AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

ECOLE DOCTORALE BioSE
BIOLOGIE - SANTÉ - ENVIRONNEMENT

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Marie Lynda BOURESSAM**

Importance de la *S*-nitrosation des récepteurs cérébrovasculaires de l'angiotensine II

Le 4 juillet 2018

Membres du jury :

Rapporteurs	**Mme Isabelle MARGAILL**	**PR, EA4475, Université Paris Descartes, Paris**
	Mr Daniel HENRION	**DR, INSERM 1083 – UMR CNRS 6015, Université d'Angers, Angers**
Examinateurs	**Mme Isabelle LARTAUD**	**PR, Université de Lorraine, CITHEFOR, Nancy, Directrice de thèse**
	Mr François DUPUIS	**MCU, Université de Lorraine, CITHEFOR, Co-directeur de thèse,**
Membre invité	**Mr Arnaud BIANCHI**	**IR1, UMR CNRS 7365, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy**

EA 3452 CITHEFOR : Cibles Thérapeutiques, Formulation et Expertise Préclinique du Médicament

5, rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

ECOLE DOCTORALE BioSE
BIOLOGIE - SANTÉ - ENVIRONNEMENT

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Marie Lynda BOURESSAM**

Importance de la *S*-nitrosation des récepteurs cérébrovasculaires de l'angiotensine II

Le 4 juillet 2018

Membres du jury :

Rapporteurs	**Mme Isabelle MARGAILL**	**PR, EA4475, Université Paris Descartes, Paris**
	Mr Daniel HENRION	**DR, INSERM 1083 – UMR CNRS 6015, Université d'Angers, Angers**
Examinateurs	**Mme Isabelle LARTAUD**	**PR, Université de Lorraine, CITHEFOR, Nancy, Directrice de thèse**
	Mr François DUPUIS	**MCU, Université de Lorraine, CITHEFOR, Co-directeur de thèse,**
Membre invité	**Mr Arnaud BIANCHI**	**IR1, UMR CNRS 7365, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy**

EA 3452 CITHEFOR : Cibles Thérapeutiques, Formulation et Expertise Préclinique du Médicament

5, rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans l'aide précieuse de nombreuses personnes. Je souhaite donc exprimer mes vifs remerciements,

À Madame Isabelle MARGAILL, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

À Monsieur Daniel HENRION, pour avoir suivi l'évolution de ce travail, apporté de précieuses suggestions lors de nos différents échanges, et pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

À Monsieur Arnaud BIANCHI, pour avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse et pour vos conseils.

À mes directeurs de thèse, Madame Isabelle LARTAUD et Monsieur François DUPUIS.
Ce travail n'aurait bien évidemment pas abouti sans vous. Je vous remercie pour votre confiance depuis mon Master 1. Vous avez fait preuve d'un accompagnement sans faille qui m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Vous avez toujours été présents pour discuter de mes résultats, me donner de précieux conseils et m'encourager. Je mesure les progrès que j'ai réalisés à vos côtés et je tiens à vous exprimer ici ma profonde reconnaissance.

Aux personnes extérieures au laboratoire avec qui j'ai eu la chance de collaborer.
Madame Sandra LECAT, pour sa grande implication dans le projet et pour tout le travail que nous avons accompli ensemble. Je vous remercie de m'avoir accueillie à Strasbourg et de vous être montrée si disponible. Nos nombreux échanges ont été très enrichissants pour moi. Merci beaucoup Sandra !
Madame Nathalie MERCIER, pour avoir accepté de collaborer avec nous sur les voies de signalisation. Je te remercie également pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes conseils.
Messieurs Benjamin MEYER, Alessandro GENONI, Manuel RUIZ-LOPEZ et Mostafa KOUACH qui nous ont apporté leurs expertises concernant la chimie théorique, la modélisation moléculaire et la spectrométrie de masse.

À l'ensemble des membres de l'EA3452 CITHEFOR, et tout particulièrement,
Madame Caroline PERRIN-SARRADO, je te remercie Caroline pour ta bonne humeur quotidienne, ta gentillesse, tes conseils et ton implication dans ce projet.
Madame Caroline GAUCHER, pour tes nombreux conseils, tes questions toujours pertinentes qui m'ont permis d'avancer et ta disponibilité.
Madame Ariane BOUDIER, Messieurs Pierre LEROY, Igor CLAROT et Philippe GIUMMELLY
Mesdames Isabelle FRIES, Pascale CARNET et Nathalie DEGOUSEE
Ainsi que l'ensemble des doctorants que j'ai côtoyé, Wen, Eugenia, Hui, Arnaud, Haiyan, Romain, Yi et Justine.
Merci à toutes et tous pour votre aide et vos conseils.

À Valérie, Alexandre et Patrick pour leur aide mais aussi pour les bons moments passés en leurs compagnie au laboratoire.

À Madame Brigitte LEININGER-MULLER pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir l'enseignement pendant mon doctorat. Je remercie également Madame Natacha DREUMONT-SCHULLER, Messieurs Mohamed ZAIOU et Joël COULON avec qui j'ai eu la chance de travailler.

À mes ami(e)s, et tout particulièrement à Anne-Sophie qui m'a accompagnée pendant ces 3 ans et avec qui j'ai pu partager les difficultés d'une thèse.

À ma famille et surtout à mes parents qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mes choix.

Enfin je réserve le dernier mot à Saïgueck, je te remercie pour ton soutien indéfectible depuis toutes ces années, tes encouragements et pour la patience dont tu fais preuve lorsque tu m'écoutes parler d'AT_1 …

Tables des matières

TRAVAUX SCIENTIFIQUES 3

LISTE DES FIGURES 5

LISTE DES TABLES 6

LISTE DES ABREVIATIONS 7

INTRODUCTION GENERALE 9

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 13

I. LE MONOXYDE D'AZOTE 15
1) SYNTHESE ET ROLES DU MONOXYDE D'AZOTE 15
2) VOIES DE SIGNALISATION 18
a. Nitrosylation 18
b. Nitrosation 20
c. Nitration 22
3) LES DONNEURS DE MONOXYDE D'AZOTE 23
a. Les donneurs de monoxyde d'azote utilisés en thérapeutique 23
b. Développement de nouveaux donneurs de monoxyde d'azote 27
c. Article 1 : In vivo and in silico evaluation of a new nitric oxide donor, S,S'-dinitrosobucillamine 29

II. LE SYSTEME RENINE ANGIOTENSINE 45
1) PHYSIOLOGIE DU SYSTEME RENINE ANGIOTENSINE 46
2) LES RECEPTEURS AT_1 A L'ANGIOTENSINE II 55
a. Généralités 55
b. Structure et conformation 57
c. Voies de signalisation 64
3) LES RECEPTEURS AT_2 A L'ANGIOTENSINE II 71
a. Généralités 71
b. Structure et conformation 72
c. Voies de signalisation 74
4) *S*-NITROSATION DES RECEPTEURS A L'ANGIOTENSINE II ET INTERET AU NIVEAU CEREBROVASCULAIRE 79
a. Circulation cérébrale : généralités 79
b. Le système rénine angiotensine cérébrovasculaire 83
c. S-nitrosation d'AT_1 et AT_2 84

III. OBJECTIFS EXPERIMENTAUX 89

CHAPITRE 2 : TRAVAUX EXPERIMENTAUX 91

I. ASPECIFICITE DES ANTICORPS ANTI-AT_1 93

1) ETUDE EXPÉRIMENTALE, ARTICLE 2 : NO ANSWER TO THE LACK OF SPECIFICITY: MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY TARGETING THE ANGIOTENSIN II TYPE 1 RECEPTOR AT_1R FAILS TO RECOGNIZE ITS TARGET 93
2) PERSPECTIVES 102
II. REGULATIONS DES RECEPTEURS A L'ANGIOTENSINE II PAR *S*-NITROSATION 105
1) CONTEXTE ET OBJECTIFS 105
2) ÉTUDE EXPÉRIMENTALE, ARTICLE 3 : *S*-NITROSATION REGULATES ANGIOTENSIN II-DEPENDENT AND -INDEPENDENT AT_1 RESPONSES IN THE CEREBRAL CIRCULATION 107
3) PERSPECTIVES 141
III. IMPACT DE LA *S*-NITROSATION SUR LES EFFECTEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION D'AT_1 145
1) INTRODUCTION 145
2) DEMARCHE EXPERIMENTALE 146
3) LIMITES ET PERSPECTIVES 151
IV. IMPACT DE LA *S*-NITROSATION SUR LA VASODILATATION AT_2-DEPENDANTE 153
1) CONTEXTE ET OBJECTIF 153
2) DRAFT ARTICLE 4, *S*-NITROSATION DECREASES AT_2 MEDIATED VASODILATION OF MIDDLE CEREBRAL ARTERIES IN RATS. 154
3) LIMITES ET PERSPECTIVES 168
V. IMPACT DE LA S-NITROSATION SUR LA REPONSE FONCTIONNELLE A L'ANGIOTENSINE II DANS UN MODELE PHYSIOPATHOLOGIQUE D'HYPERTENSION ARTERIELLE 171
1) CONTEXTE ET OBJECTIFS 171
2) DRAFT ARTICLE 5, *S*-NITROSATION DECREASES ANGIOTENSIN II DEPENDENT VASOCONSTRICTION OF MIDDLE CEREBRAL ARTERIES DURING HYPERTENSION 172
3) PERSPECTIVES 184

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 187

1) PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION GENERALE 188
2) PERSPECTIVES DU PROJET 194

CONCLUSION 199

BIBLIOGRAPHIE 203

Travaux scientifiques

Publications

Acceptée :

Article 1 : Bouressam ML, Meyer B, Boudier A, Clarot I, Leroy P, Genoni A, Ruiz-Lopez M, Giummelly P, Liminana P, Salgues V, Kouach M, Perrin-Sarrado C, Lartaud I, Dupuis F**. *In vivo* and *in silico* evaluation of a new nitric oxide donor, *S,S'*- dinitrosobucillamine**. *Nitric Oxide*. 2017 71:32-43 (Facteur d'impact : 4,18).

Article 2 : Bouressam ML, Lartaud I, Dupuis F, Lecat S. **No answer to the lack of specificity; mouse monoclonal antibody targeting the angiotensin II type 1 receptor AT_1 fails to recognize its target.** Acceptée le 28 mai 2018 (Facteur d'impact : 2,56).

Soumise le 26/04/18 au British Journal of Pharmacology (Facteur d'impact : 5,49) :

Article 3 : Bouressam ML, Lecat S, Raoul A, Perrin-Sarrado C, Lartaud I, Dupuis F. ***S*-nitrosation regulates angiotensin II dependent and independent AT_1 responses in the cerebral circulation**.

