oyama H, Takayasu M et Shibuya M. (1993) Regional differences in the vasodilator response to vasopressin in canine cerebral arteries in vivo. *Stroke*, **24**(7), 1049-1053.

- Tan J, Wang JM et Leenen FH. (2005) Inhibition of brain angiotensin-converting enzyme by peripheral administration of trandolapril versus lisinopril in Wistar rats. *Am J Hypertens*, **18**(2 Pt 1), 158-164.
- Thomas WG et Mendelsohn FA. (2003) Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**(6), 774-779.
- Thomas WG et Sernia C. (1988) Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat brain. *Neuroscience*, **25**(1), 319-341.
- Tigerstedt R et Bergman PG. (1898) Niere und Kreilauf. *Skand Arch Physiol*, **8**, 223–271.
- Tschope C, Spillmann F, Altmann C, Koch M, Westermann D, Dhayat N, Dhayat S, Bascands JL, Gera L, Hoffmann S, Schultheiss HP et Walther T. (2004) The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, **61**(3), 559-569.
- Unger T. (1999) The angiotensin II type 2 receptor : variations on an enigmatic theme. *J Hypertension*, **17**, 1775-1786.
- Veniant M, Menard J, Bruneval P, Morley S, Gonzales MF et Mullins J. (1996) Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *J Clin Invest*, **98**(9), 1966-1970.
- Viswanathan M et Saavedra JM. (1992) Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides*, **13**(4), 783-786.
- von Bohlen Und Halbach O. (2005) The renin-angiotensin system in the mammalian central nervous system. *Curr Protein Pept Sci*, **6**(4), 355-371.
- Wagenaar LJ, Voors AA, Buikema H, van Buiten A, Lubeck RH, Boonstra PW, van Veldhuisen DJ et van Gilst WH. (2002) Functional antagonism of different angiotensin II type I receptor blockers in human arteries. *Cardiovasc Drugs Ther*, **16**(4), 311-316.
- Walker AJ, Draeger A, Houssa B, van Blitterswijk WJ, Ohanian V et Ohanian J. (2001) Diacylglycerol kinase theta is translocated and phosphoinositide 3-kinase-dependently activated by noradrenaline but not angiotensin II in intact small arteries. *Biochem J*, **353**(Pt 1), 129-137.
- Walther T, Olah L, Harms C, Maul B, Bader M, Hortnagl H, Schultheiss HP et Mies G. (2002) Ischemic injury in experimental stroke depends on angiotensin II. *FASEB J*, **16**(2), 169-176.

- Wanebo JE, Arthur AS, Louis HG, West K, Kassell NF, Lee KS et Helm GA. (1998) Systemic administration of the endothelin-A receptor antagonist TBC 11251 attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: dose study and review of endothelin-based therapies in the literature on cerebral vasospasm. *Neurosurgery*, **43**(6), 1409-1417.
- Wang JM, Tan J et Leenen FH. (2003) Central nervous system blockade by peripheral administration of AT1 receptor blockers. *J Cardiovasc Pharmacol*, **41**(4), 593-599.
- 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**(1), 284-291.
- Whiting P, Nava S, Mozley L, Eastham H et Poat J. (1991) Expression of angiotensin converting enzyme mRNA in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **11**(1), 93-96.
- Wright JW et Harding JW. (1992) Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Rev*, **17**(3), 227-262.
- Wright JW et Harding JW. (1995) Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2, and AT4 and their functions. *Regul Pept*, **59**(3), 269-295.
- Wright JW, Stubley L, Pederson ES, Kramar EA, Hanesworth JM et Harding JW. (1999) Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning. *J Neurosci*, **19**(10), 3952-3961.
- Wu-Wong JR, Berg CE et Kramer D. (2000) Endothelin stimulates glucose uptake via activation of endothelin-A receptor in neonatal rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*, **36**(5 Suppl 1), S179-S183.
- Wu-Wong JR, Berg CE, Wang J, Chiou WJ et Fissel B. (1999) Endothelin stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation via activation of endothelin ETA receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **274**(12), 8103-8110.
- Yamada T, Horiuchi M et Dzau VJ. (1996) Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**(1), 156-160.
- Yamaguchi K, Negoro H, Hama H, Kamoi K et Sakaguchi T. (1979) A comparison between the effects of angiotensin II and angiotensin III injected into the third cerebral ventricle on vasopressin secretion in conscious rats (author's translation). *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*, **55**(10), 1286-1295.
- Zaman MA, Oparil S et Calhoun DA. (2002) Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov*, **1**(8), 621-636.

Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P et Llorens-Cortes C. (1996) Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**(21), 11968-11973.