Communications orales

Bouressam ML, Perrin-Sarrado C, Foulquier S, Unger T, Lartaud I, Dupuis F. ***S*-Nitrosation treatment decreases the AT2R-mediated vasodilatation of middle cerebral arteries in rats**. 35e Journées de l'Hypertension Artérielle, 17-18 Décembre 2015, Paris, France.

Bouressam ML, Perrin-Sarrado C, Foulquier S, Unger T, Lartaud I, Dupuis F. ***S*-nitrosation decreases the AT2R-mediated vasodilation of middle cerebral arteries in rats.** 20e Congrès SFPT, 19-21 avril 2016, Nancy, France.

Bouressam ML, Leroy P, Boudier A, Perrin-Sarrado C, Giummelly P, Lartaud I, Dupuis F. **Development of a new nitric oxide donor, *S,S'*-dinitrosobucillamine: from synthesis to *in vivo* evaluation**. NutriOx Meeting, 22-23 septembre 2016, Kaiserslautern, Allemagne.

Bouressam ML, Gaucher C, Perrin-Sarrado C, I Fries, Lartaud I, Dupuis F. **Physiological importance of cerebrovascular AT_1 receptors *S*-nitrosation.** 1ère journée scientifique du Pôle Biologie Médecine Santé, 7 juillet 2017, Nancy, France.

Bouressam ML, Raoul A, Gaucher C, Perrin-Sarrado C, I Fries, Lartaud I, Dupuis F. ***S*-nitrosation decreases AT_1 receptor mediated vasoconstriction and myogenic tone on rat middle cerebral arteries.** 21st annual meeting of the European Council for Cardiovascular Research, 20-22 octobre 2017, Poiano, Italie.

Communications affichées

Bouressam ML, Leroy P, Boudier A, Lartaud I, Dupuis F. ***S,S'*-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces hypotension at lower doses than each of its intrinsic component.** PS2-058, 19e Congrès SFPT, 21-23 avril 2015, Caen, France.

Bouressam ML, Perrin-Sarrado C, Foulquier S, Unger T, Lartaud I, Dupuis F. **Treatment by a *S*-nitrosothiol decreases the AT2R-mediated vasodilation of middle cerebral arteries in rats.** 19th annual meeting of the European Council for Cardiovascular Research, 23-25 octobre 2015, Poiano, Italie.

Bouressam ML, Bourcier A, Humbert M, Perrin-Sarrado C, Lartaud I, Dupuis F. **Abolition by *S*-nitrosation of the angiotensin II-response of middle cerebral arteries during high salt diet and hypertension.** PM1-031, 20e Congrès SFPT, 19-21 avril 2016, Nancy, France.

Bouressam ML, Raoul A, Gaucher C, Perrin-Sarrado C, I Fries, Lartaud I, Dupuis F. ***S*-nitrosation decreases AT_1 receptor mediated vasoconstriction and myogenic tone on rat middle cerebral arteries.** Printemps de la Cardiologie, 4-6 avril 2018, Montpellier, France.

Liste des figures

FIGURE 1 : PRODUCTION DE MONOXYDE D'AZOTE (NO) A PARTIR DE L-ARGININE PAR LES NO SYNTHASES (NOS) _____ 15

FIGURE 2 : CONSEQUENCES DE LA SYNTHESE DE MONOXYDE D'AZOTE PAR LES DIFFERENTES NO SYNTHASES _____ 17

FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ACTIVATION DE LA GCS PAR LE NO _____ 18

FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA *S*-NITROSATION D'UNE PROTEINE PAR DU NO _____ 20

FIGURE 5 : STRUCTURES CHIMIQUES DE (A) LA *N*-ACETYLPENICILLAMINE, (B) LA BUCILLAMINE ET (C) LA *N*-ACETYLCYSTEINE _____ 29

FIGURE 6 : DESCRIPTION DU SYSTEME RENINE ANGIOTENSINE _____ 46

FIGURE 7 : SCHEMA SIMPLIFIE DES MECANISMES D'ACTION DE L'ANGIOTENSINE II INDUISANT UNE AUGMENTATION DE PRESSION ARTERIELLE _____ 48

FIGURE 8 : SCHEMA DU SYSTEME RENINE ANGIOTENSINE INTEGRANT CERTAINS NOUVEAUX ACTEURS IDENTIFIES _____ 49

FIGURE 9 : PRINCIPAUX ROLES DES NOUVEAUX ACTEURS DU SYSTEME RENINE ANGIOTENSINE _____ 52

FIGURE 10 : COMPARAISON DES SEQUENCES D'ACIDES AMINES DES RECEPTEURS AT_1 (HUMAIN) ET AT_{1A}, AT_{1B} (RAT) _____ 56

FIGURE 11 : STRUCTURE DU RECEPTEUR AT_1 ET IMPLICATION DES DIFFERENTS ACIDES AMINES _____ 61

FIGURE 12 : ÉVOLUTION DE NOTRE COMPREHENSION DES SIGNALISATIONS PROTEINES G ET IMPLICATION DES β-ARRESTINES _____ 62

FIGURE 13 : VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUEES DANS LA VASOCONSTRICTION MEDIEE PAR AT_1 _____ 65

FIGURE 14 : REGULATION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE, DE LA DIFFERENTIATION ET DE L'APOPTOSE PAR LES RECEPTEURS AT_1 ___ 67

FIGURE 15 : CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS DU RECEPTEUR AT_1 SUITE A UNE ACTIVATION PAR UN STRESS MECANIQUE ____ 69

FIGURE 16 : STRUCTURE DU RECEPTEUR AT_2 _____ 72

FIGURE 17 : VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUEES DANS LA VASODILATATION MEDIEE PAR AT_2 _____ 76

FIGURE 18 : ACTIONS OPPOSEES MEDIEES PAR LES RECEPTEURS AT_1 ET AT_2 _____ 77

FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU POLYGONE DE WILLIS ET DE SA LOCALISATION _____ 79

FIGURE 20 : ZONES DU CERVEAU IRRIGUEES PAR LES DIFFERENTES ARTERES CEREBRALES _____ 80

FIGURE 21 : EFFET DU SNP ET DU GTPγS SUR LA LIAISON DE L'ANGIOTENSINE II A AT_1 (MODIFIE D'APRES LECLERC *ET AL*. 2006) _ 84

FIGURE 22 : SCHEMA ILLUSTRANT LE LIEN ENTRE LA STIMULATION DES RECEPTEURS AT_1, LA PRODUCTION D'EROS ET LA NITROSATION D'AT_2 _____ 87

FIGURE 23 : STRUCTURES DES ANTICORPS CONVENTIONNELS, A CHAINES LOURDES ET DES NANOBODIES _____ 103

FIGURE 24 : SCHEMA DU PROTOCOLE UTILISE POUR INDUIRE LA NITROSATION DES ARTERES CEREBRALES MOYENNES _____ 105

FIGURE 25 : VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR LES RECEPTEURS AT_1, α_1, TP ET $5HT_{1B}$ PERMETTANT LA VASOCONSTRICTION 106

FIGURE 26 : VARIATIONS ATTENDUES DES PHOSPHORYLATION DE PLCγ1 ET MYPT SUITE AU PRETRAITEMENT AVEC DU LOSARTAN OU DU GSNO _____ 147

FIGURE 27 : VISUALISATION PAR WESTERN BLOT DE LA PHOSPHORYLATION DE PLCγ1 ET MYPT APRES TRAITEMENT PAR ANGIOTENSINE II _____ 148

FIGURE 28 : VISUALISATION PAR WESTERN BLOT DE LA PHOSPHORYLATION DE PLCγ1 ET MYPT APRES TRAITEMENT A L'ANGIOTENSINE II PENDANT DIFFERENTS TEMPS _____ 149

FIGURE 29 : REPRESENTATION DES ACTIONS VASOMOTRICES MEDIEES PAR LES RECEPTEURS AT_2, M1 ET M3 _____ 168

Liste des tables

TABLEAU 1 : PRINCIPAUX ESSAIS CLINIQUES AYANT EVALUE L'IMPACT D'UN INHIBITEUR DE L'ENZYME DE CONVERSION OU D'UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS AT_1 OU D'UN DONNEUR DE NO DANS LA SURVENUE DES AVC 11

TABLEAU 2 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES NO SYNTHASES 16

TABLEAU 3 : IMPLICATION DE CERTAINS ACIDES AMINES DANS LA FONCTION D'AT_1 (D'APRES BALAKUMAR ET JAGADEESH 2014) ... 58

TABLEAU 4 : PRINCIPALES ETUDES AYANT EVALUE LA REGULATION DES RECEPTEURS DE L'ANGIOTENSINE II PAR LE MONOXYDE D'AZOTE 191

Liste des abréviations

Ach	Acétylcholine
ACM	Artère cérébrale moyenne
AlbSNO	*S*-nitrosoalbumine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
Ang A	Angiotensine A
AT_1	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT_2	Récepteur de type 2 de l'angiotensine II
AVC	Accident vasculaire cérébral
BK_{Ca}	Canaux potassiques à large conductances activés par le calcium
$BUC(NO)_2$	*S,S'*-dinitrosobucillamine
CML	Cellule musculaire lisse
CCR	Courbe concentration réponse
DAG	Diacylglycérol
DI	Diamètre interne
DSC	Débit sanguin cérébral
DTM	Domaine transmembranaire
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine I
ECA2	Enzyme de conversion 2 de l'angiotensine I
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
GCs	Guanylate cyclase soluble
GFP	Green Fluorescent Protein
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSNO	*S*-nitrosoglutathion
GTP	Guanosine triphosphate
HEK	Human embryonic kidney
5HT	5-hydroxytryptamine, sérotonine
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I
IP_3	Inositol trisphosphate
MLCP	Phosphatase des chaînes légères de la myosine
MrgD	Mas-related G-protein receptor D
NACNO	*S*-nitroso-*N*-acétylcystéine
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric oxide synthase (eNOS : endothéliale ; iNOS inductible ; nNOS : neuronale)
PAM	Pression artérielle moyenne

PAP	Pression artérielle pulsée
Phe	Phénylephrine
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKGI	Protéine kinase G I
PLA2	Phospholipase A_2
PLC	Phospholipase C
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RSNO	*S*-nitrosothiol
SHR	Spontaneous hypertensive rat
SNAP	*S*-nitroso-*N*-acétylpénicillamine
SNOPC	*S*-nitrosophytochélatine
SNP	Nitroprussiate de sodium
SRA	Système rénine angiotensine
TM	Tonus myogénique
WKY	Wistar Kyoto Rat

C21	Agoniste d'AT_2
U46619	Analogue du thromboxane A2

(Les articles du laboratoire apparaissent dans le texte précédés d'une *)

Introduction générale

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) constituent la deuxième cause de mortalité dans le monde (Murray et Lopez 1997 ; Feigin *et al*. 2014) et les projections prévoient jusqu'à 7,8 millions de décès liés aux AVC en 2030 (Strong *et al*. 2007). Malgré cette forte prévalence, peu de traitements sont disponibles. La thérapeutique actuellement utilisée, la thrombolyse (par l'utilisation d'activateur tissulaire recombinant du plasminogène), présente plusieurs inconvénients majeurs : inadaptation en cas d'AVC hémorragique (20% des cas) (Thrift *et al*. 2001) ; fenêtre d'administration restreinte (dans les 3 heures qui suivent l'AVC) (Donnan *et al*. 2008) et reperfusion incomplète malgré une utilisation optimale (Dalkara et Arsava 2012).

Le développement de nouvelles thérapeutiques est donc urgent et passe par une meilleure connaissance des mécanismes de la régulation de la circulation cérébrale afin de maintenir une perfusion physiologique et ainsi limiter les conséquences de l'ischémie cérébrale. Parmi les facteurs impliqués dans cette régulation, deux jouent un rôle prépondérant : le système rénine angiotensine et le monoxyde d'azote.

Le monoxyde d'azote, est un puissant vasodilatateur cérébral, il a un rôle neuroprotecteur, anti-inflammatoire ou encore antiagrégant plaquettaire (Willmot *et al*. 2005). Il a été montré, dans des modèles précliniques, qu'un apport exogène de monoxyde d'azote permettait de protéger le cerveau en cas d'ischémie cérébrale (Khan *et al*. 2006 ; *Parent *et al*. 2015), cependant en clinique les résultats sont plus mitigés (Bath *et al*. 2015) (Tableau 1, étude ENOS).

Au niveau cérébral, l'implication du système rénine angiotensine dans la réponse vasomotrice des artérioles et artères cérébrales a été montrée par notre équipe (*Vincent *et al*. 2005) et par d'autres (Wackenfors *et al*. 2006). L'angiotensine II se fixe aux récepteurs AT_1 et AT_2 qui induisent respectivement une vasoconstriction et une vasodilatation (*Vincent *et al*. 2005). L'ischémie cérébrale est connue pour modifier fortement l'expression et la fonction des récepteurs AT_1 et AT_2 de l'angiotensine II. Ainsi, après un AVC, la vasoconstriction médiée par AT_1 augmente malgré une diminution de son expression génique (Stenman et Edvinsson

2004). L'utilisation d'antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II montre des effets protecteurs dans des modèles précliniques (Nishimura *et al*. 2000 ; Omura-Matsuoka *et al*. 2009). Cependant, comme pour le monoxyde d'azote, les résultats obtenus en clinique sont plus conflictuels, à la fois pour la prévention primaire et secondaire (Schrader *et al*. 2007 ; Strauss et Hall 2009) mais aussi pour leur utilisation dans le traitement aigu des AVC (Schrader et *al*. 2003 ; Sandset *et al*. 2011). Les principales études cliniques ayant évalué l'impact d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou d'antagonistes des récepteurs AT_1 dans la survenue des AVC sont listées ci-après (Tableau 1, p11). Les divergences observées dans ces études sont peut-être dues aux différents niveaux de pression atteints après le traitement ainsi qu'à la difficulté à discriminer les effets bénéfiques propres aux substances par rapport aux effets sur la pression.

Tableau 1 : Principaux essais cliniques ayant évalué l'impact d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion ou d'un antagoniste des récepteurs AT_1 ou d'un donneur de NO dans la survenue des AVC

Étude (Année)	Nombre de patients	Population	Traitement	Δ_{PAS} (avant/après traitement)	Diminution du risque d'AVC	Référence
HOPE (2000)	9 297	Patients avec antécédent de maladie cardiovasculaire, d'AVC ou de diabète	Ramipril *vs* placebo	-3 mmHg	Oui (-22%)	(Yusuf *et al*. 2000)
PROGRESS (2001)	6 105	Patients hypertendus ou non avec antécédent d'AVC ou d'accident ischémique transitoire	Perindopril ± indapamide *vs* placebo	-4 mmHg	Oui (-28%)	(PROGRESS Collaborative Group 2001)
LIFE (2002)	9 194	Hypertendus avec hypertrophie ventriculaire gauche	Losartan *vs* atenolol	-29 mmHg	Oui (-25%)	(Dahlöf *et al*. 2002)
ANBP2 (2003)	6 083	Hypertendus	Enalapril *vs* hydrochlorothiazide	-26 mmHg	Non	(Wing *et al*. 2003)
SCOPE (2003)	4964	Hypertendus	Candesartan *vs* traitement antihypertenseur	-22 mmHg	Oui (-28%)	(Lithell *et al*. 2003)
ACCESS (2003)	342	Hypertendus post-AVC	Candesartan *vs* placebo	-50 mmHg	Oui (-52%)	(Schrader *et al*. 2003)
VALUE (2004)	15 245	Hypertendus	Valsartan *vs* amlodipine	-16 mmHg	Non	(Julius *et al*. 2004)
PRoFESS (2008)	20 332	Patients post-AVC	Telmisartan *vs* placebo	-5 mmHg	Non	(Yusuf *et al*. 2008a)
TRANSCEND (2008)	5 926	Patients intolérants aux IEC présentant une maladie cardiovasculaire ou un diabète avancé	Telmisartan *vs* placebo	-4 mmHg (Δ_{PAM})	Non	(Yusuf *et al*. 2008b)
SCAST (2011)	2029	Hypertendus post-AVC	Candesartan *vs* placebo	-5 mmHg	Non	(Sandset *et al*. 2011)

Étude (Année)	Nombre de patients	Population	Traitement	Δ_{PAS} (avant/après traitement)	Protection post-AVC	Référence
ENOS (2014)	4011	Hypertendus post-AVC	Trinitrine ± traitement antihypertenseur	-7 mmHg	Non	(Bath *et al*. 2015)

(ACCESS : Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors ; ANBP2 : Second Australian National Blood Pressure Study ; ENOS : Efficacy of Nitric Oxide in Stroke ; LIFE : Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension ; HOPE : Heart Outcomes Prevention Evaluation ; MOSES : Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared With Nitrendipine for Secondary Prevention ; PAM : pression artérielle moyenne ; PAS : pression artérielle systolique ; PRoFESS : Prevention Regimen For Effectively avoiding Second Strokes ; PROGRESS : Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study ; SCAST : Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial ; SCOPE : Study on Cognition and Prognosis in the Elderly ; VALUE : Valsartan Antihypertensive Long-Term Use Evaluation ; TRANSCEND : Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE Intolerant Subjects with Cardiovascular Disease)

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'état de l'art. Nous reviendrons dans un premier temps sur le monoxyde d'azote, sa synthèse et ses voies de signalisation. Nous présenterons également les différents donneurs de NO disponibles sur le marché en rappelant leurs avantages et inconvénients. Nous verrons ensuite les donneurs de NO en cours de développement, en présentant l'évaluation *in vivo* et *in silico* d'une nouvelle molécule (Article 1). Puis, nous nous intéresserons au système rénine angiotensine, en faisant quelques rappels historiques sur sa découverte. Une partie présentera les récepteurs AT_1 et AT_2 de l'angiotensine II, en s'attardant sur leurs structures, conformations et voies de signalisation. Enfin nous verrons l'interaction entre le système rénine angiotensine et le monoxyde d'azote *via* un mécanisme de régulation des récepteurs de l'angiotensine II, la *S*-nitrosation. Nous présenterons son intérêt au niveau cérébrovasculaire.

La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée aux études expérimentales. Tout d'abord nous présenterons les problèmes rencontrés actuellement avec les anticorps anti-AT_1 et commenterons sur la non-spécificité des nouveaux anticorps monoclonaux (Article 2). Nous verrons par la suite comment la *S*-nitrosation permet de réguler l'activité des récepteurs de l'angiotensine II dans un modèle d'artère cérébrale moyenne isolée (Article 3). Nous présenterons la démarche que nous avons mise en place pour étudier l'impact de cette *S*-nitrosation sur les protéines impliquées dans les voies de signalisation du récepteur AT_1. Nous verrons ensuite l'impact de la nitrosation sur la vasodilatation AT_2-dépendante (Draft Article 4). Enfin nous présenterons les premiers résultats obtenus dans un modèle pathologique d'hypertension artérielle (Draft Article 5).

Dans la dernière partie de ce manuscrit nous reviendrons sur les principaux résultats obtenus et nous décrirons les différentes perspectives envisageables pour la poursuite du projet.

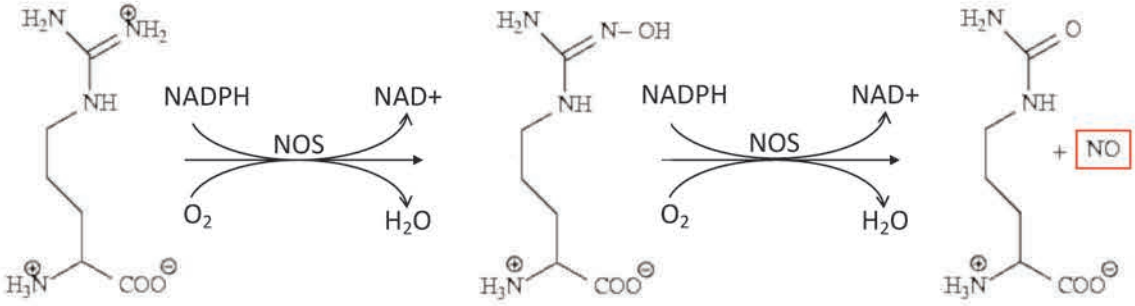
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz radicalaire de grande importance en biologie. Très instable, sa demi-vie est de l'ordre de 1 à 3 s (Kelm et Schrader 1990). Au début des années 80, Furchgott et Zawadzki montrent que la vasodilatation médiée par l'acétylcholine implique l'endothélium (Furchgott et Zawadzki 1980), et en particulier la libération d'un facteur nommé *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) (Cherry *et al*. 1982). Ce ne fut que lors du 30e congrès international des sciences physiologiques que Furchgott et Ignarro identifieront, dans deux communications indépendantes, l'EDRF comme du NO (Furchgott 1988 ; Ignarro *et al*. 1988). De plus, l'équipe de Murad parviendra à démontrer l'implication de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) dans la vasodilatation médiée par le NO (Murad 1986). L'ensemble de ces découvertes vaudront à Robert Furchgott, Louis Ignarro et Ferid Murad le prix Nobel de médecine en 1998.

1) Synthèse et rôles du monoxyde d'azote

Le NO est synthétisé à partir de L-arginine (Figure 1) par les NO synthase (NOS) qui existent sous trois isoformes.