# Table des matières

<b>Abréviations</b> .....	9
<b>1. LE SYSTÈME RÉNINE - ANGIOTENSINE</b> .....	12
1.1. INTRODUCTION.....	13
1.2. LE SYSTEME RENINE – ANGIOTENSINE : UN SYSTEME COMPLEXE.....	15
1.2.1. Métabolisme des angiotensines, peptides hormonaux .....	17
1.2.1.1. L'angiotensinogène.....	17
1.2.1.2. Les angiotensines II et III.....	19
1.2.1.3. L'angiotensine-(1-7).....	21
1.2.1.4. L'angiotensine IV .....	21
1.2.1.5. Localisation des composants du système rénine -angiotensine dans le cerveau. 22	
1.2.1.5.1. L'angiotensinogène .....	22
1.2.1.5.2. La rénine.....	22
1.2.1.5.3. L'angiotensine I.....	23
1.2.1.5.4. L'enzyme de conversion de l'angiotensine.....	23
1.2.1.5.5. L'angiotensine II .....	24
1.2.1.5.6. L'angiotensine III.....	24
1.2.1.5.7. L'angiotensine IV.....	25
1.2.1.5.8. L'angiotensine-(1-7).....	25
1.2.1.5.9. Biosynthèse de l'angiotensine II dans le cerveau.....	25
1.2.2. Les récepteurs du système rénine - angiotensines.....	26
1.2.2.1. Récepteurs de la (pro) rénine .....	26
1.2.2.2. Récepteurs des angiotensines II et III .....	26
1.2.2.2.1. Récepteur AT <sub>1</sub> .....	27
1.2.2.2.2. Récepteur AT <sub>2</sub> .....	28
1.2.2.3. Récepteur de l'angiotensine-(1-7).....	30
1.2.2.4. Récepteur de l'angiotensine IV.....	31
1.2.2.5. Les récepteurs aux angiotensines dans le cerveau .....	34

1.2.3. Le système rénine - angiotensines : un système pléiotrope .....	35
1.3. DONNÉES EXPÉRIMENTALES POUR UN EFFET PROTECTEUR DES ANGIOTENSINES DURANT L'ISCHÉMIE AIGUË .....	39
1.3.1. Effet protecteur de l'angiotensine II dans l'ischémie aiguë du train arrière .....	39
1.3.2. Effet protecteur de l'angiotensine II au cours de l'ischémie cérébrale aiguë chez la gerbille.....	40
1.3.3. Effet protecteur de l'angiotensine II au cours de l'ischémie cérébrale aiguë chez d'autres espèces mammifères (souris, rat et lapin) .....	42
1.4. PERTINENCE CLINIQUE D'UN EFFET PROTECTEUR CÉRÉBRAL DÉPENDANT DE RÉCEPTEURS NON-AT <sub>1</sub> : LES LEÇONS DES GRANDS ESSAIS CLINIQUES .....	47
1.4.1. L'essai MRC .....	47
1.4.2. L'étude CAPP : « des résultats controversés » .....	48
1.4.3. PROGRESS et PATS : les arguments contre les inhibiteurs de l'ECA.....	48
1.4.4. ALLHAT : les diurétiques revisités .....	49
1.4.5. HOPE et PROGRESS : le « Bon et le Mauvais » .....	50
1.4.6. Le plateau de la mortalité par accident vasculaire cérébral .....	52
1.4.7. Sartans et protection cérébrale : les promesses de LIFE, MOSES et ACCESS.....	52
1.5. CONCLUSION .....	55
<b>2. ETUDES RÉALISÉES .....</b>	<b>57</b>
2.1. INTRODUCTION .....	58
2.2. <b>PREMIÈRE PARTIE : MISE EN ÉVIDENCE DES EFFETS CEREBROPROTECTEURS DE L'ANGIOTENSINE IV .....</b>	<b>59</b>
2.2.1. <b>Première étude :</b> Effet protecteur de l'angiotensine IV dans l'accident vasculaire cérébral ischémique expérimental médié par les récepteurs AT <sub>2</sub> et AT <sub>4</sub> .....	59
2.2.2. <b>Deuxième étude :</b> Effets protecteurs synergiques de l'érythropoïétine et de l'olmesartan sur la survie et les altérations de la mémoire suite à un accident vasculaire cérébral chez la gerbille.....	87
2.3. <b>DEUXIÈME PARTIE : ETUDE DES MECANISMES DE PROTECTION DE L'ANGIOTENSINE IV .</b>	<b>109</b>
2.3.1. <b>Troisième étude :</b> Effet vasoconstricteur de l'angiotensine IV sur l'artère basilaire de rat indépendant des récepteurs AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub> .....	109

2.3.2. <b>Quatrième étude</b> : L'angiotensine IV inhibe le catabolisme de l'endothéline-1 médié par l'Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP) induit par l'endothéline-1 sur l'artère basilaire de rat .....	137
2.3.2.1. Introduction .....	137
2.3.2.2. Matériel et méthodes .....	140
2.3.2.2.1. Translocation d'IRAP à la membrane en réponse à l'ET-1 .....	140
2.3.2.2.2. Dégradation de l'ET-1 par IRAP .....	141
2.3.2.3. Résultats .....	143
2.3.2.3.1. Translocation d'IRAP à la membrane .....	143
2.3.2.3.2. Effet de l'Ang-IV sur le métabolisme de l'ET-1 par l'artère basilaire <i>ex vivo</i> .....	144
2.3.2.4. Discussion .....	151
<b>3. DISCUSSION</b> .....	155
<b>Bibliographie</b> .....	166