L-arginine N-hydroxy-L-arginine L-citrulline

Figure 1 : Production de monoxyde d'azote (NO) à partir de L-arginine par les NO synthases (NOS)

La NOS neuronale (nNOS), est exprimée majoritairement au niveau des neurones, mais aussi au niveau de la moelle épinière, des glandes surrénales ou encore des cellules musculaires lisses (Förstermann *et al*. 1994 ; Förstermann et Sessa 2012). La NOS endothéliale (eNOS), principalement exprimée dans les cellules endothéliales peut aussi être retrouvée dans les plaquettes ou les neurones (Förstermann et Sessa 2012). L'activation de ces deux isoformes est médiée par une augmentation du calcium intracellulaire qui permet la fixation du complexe Ca^{2+}/calmoduline aux enzymes. Ces enzymes sont dites constitutives, produisent du NO de manière transitoire et en faible quantité. La troisième isoforme est la NOS inductible (iNOS), localisée, entre autres, au niveau des monocytes et macrophages. L'activation de la iNOS intervient au cours de réactions inflammatoires, elle entraine une production de NO continue (de quelques heures à plusieurs jours) et en quantité importante (Förstermann et Sessa 2012) (Tableau 2).

Tableau 2 : Principales caractéristiques des NO synthases

	eNOS	nNOS	iNOS
Masse moléculaire	133 kDa	161 kDa	131 kDa
Localisation	- Cellules endothéliales - Myocytes cardiaques - Plaquettes - Neurones	- Neurones - Moelle épinière - Glandes surrénales - Cellules épithéliales - Cellules rénales et pancréatiques - Cellules musculaires lisses vasculaires	- Macrophages - Monocytes - Cellules endothéliales - Cellules musculaires lisses
Activation	Constitutive		Inductible
Production de NO	Faible, transitoire		Forte, continue
Effet du NO produit	Vasodilatation Homéostasie vasculaire Antiagrégant plaquettaire	Neurotransmetteur Plasticité synaptique Régulation de la pression artérielle	Médiateur de l'inflammation Défense immunitaire

En conditions physiologiques, la production de NO par la eNOS et la nNOS (de l'ordre du nanomolaire) permet le maintien de l'homéostasie vasculaire, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire ou encore la neurotransmission. En conditions pathologiques, la production de NO en grande quantité par la iNOS (de l'ordre du micromolaire) entraine la génération d'espèces réactives de l'oxygène et/ou de l'azote. Cela peut induire un effet délétère du NO en générant un stress oxydant et/ou nitrosant (Figure 2) (Loscalzo et Welch 1995).

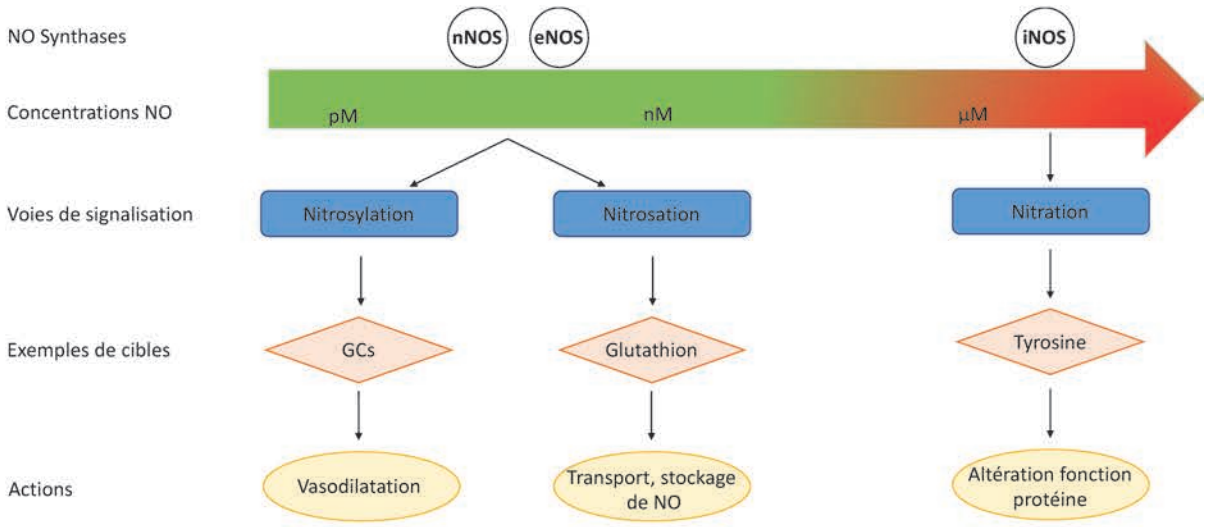


Figure 2 : Conséquences de la synthèse de monoxyde d'azote par les différentes NO synthases

(NO : monoxyde d'azote ; NOS : NO synthase (endothéliale, inductible, neuronale) ; GCs : guanylate cyclase soluble)

Différents facteurs permettent de stimuler la production de NO par les NOS. Les forces de cisaillement générées par le flux sanguin (ou *shear stress*) sur les cellules endothéliales constituent un élément majeur (Davies 1995 ; Lu et Kassab 2011). Les vasodilatateurs endothélium-dépendant comme la bradykinine, l'adénosine triphosphate ou la substance P sont autant d'exemples de facteurs entrainant une augmentation de la production de NO endothélial.

2) Voies de signalisation

Une fois synthétisé, le NO agit *via* trois grands types de signalisation : la nitrosylation, la nitrosation ou la nitration.

a. Nitrosylation

La nitrosylation correspond à la réaction du NO avec les métaux de transitions comme le fer ou le cuivre. Elle permet la régulation de l'activité de nombreuses protéines. L'exemple le plus connu est la nitrosylation de la guanylate cyclase soluble (GCs) (Figure 3). La fixation du NO sur l'atome de fer du groupement héminique induit un changement conformationnel de la GCs qui permet son activation (Underbakke *et al*. 2014). Cela nécessite une faible concentration de NO, de l'ordre du nM (Bellamy et Garthwaite 2001).

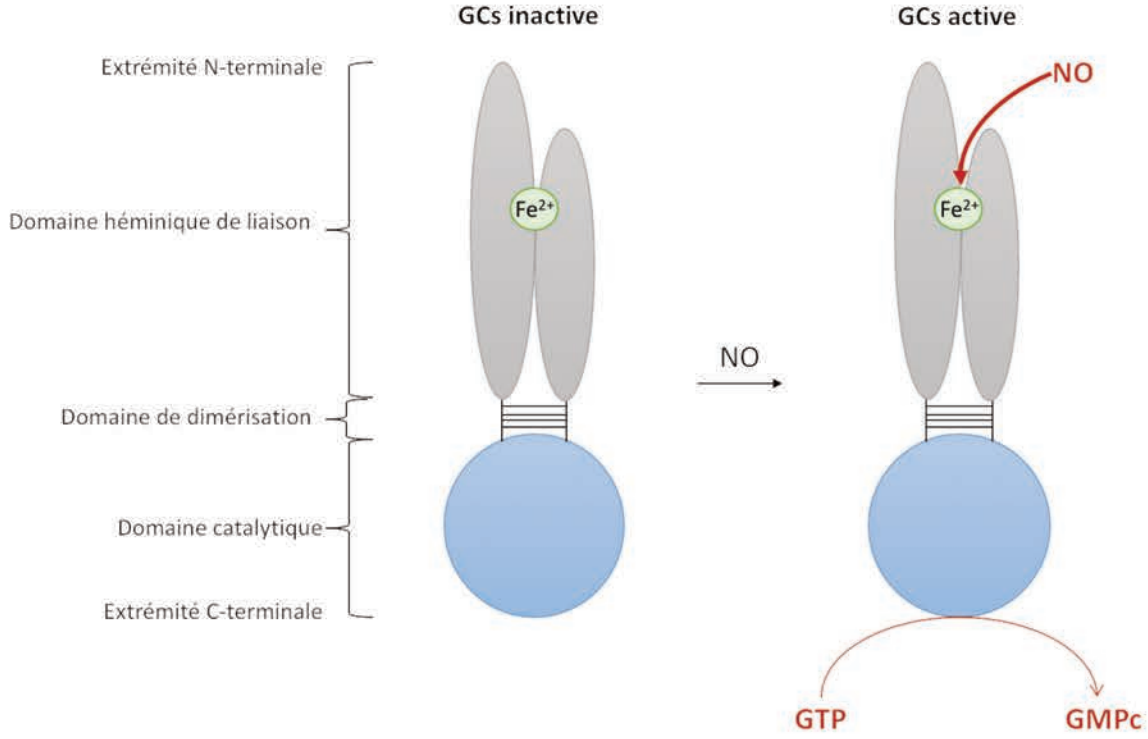


Figure 3 : Représentation schématique de l'activation de la GCs par le NO

(GCs : guanylate cyclase soluble ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; GTP : guanosine triphosphate ; NO : monoxyde d'azote)

L'activation de la GCs permet la transformation de la guanosine triphosphate (GTP) en GMPc. Le GMPc va ensuite activer la protéine kinase G I (PKGI), qui active elle-même la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP). La déphosphorylation des chaînes de la myosine permet le relâchement des cellules musculaires lisses et donc la vasodilatation (Murad 1986). En plus de la vasodilatation, le GMPc a d'autres actions comme par exemple l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, du remodelage vasculaire ou encore de la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) (Farah *et al*. 2018).

La nitrosylation permet de réguler l'activité d'autres protéines. Nous pouvons notamment citer les cytochromes P450 (Wink *et al*. 1993) les cytochromes C (Schonhoff *et al*. 2003), la NADPH oxydase (Selemidis *et al*. 2007), la méthionine synthase (Danishpajooh *et al*. 2001), l'hémoglobine (Gow et Stamler 1998) ou encore la myoglobine (Flögel *et al*. 2001).

Outre les protéines possédant des groupements métalliques, le NO est capable de se fixer à d'autres résidus comme les cystéines. La modification des cystéines se fait par *S*-nitrosation (détaillée ci-dessous) mais est souvent référencée, à tort, sous le terme *S*-nitrosylation (Heinrich *et al*. 2013).

b. *Nitrosation*

Contrairement à la nitrosylation, la *S*-nitrosation se caractérise comme la fixation d'une molécule de NO sur un groupement thiol des résidus cystéines pour former des *S*-nitrosothiols (RSNO) (Figure 4). Cette modification post-traductionnelle permet de réguler l'activité de nombreuses protéines au même titre que la glycosylation ou la phosphorylation (Stamler *et al*. 1992b).

Figure 4 : Représentation schématique de la *S*-nitrosation d'une protéine par du NO

La plupart des protéines possèdent des résidus cystéines et sont donc susceptibles d'être nitrosées (Murphy *et al*. 2014). La *S*-nitrosation semble cependant favorisée si les cystéines se situent sur la chaine latérale des protéines (facilement ionisables) ou dans les compartiments hydrophobes (lipophilie du NO) (Stamler *et al*. 1997). Cette modification post-traductionnelle suscite un intérêt croissant dans la littérature si bien que l'équipe de Zhang a créé en 2012 la base de donnée « SNO-base » regroupant toutes les protéines identifiées comme *S*-nitrosées (Zhang *et al*. 2012). Au moment de sa création la SNO-base recensait 2561 protéines.

Au niveau cardiovasculaire la *S*-nitrosation peut soit inhiber l'activité de protéines (*ex* : eNOS, la protéine kinase B, myosine) soit l'augmenter (*ex* : pompes ATPase du réticulum sarcoplasmique SERCA, cyclo-oxygénase 2, thioredoxine) (Murphy *et al*. 2012 ; *Belcastro *et al*. 2017). D'autres exemples de protéines vasculaires régulées par *S*-nitrosation seront vus par la suite (*cf* paragraphe *S*-nitrosation d'AT_1 et d'AT_2 p84).

Outre leurs rôles dans la signalisation cellulaire, les RSNO endogènes constituent une forme de stockage et/ou de transport du NO. Les RSNO de haute masse moléculaire comme la *S*-nitrosoalbumine (AlbSNO) ou la *S*-nitrosohémoglobine participent au stockage, tandis que ceux de bas poids moléculaire comme la *S*-nitrosocysteine ou le *S*-nitrosoglutathion (GSNO) participent au transport de NO et à sa diffusion (Tsikas *et al*. 2013).

À l'heure actuelle aucun consensus n'a été trouvé concernant la concentration endogène des RSNO. Certaines équipes s'accordent sur une concentration de *S*-nitrosoprotéines autour de 0,025 μM (Marley *et al*. 2000 ; Rossi *et al*. 2001) alors que d'autres rapportent des concentrations 10 fois (Moriel *et al*. 2001) à 40 fois supérieures (Datta *et al*. 2004). Il en est de même pour l'AlbSNO. L'étude de Stamler avait établi une concentration physiologique autour de 7 μM (Stamler *et al*. 1992a). Ces résultats ont ensuite été contestés par Butler et Rhodes, qui estiment la concentration à 0,25 μM (Butler et Rhodes 1997) puis par Tsikas qui évalue la concentration d'AlbSNO à 0,18 μM (Tsikas *et al*. 1999).

La disparité des valeurs obtenues est principalement due aux différentes méthodes pré-analytiques utilisées comme illustré dans la revue de Giustarini (Giustarini *et al*. 2007). Certaines méthodes emploient des inhibiteurs enzymatiques (comme les inhibiteurs de la γ-glutamyltransférase) ou des agents stabilisant la liaison S-NO (comme le *N*-éthylmaléimide) qui pourraient expliquer les concentrations plus élevées obtenues (Bramanti *et al*. 2010 ; Tsikas *et al*. 2013). Il serait donc nécessaire d'harmoniser les différentes méthodes afin de pouvoir comparer les résultats obtenus.

c. Nitration

La dernière voie d'action du NO est la nitration qui correspond à la fixation d'un groupement NO_2 à une molécule. Dans un contexte de stress oxydant les anions superoxide (O_2^-) réagissent avec le NO pour former des ions peroxynitrites ($ONOO^-$). Ces peroxynitrites vont ensuite oxyder les acides aminés des protéines entrainant par exemple l'oxydation des cystéines ou la nitration des tyrosines (Ischiropoulos et Gow 2005). En conditions physiologiques, des protéines nitrées ont été retrouvées dans de nombreux tissus. Bien que le rôle exact de la nitration ne soit pas encore entièrement connu, elle semble impliquée dans la régulation des voies de signalisation (Greenacre et Ischiropoulos 2001). En conditions pathologiques, le rôle de la nitration est bien mieux connu et a été associé à de nombreuses pathologies comme l'infarctus du myocarde, l'hypertension, l'athérosclérose ou encore le diabète (Turko et Murad 2002). La nitration des résidus tyrosine entraine la formation de 3-nitrotyrosine, responsable de modification de la structure tertiaire des protéines ou encore d'une altération de leurs fonctions (Souza *et al*. 2008).

Les voies de signalisation présentées ci-dessus illustrent la pluralité des rôles du NO et son caractère indispensable au bon maintien de l'homéostasie vasculaire. Une diminution de sa biodisponibilité engendre des situations critiques, nécessitant la mise en place d'un apport exogène par des molécules capables de libérer du NO. À l'inverse, un apport trop important de NO peut-être délétère. Cela implique donc de contrôler au mieux l'apport exogène de NO.

3) Les donneurs de monoxyde d'azote

La diminution de la biodisponibilité de NO est associée à un grand nombre de pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension artérielle et pulmonaire, les maladies coronaires ou l'hypertrophie cardiaque (Tsai et Kass 2009). Pour pallier ce déficit, des molécules dites donneuses de NO ont été développées.

a. Les donneurs de monoxyde d'azote utilisés en thérapeutique

Différents donneurs de NO sont actuellement disponibles sur le marché et utilisés en thérapeutique : le nitroprussiate de sodium (SNP), les dérivés nitrés, le nicorandil ou encore les sydnonimines.

- Le nitroprussiate de sodium

Le SNP est un complexe inorganique dans lequel le NO, sous forme NO^+, est lié à un atome de fer. Le SNP est connu pour sa capacité à libérer le NO spontanément à pH physiologique (Friederich et Butterworth 1995). Il est utilisé par voie intraveineuse, principalement dans la prise en charge d'urgence des crises hypertensives sévères. Cependant il présente l'inconvénient majeur de libérer des ions cyanures toxiques.

Des chercheurs américains ont relancé l'intérêt pour le SNP dans le traitement de l'insuffisance cardiaque aigüe avec bas débit, où il est actuellement utilisé dans moins de 1% des cas (Mullens *et al*. 2008). La société américaine de l'insuffisance cardiaque (*Heart Failure Society of America*) a recommandé qu'en absence d'hypotension symptomatique, l'administration intraveineuse de vasodilatateurs (nitroglycérine, SNP) pourrait se faire en complément d'un traitement par diurétiques. L'objectif est d'améliorer la prise en charge des symptômes des patients admis pour insuffisance cardiaque aigüe ainsi que de ceux souffrant d'œdèmes pulmonaires aigus ou d'hypertension sévère (*Heart Failure Society Of America* 2006). Ces hypothèses ont été confirmées par l'étude rétrospective de Mullens, où l'administration intraveineuse de SNP permettait un retour aux valeurs cibles des paramètres hémodynamiques ainsi qu'une amélioration des signes cliniques (Mullens *et al*. 2008).

- Les dérivés nitrés

Les dérivés nitrés comme la trinitrine, le mononitrate d'isosorbide ou le dinitrate d'isosorbide sont utilisés depuis de nombreuses années en clinique, entre autres, dans le traitement de l'angor. Contrairement au SNP, les dérivés nitrés ont un délai et une durée d'action plus longue, et nécessitent l'intervention d'une enzyme pour libérer le NO. Plusieurs enzymes sont impliquées dans cette libération, la glutathion-*S*-transférase ou les cytochromes P-450 (Fung et Bauer 1994). La faible demi-vie des dérivés nitrés implique plusieurs prises quotidiennes ou la pose de patchs, ce qui entraine au long cours le développement de phénomènes de tolérance. Plusieurs mécanismes entrent en jeu dans cette tolérance. Notamment l'inactivation de l'aldéhyde déshydrogénase, la génération d'anion superoxyde ou encore la déplétion de groupements sulfhydriles (Münzel *et al*. 2005; *Parent *et al*. 2013c; Opelt *et al*. 2018).

- Les sydnonimines

Cette classe thérapeutique comporte la molsidomine et la linsidomine, utilisées dans le traitement de l'angor. La molsidomine est une prodrogue métabolisée par les estérases hépatiques en linsidomine (SIN-1) (Feelisch *et al*. 1989). Bien que les sydnonimines entrainent moins de phénomène de tolérance que les dérivés nitrés, leur dégradation génère des ions superoxydes pouvant former des ions peroxynitrites cytotoxiques.

- Le nicorandil

Le nicorandil est un principe actif dit « hybride » car il possède un groupement nitrate et un résidu nicotinamide qui lui confèrent un double mécanisme d'action. Le NO libéré permet l'activation de la voie de la GMPc alors que le résidu nicotinamide induit l'ouverture des canaux potassiques (Kukovetz *et al*. 1992).

Enfin, il est à noter que le NO est aussi utilisé sous forme de gaz pour inhalation dans le cadre de l'hypertension artérielle pulmonaire (Griffiths et Evans 2005). En effet, une fois inhalé le NO est rapidement capté par l'hémoglobine ce qui entraine son inactivation et limite son action vasodilatatrice à la circulation pulmonaire (Rimar et Gillis 1993).

Les donneurs de NO sont donc une classe thérapeutique largement utilisée, qui présente cependant des inconvénients majeurs : faible demi-vie, induction de phénomène de tolérance nécessitant la mise en place de fenêtres thérapeutiques et enfin une toxicité lors d'un usage au long cours. De plus leur utilisation est limitée à des pathologies coronaires et à l'insuffisance cardiaque.

b. Développement de nouveaux donneurs de monoxyde d'azote

Pour pallier différents effets indésirables rencontrés avec les donneurs de NO actuellement disponibles sur le marché, de nombreuses études s'intéressent au développement de nouvelles molécules. Peuvent être citées en exemple, les diazéniumdiolates (NONOates), les molécules hybrides (donneur de NO + autre principe actif) ou encore les RSNO.

- Les NONOates

Les NONOates sont synthétisées en exposant des nucléophiles (X^-) à du NO. Bien que stables sous forme solide, ces composés se dégradent spontanément à température et pH physiologiques pour permettre la libération des molécules de NO (Megson et Webb 2002). Leurs demi-vies varient de 3 minutes (diethylamine/NO) à 20 heures (diethylenetriamine/NO) (Katsumi *et al*. 2007). Cependant le potentiel thérapeutique de cette classe reste limité à cause de la formation possible de nitrosamines carcinogènes (Fitzhugh et Keefer 2000).

- Les molécules hydrides

Cette approche consiste à combiner du NO avec un médicament connu. Plusieurs antihypertenseurs ont été combinés à du NO, notamment le captopril (Cooke *et al*. 1989 ; Mordorski *et al*. 2015), la prazosine (Fruttero *et al*. 1995) ou encore le telmisartan (Li *et al*. 2007). L'étude menée par Li *et al*. a montré que l'addition de NO au telmisartan permet, en plus des propriétés antihypertensives, d'avoir un effet vasodilatateur supplémentaire et une meilleure régulation du métabolisme du glucose. Malgré ces résultats précliniques intéressants, aucune de ces molécules n'est actuellement testée en clinique.

Des molécules de NO ont aussi été combinées à des anti-inflammatoires et des antalgiques. Nous pouvons notamment citer l'aspirine (Lazzarato *et al*. 2011), le diclofenac (Pathan *et al*. 2010), l'indométacine (Takeuchi *et al*. 2001) ou encore le ketoprofène (Tam *et al*. 2000).

Enfin, une prostaglandine F2α donneuse de NO est actuellement testée en clinique pour le traitement du glaucome et a validé sa phase III (Weinreb *et al*. 2015, 2016).

- Les *S*-nitrosothiols

Les RSNO présentent de nombreux avantages qui les rendent intéressants dans le cadre du développement de nouveaux donneurs de NO (*Parent *et al*. 2013c). Ils sont capables de libérer, en plus du NO, des thiols connus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ils n'induisent pas de tolérance, ni de stress oxydant ou nitrosant (Bauer et Fung 1991 ; Miller *et al*. 2000). Leur demi-vie est plus longue que les donneurs de NO classiques et varie *in vivo* de 45 minutes à deux heures (Mathews et Kerr 1993). Enfin, les RSNO endogènes, comme l'AlbSNO, constituent un réservoir physiologique important en NO.

Les RSNO, qu'ils soient endogènes ou synthétiques, font l'objet de nombreuses études précliniques dans la littérature (Alencar *et al*. 2003b; Khan *et al*. 2006; Heikal *et al*. 2009; *Dahboul *et al*. 2014; *Parent *et al*. 2015). Ils sont aussi testés en clinique dans le traitement de différentes pathologies : embolie cérébrale (Molloy *et al*. 1998 ; Kaposzta *et al*. 2001), resténose (Langford *et al*. 1994), pré-éclampsie (Lees *et al*. 1996) ou encore cicatrisation (Seabra *et al*. 2004).

Du fait de la labilité de la liaison S-NO, différentes approches ont été envisagées pour optimiser la libération de NO (*Gaucher *et al*. 2013). Certaines approches s'intéressent à l'encapsulation de RSNO (*Parent *et al*. 2013a) tandis que d'autres développent des di- ou polynitrosothiols afin d'augmenter la charge en NO de chaque molécule. Ainsi, le groupe de Heikal a développé des *S*-nitrosophytochélatines (SNOPCs) capables de porter jusqu'à 6 groupements NO par molécule (Heikal *et al*. 2009). Ces molécules présentent un effet vasorelaxant plus puissant comparé au GSNO *in vitro* et *in vivo* (Heikal *et al*. 2011, 2016). Le développement de RSNO capables de porter plusieurs molécules de NO semble donc une stratégie intéressante pour augmenter l'apport en NO tout en diminuant la quantité de molécule.

c. *Article 1 : In vivo and in silico evaluation of a new nitric oxide donor, S,S'-dinitrosobucillamine*

Notre équipe a récemment développé une nouvelle molécule, la *S,S'*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$) (*Dahboul *et al*. 2014). $BUC(NO)_2$ a été synthétisée à partir d'un dithiol, la bucillamine ($BUC(SH)_2$), connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes, et utilisée en Asie dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Mazor *et al*. 2006). $BUC(NO)_2$ présente l'avantage de combiner la structure de deux mono-nitrosothiols : la *S*-nitroso-*N*-acétylcystéine (NACNO) et la *S*-nitroso-*N*-acétylpénicillamine (SNAP) (Figure 5).

Une étude *ex vivo* sur des anneaux aortiques isolés de rat a permis de mettre en évidence que $BUC(NO)_2$ induit une vasodilatation à des concentrations plus faibles comparées à NACNO, SNAP ou à un mélange équimolaire de SNAP+NACNO. En effet les valeurs de pD_2 (*i.e.* logarithme négatif de la concentration produisant 50% de l'effet maximal, $-\log EC_{50}$) déterminées étaient de respectivement 7,8 ± 0,1 ; 6,4 ± 0,2 ; 6,7 ± 0,1 et 6,7 ± 0,2 pour $BUC(NO)_2$, NACNO, SNAP et le mélange SNAP+NACNO (*Dahboul *et al*. 2014).

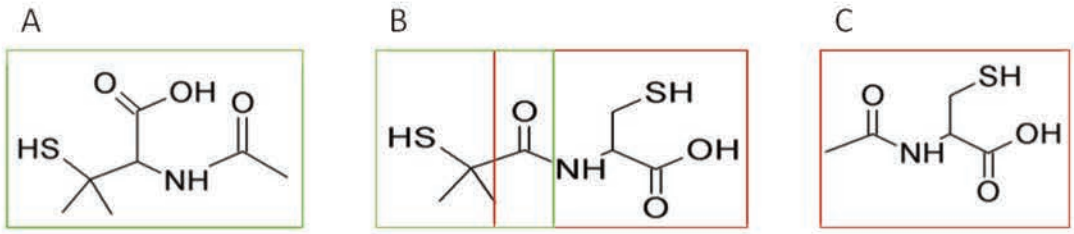


Figure 5 : Structures chimiques de (A) la *N*-acétylpénicillamine, (B) la bucillamine et (C) la *N*-acétylcystéine

Suite à cette étude, nous avons évalué les effets de $BUC(NO)_2$ au niveau systémique, notre hypothèse étant que $BUC(NO)_2$ induirait une hypotension plus forte et/ou plus longue.

Nous avons tout d'abord comparé les effets de $BUC(NO)_2$, NACNO, SNAP et un mélange équimolaire de SNAP+NACNO *in vivo*. Nous avons évalué l'intensité de l'hypotension ainsi que la durée d'effet des RSNO. Pour cela nous avons équipé des rats Wistar normotendus avec des capteurs de télémétrie nous permettant de mesurer la pression artérielle moyenne (PAM), la pression artérielle pulsée (PAP) et la fréquence cardiaque.

La PAM, qui reflète la vasodilatation des artères et la diminution des résistances vasculaires périphériques, a été utilisée pour comparer l'intensité de l'hypotension provoquée par les RSNO.

Les variations de PAP (différence entre la pression artérielle systolique et diastolique) sont corrélées à une diminution du volume d'éjection systolique et/ou à une augmentation des propriétés élastiques de la paroi artérielle. Chez le rat, les donneurs de NO ne modifient pas directement les propriétés élastiques de la paroi artérielle (*Niederhoffer *et al*. 1997). Les RSNO sont connus pour induire une forte vasodilatation veineuse (Sogo Naoki *et al*. 2009). Cette action sur les veines induit une diminution de la PAP probablement *via* une diminution du retour veineux et du volume d'éjection systolique.
En condition physiologique, la PAP ne peut pas diminuer de plus de 15 à 20 mmHg. Ainsi nous n'avons pas utilisé ce paramètre pour comparer les hypotensions. Nos précédentes études ont montré que (i) l'effet des RSNO est plus long sur la PAP que sur la PAM, (ii) la PAP permet une estimation plus précise de la durée d'effet des RSNO (*Parent *et al*. 2013a, 2015). Ainsi nous avons privilégié ce paramètre pour comparer la durée d'effet de NACNO, SNAP et $BUC(NO)_2$.

Nous avons ensuite évalué la cinétique de libération des molécules de NO de $BUC(NO)_2$ en utilisant une technique de modélisation moléculaire, et mesuré les produits de dégradation obtenus *in vitro* par chromatographie liquide haute performance, couplée à la spectrométrie de masse. Enfin ces résultats ont été corrélés à une mesure *in vitro* dans du plasma de rat, de la vitesse de dégradation des RSNO.

Nitric Oxide 71 (2017) 32–43

Contents lists available at ScienceDirect

Nitric Oxide

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yniox

In vivo and *in silico* evaluation of a new nitric oxide donor, *S,S′*-dinitrosobucillamine

Marie-Lynda Bouressam[a], Benjamin Meyer[b,c], Ariane Boudier[a], Igor Clarot[a], Pierre Leroy[a], Alessandro Genoni[b,c], Manuel Ruiz-Lopez[b,c], Philippe Giummelly[a], Patrick Liminana[a], Valérie Salgues[a], Mostafa Kouach[d], Caroline Perrin-Sarrado[a], Isabelle Lartaud[a], François Dupuis[a,*]

[a] *Université de Lorraine, CITHEFOR EA 3452, Faculty of Pharmacy, BP 80403, F-54000 Nancy Cedex, France*
[b] *Université de Lorraine, SRSMC UMR 7565, Faculty of Sciences and Technologies, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[c] *CNRS, SRSMC UMR 7565, Faculty of Sciences and Technologies, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[d] *Université de Lille 2, Plateau de Spectrométrie de Masse - GRITA EA 7365, Faculty of Pharmacy, BP 83, F-59006 Lille, France*

ARTICLE INFO

Keywords:
S,S′-dinitrosobucillamine
Telemetry
Awake rat
Mean arterial pressure
Pulse arterial pressure
ab initio calculations

ABSTRACT

Purpose: In a previous work, we have synthetized a new dinitrosothiol, *i.e. S,S′*-dinitrosobucillamine $BUC(NO)_2$ combining *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) and *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO) in its structure. When exposed to isolated aorta, we observed a 1.5-fold increase of $^{\bullet}NO$ content and a more potent vasorelaxation (1 log higher pD_2) compared to NACNO and SNAP alone or combined (Dahboul et al., 2014). In the present study, we analyzed the thermodynamics and kinetics for the release of $^{\bullet}NO$ through computational modeling techniques and correlated it to plasma assays. Then $BUC(NO)_2$ was administered *in vivo* to rats, assuming it will induce higher and/or longer hypotensive effects than its two constitutive *S*-mononitrosothiols.
Methods: Free energies for the release of $^{\bullet}NO$ entities have been computed at the density functional theory level assuming an implicit model for the aqueous environment. Degradation products of $BUC(NO)_2$ were evaluated *in vitro* under heating and oxidizing conditions using HPLC coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS). Plasma from rats were spiked with RSNO and kinetics of RSNO degradation was measured using the classical Griess-Saville method. Blood pressure was measured in awake male Wistar rats using telemetry (n = 5, each as its own control, 48 h wash-out periods between subcutaneous injections under transient isoflurane anesthesia, random order: 7 mL/kg vehicle, 3.5, 7, 14 μmol/kg SNAP, NACNO, $BUC(NO)_2$ and an equimolar mixture of SNAP + NACNO in order to mimic the number of $^{\bullet}NO$ contained in $BUC(NO)_2$). Variations of mean (ΔMAP, reflecting arterial dilation) and pulse arterial pressures (ΔPAP, indirectly reflecting venodilation, used to determine effect duration) *vs.* baseline were recorded for 4 h.
Results: Computational modeling highlights the fact that the release of the first $^{\bullet}NO$ radical in $BUC(NO)_2$ requires a free energy which is intermediate between the values obtained for SNAP and NACNO. However, the release of the second $^{\bullet}NO$ radical is significantly favored by the concerted formation of an intramolecular disulfide bond. The corresponding oxidized compound was also characterized as related substance obtained under degradation conditions. The *in vitro* degradation rate of $BUC(NO)_2$ was significantly greater than for the other RSNO. For equivalent low and medium $^{\bullet}NO$-load, $BUC(NO)_2$ produced a hypotension identical to NACNO, SNAP and the equimolar mixture of SNAP + NACNO, but its effect was greater at higher doses (-62 ± 8 and -47 ± 14 mmHg, maximum ΔMAP for $BUC(NO)_2$ and SNAP + NACNO, respectively). Its duration of effect on PAP (-50%) lasted from 35 to 95 min, *i.e.* shorter than for the other RSNO (from 90 to 135 min for the mixture SNAP + NACNO).
Conclusion: A faster metabolism explains the abilities of $BUC(NO)_2$ to release higher amounts of $^{\bullet}NO$ and to induce larger hypotension but shorter-lasting effects than those induced by the SNAP + NACNO mixture, despite an equivalent $^{\bullet}NO$-load.

* Corresponding author. CITHEFOR EA3452, Faculty of Pharmacy, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, F-54000 Nancy Cedex, France.
E-mail address: Francois.Dupuis@univ-lorraine.fr (F. Dupuis).

http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2017.10.004
Received 12 February 2017; Received in revised form 12 September 2017; Accepted 12 October 2017
Available online 16 October 2017
1089-8603/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations

$BUC(NO)_2$	*S,S′*-dinitrosobucillamine
$BUC(SH)_2$	bucillamine
GSNO	*S*-nitrosoglutathione
ISDN	isosorbide dinitrate
MAP	mean arterial pressure
NACNO	*S*-nitroso-*N*-acetylcysteine
PAP	pulse arterial pressure
RSNO(s)	*S*-nitrosothiol(s)
SNAP	*S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine
SNOPCs	*S*-nitrosophytochelatins
SNP	sodium nitroprusside

1. Introduction

Decrease of nitric oxide (˙NO) bioavailability is associated with cardiovascular diseases such as hypertension, atherosclerosis, angina pectoris [1]. Currently available ˙NO donors induce tolerance and oxidative stress [2,3]. *S*-nitrosothiols (RSNO) are interesting candidates for delivering ˙NO [4] as they do not induce such side effects [5]. They have a longer half-life [6], induce vasorelaxation [7], prevent platelet aggregation [8] and are currently thought to play a major role in the endogenous storage and transport of ˙NO [9,10]. *S*-nitrosothiols have also the advantage of releasing both ˙NO and thiols which exhibit antioxidant and anti-inflammatory properties.

The rate and/or quantity of released ˙NO vary according to the thiol carrying the SNO moiety. Therefore, numerous molecules exhibiting thiol functions are under consideration to define the best RSNO candidate. An interesting strategy relies on increasing ˙NO-payload by synthesizing di- or poly-nitrosothiols. Such compounds may increase the amount of released ˙NO, while limiting the drug quantity [11,12] compared to most of the mononitrosothiols previously synthesized [9,13]. Besides the ˙NO-payload, Heikal et al. evaluated the bioactivity of a new RSNO subgroup: *S*-nitrosophytochelatins (SNOPCs). These oligopeptides expressed in plants are analogues of *S*-nitrosoglutathione (GSNO, an endogenous RSNO present in humans). Heikal et al. compared several SNOPCs, carrying 2 to 6 SNO moieties, with GSNO. When administered at equal molar concentrations of SNO, SNOPCs induce a more intense decrease of blood pressure than GSNO [14], even though their *in vitro* vasodilatory effect was equivalent to GSNO (again at equimolar concentrations of SNO) [12]. These results demonstrate that the molecule carrying the SNO moieties is also a major determinant of the biological activities of RSNO.

We previously synthesized a new RSNO, *S,S′*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$, which combines in its structure two mononitrosothiols: *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) and *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO) [11]. The synthesis was performed using bucillamine ($BUC(SH)_2$) which is a commercially available drug used to treat rheumatoid arthritis, in relation with its anti-inflammatory and antioxidant properties [15,16]. In an aortic ring model, $BUC(NO)_2$ induced vasorelaxation at lower concentrations (pD_2 7.8 ± 0.1, with pD_2 = -log EC_{50}, *i.e.* the molar concentration producing 50% of the maximal effect) than NACNO (6.4 ± 0.2), SNAP (6.7 ± 0.1) and the mixture of SNAP + NACNO (6.7 ± 0.2). Furthermore, the *in vitro* ˙NO release was significantly higher from $BUC(NO)_2$ (6-fold increase *versus* basal value) than from the SNAP + NACNO mixture (4-fold increase *versus* basal value) [11]. Altogether, these data suggest that $BUC(NO)_2$ might be an interesting candidate for the cardiovascular pathologies. However, those previous experiments did not evaluate the systemic effects.

Therefore, the present work was conducted to further characterize $BUC(NO)_2$. In this aim, we used molecular modeling to study the thermodynamics of the two ˙NO entities released from $BUC(NO)_2$ and the resulting bucillamine derived product. We also monitored *in vitro* the obtained degradation products by using HPLC-MS/MS, and examined *in vitro* in plasma from Wistar rat spiked with RSNO the rate of decomposition of $BUC(NO)_2$ as compared to SNAP, NACNO and SNAP + NACNO. Then, we explored the systemic effects and duration of action of $BUC(NO)_2$ *in vivo*, using awake male Wistar rats equipped with telemetric devices. On the basis of its ˙NO-release profile, we assume that $BUC(NO)_2$ would induce higher and/or longer *in vivo* hypotensive effects than its constitutive *S*-mono-nitrosothiols SNAP, NACNO. We also compare to an equimolar mixture of NACNO plus SNAP (in order to mimic the quantity of ˙NO contained in the $BUC(NO)_2$ solutions). The intensity of hypotension was evaluated on the basis of changes in mean arterial pressure (MAP) which reflect the *in vivo* dilating effect of RSNO on arteries and arterioles. Changes in pulse arterial pressure (PAP) were used to determine the duration of effect, as we previously showed, using similar protocols, that PAP allows a precise evaluation of RSNO effects duration [17,18].

2. Material and methods

2.1. Reagents and standards

All reagents were of analytical grade and used without further purification. *N*-(2-mercapto-2-methylpropanoyl)-L-cysteine ($BUC(SH)_2$) was purchased from Discovery Fine Chemicals (Wimborne Dorset, United Kingdom). *N*-acetylpenicillamine (NAP), *N*-acetylcysteine (NAC) and all other reagents were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ultrapure deionized water (> 18.2 MΩ cm) was used to prepare all solutions. Phosphate-buffered saline (PBS) was prepared as follows: $[Na_2HPO_4] = 6.48 \times 10^{-3}$ M, $[KH_2PO_4] = 1.47 \times 10^{-3}$ M, $[NaCl] = 137.93 \times 10^{-3}$ M, and $[KCl] = 2.68 \times 10^{-3}$ M, final pH was adjusted to 7.4 with NaOH (40%). All the RSNO were extemporaneously synthesized at a final concentration of 10^{-2} M, by reacting *N*-acetylpenicillamine, *N*-acetylcysteine or $BUC(SH)_2$ with $NaNO_2$ in acidic medium, as previously described [11,17,19]. Solutions were adjusted to pH 7.4 by adding NaOH 40% then two-fold diluted in 10^{-2} M phosphate buffer pH 7.4.

Final solutions showed high osmolarity (1.8 osm/L). The volumes and dilutions required to reach isotonic solutions for injection were too important. Therefore, hyper-osmolar solutions were used. Animals received the same volume for each injection (solutions have been diluted according to the expected dose in a final volume of 3.4 mL). In the control (vehicle) solution, nitrite ions were replaced by a 0.2 M NaCl solution.

Due to their light- and temperature-sensitivity, final solutions were stored in the dark at 4 °C, no longer than 5 days for NACNO and SNAP, and 10 h for $BUC(NO)_2$, according to their stability previously described by Dahboul et al. [11].

2.2. Theoretical chemistry calculations

The computational approach was chosen according to our previous investigations [20]. Specifically, we performed Density Functional Theory calculations (B3PW91 functional [21] with the 6-311 + G(d,p) basis-set). In order to account for the influence of the physiological medium, we assumed an ionized system (anionic form of the carboxylic group) surrounded by an aqueous environment (described by an implicit solvation model [22]). A thorough analysis of $BUC(NO)_2$ conformations was first performed. In the most stable structure, the peptide bond is (as expected) in *trans* conformation and both RS-NO bonds adopt an *anti* conformation. From this structure, we calculated the sequential homolytic bond dissociation free energies (at 298.15 K) for the two RS-NO bonds. The two possible monoradical and the biradical

species were studied. Besides, we considered a hypothetical mechanism for the second •NO dissociation in which the formation of an incipient disulfide bond significantly stabilizes the process. All computations were carried out using the Gaussian09 package [23].

2.3. Identification of degradation product(s) from S,S′-dinitrosobucillamine

In order to check the reliability of the theoretical predictions, we have carried out LC-MS/MS experiments aimed at identifying the molecular structure of a main degradation product obtained after exposure of $BUC(NO)_2$ to either heating (55 °C, 120 min) or H_2O_2 (10.0% v/v, 15 min). Such conditions have been previously used in the field of toxicology predictions [24].

The stock $BUC(NO)_2$ solution (10^{-2} M in phosphate buffer pH 7.4) with and without H_2O_2 was diluted one thousand times in the mobile phase before injection in the LC system.

LC–MS/MS experiments were carried out on a UFLC-XR device (Shimadzu) coupled to a QTRAP® 5500 MS/MS hybrid system triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, USA) equipped with a turbo VTM ion source. Instrument control, data acquisition and processing were performed using Analyst 1.5.2 software. The RP-LC separation was carried out at 40 °C on a Nucleosil C18 100 AB (5 µm 250 × 4 mm) column (Macherey Nagel) at a flow rate of 0.8 mL/min and with an isocratic mobile phase CH_3CN-H_2O-HCOOH (30/69.9/0.1, v/v/v). The injection volume was 10 µL. MS analysis was carried out in negative ionization mode using an ion spray voltage of -4500 V. The curtain gas flow was set at 25 psi using nitrogen. The turbo VTM ion source was set at 550 °C. Nebulizer gas and auxiliary gas flow (air) were set at 50 psi. Acquisition was performed in IDA "Information Dependent Acquisition" method. The IDA method consists of a switch between MS (survey scan) and MS/MS (dependent scan) in a single run.

2.4. In vitro measurement of S,S′-dinitrosobucillamine degradation in spiked plasma

In order to confirm our *in silico* and *in vitro* findings, we compared the rate of degradation of $BUC(NO)_2$ *in vitro* to those of SNAP, NACNO and SNAP + NACNO. Briefly, rats were anesthetized with isoflurane, heparinized (500 UI) and blood was collected on heparinized tubes directly from the abdominal aorta. Blood was then centrifuged (2000g, 15 min, 4 °C), plasma collected and immediately spiked with either $BUC(NO)_2$, SNAP, NACNO or SNAP + NACNO (RSNO/plasma volume ratio of 1/10). Plasma samples were then stored under agitation at 37 °C.

The loading doses were chosen to achieve a plasma concentration of 175.0 µmol/L for SNAP and NACNO and 87.5 µmol/L for SNAP + NACNO and $BUC(NO)_2$ (*i.e.* an equivalent •NO-load of 175.0 µmol/L). These concentrations are equivalent to the theoretical maximal concentrations following *in vivo* administration (7.0 µmol/kg for SNAP and NACNO and 3.5 µmol/kg for SNAP + NACNO and $BUC(NO)_2$, considering a total blood volume of 40 mL/kg).

The RSNO were quantified at 0, 5 and 15 min after RSNO load (based on the kinetics of the *in vivo* blood pressure effect) by the Griess-Saville assay [25]. Briefly, the samples were diluted in 0.4 M acetoacetic buffer (pH = 2.5) in duplicates (two dilutions tested, 1/20 and 1/50, final volume of 200 µL) and then incubated with 40 µL of a 0.6% (w/v) sulfanilamide solution supplemented with 0.2% (w/v) of $HgCl_2$. The diazonium salt so formed was reacted with 10 µL of a 0.6% (w/v) *N*-(1-napthyl) ethylenediamine solution to form a chromophoric azo product that absorbs at 540 nm. For each drug, the calibration curve was made with the corresponding RSNO in phosphate buffer. Free nitrite ions (quantified by Griess assay) as well as RSNO in non-fortified plasma were below the limit of detection (< 1 µmol/L) and could thus be neglected as regards to the RSNO load. Results are presented as a percentage of the initial quantity of RSNO added to the plasma.

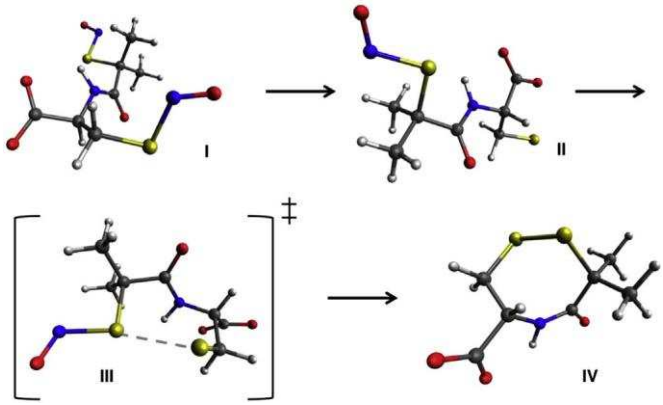


Fig. 1. Calculated minimum energy structures for the double dissociation process of $BUC(NO)_2$ (I) along pathway P_1.
After the first (barrierless) •NO dissociation process leading to the monoradical (II), the system evolves through a transition structure (III) to form a disulfide-bond product (IV).

2.5. Animals, telemetry and hemodynamics measurement

All experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals. The protocols and procedures were approved by an advisory regional ethical committee on animal experiments (project "BucNOtelem", APAFIS#2119–2015100214406732 v3).

Surgery was performed on 4 month-old male normotensive outbred Wistar rats (Rj/Han: Wi, Janvier, France) (n = 5) and the experiments conducted between 5 and 10 months of age. Animals had mild restriction to standard rat chow (A04, Safe, France, 25 g per day) in order to maintain their body weight around 500 g until the end of experiments. They drank water (Aqua-clear®, Culligan, USA) *ad libitum*. Rats were equipped with telemetric devices (PA-C40, Data Sciences International, USA; abdominal aorta) under isoflurane anesthesia and aseptic surgery (48 h analgesia with paracetamol 60 mg/kg/day *per os*, then 1 month recovery). Each rat was used as its own control. All the injections were performed between 11 and 12 a.m., subcutaneously (21-G needle) under transient (less than 5 min) isoflurane anesthesia in order to standardize injections [18] and to reduce stress. Each rat received control solution, then, in a random order with 2-day wash-out period and at distinct injection sites, SNAP, NACNO, $BUC(NO)_2$ or the mixture SNAP + NACNO at 3.5, 7, and 14 µmol/kg. At the end of the experiments, the effects of the RSNO were compared to that other of •NO-donors, *i.e.* isosorbide dinitrate (ISDN, 21, 42 and 85 µmol/kg) and sodium nitroprusside (SNP, from 0.0035 up to 3.5 µmol/kg). Animals were then euthanized (pentobarbitone 120 mg/kg).

Hemodynamics were recorded in awake rats (Ponemah 5.1 software, Data Sciences International, USA, 250 Hz sampling rate). Basal MAP (area under the pressure wave for each valid cardiac cycle), PAP (difference between the maximum and minimum pressure values of each pressure wave) and heart rate (HR) were recorded during minimum 2 h and averaged on the last 5 min to obtain baseline values. For each RSNO dose, MAP, PAP and HR were recorded continuously for 4 h following injection and their variations *vs.* baseline values were averaged on 1 min every 5 min.

As mentioned above, changes in MAP were analyzed as RSNO are known to induce arterial and arteriolar dilatation. Changes in PAP were analyzed as RSNO are known to induce large venodilation [26]; we previously published a similar approach in Refs. [17,18]. As PAP cannot physiologically fall under 15 mmHg, this parameter is more suitable to accurately determine the effect duration.

2.6. Statistical analysis

Results are expressed as means ± S.E.M.

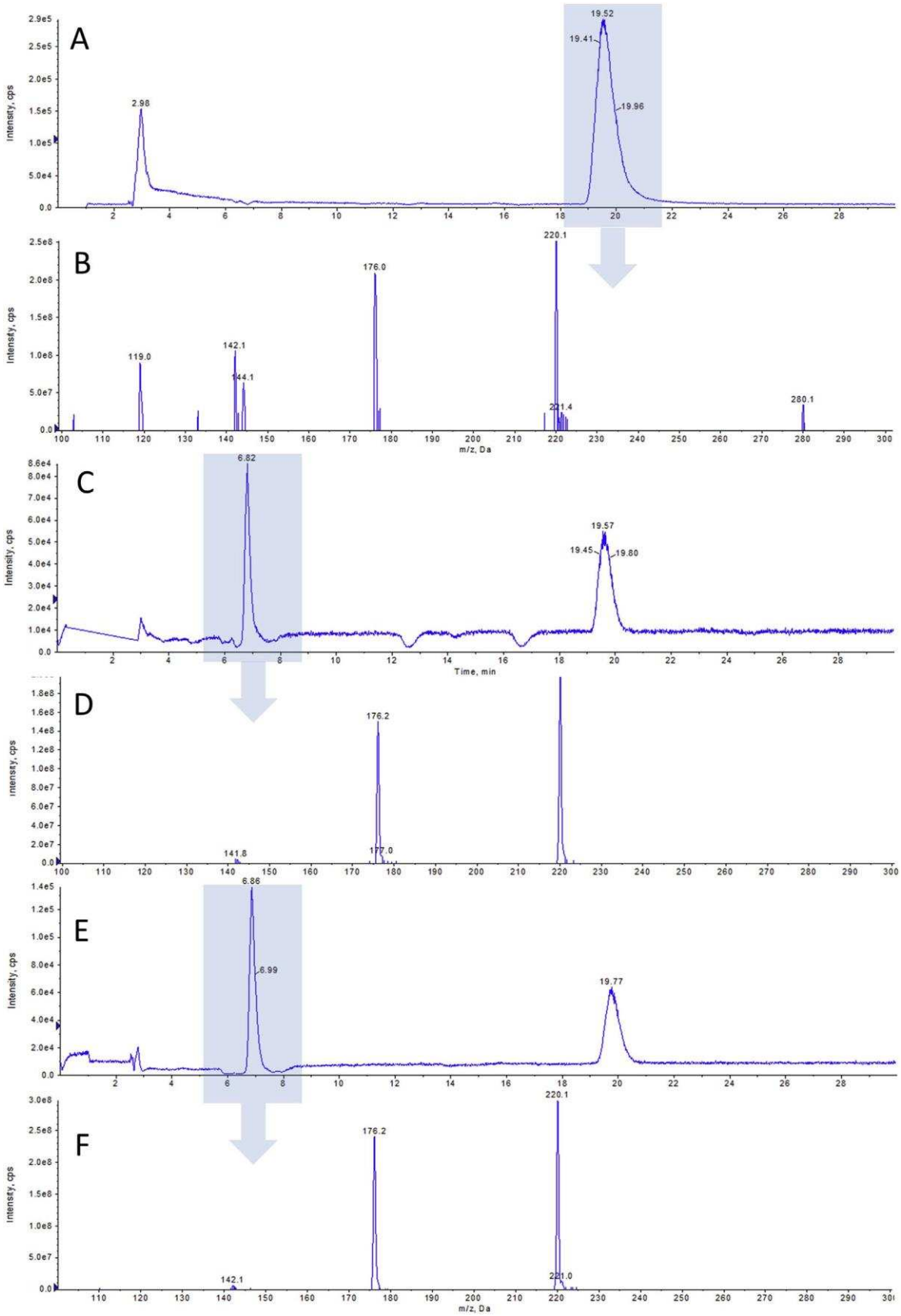


Fig. 2. MS (survey scan) chromatograms and corresponding MS/MS spectra of the grey peak obtained for the degradation study.
Panels A and B: fresh solution; panels C and D: after 15 min with H_2O_2; panels E and F: after 120 min at 55 °C.

Table 1
Mass/charge (m/z) values and structures of the molecular ions found in the MS/MS spectra during the *in vitro* degradation study.

m/z (amu)	Ions	Structures $[X]^-$
280	M_1	BUC(S-NO,S-NO)-H
220	M_2	BUC(S-S)-H
176	M_3	M_2-CO_2
144	M_4	M_3-S
142	M_5	M_3-SH_2

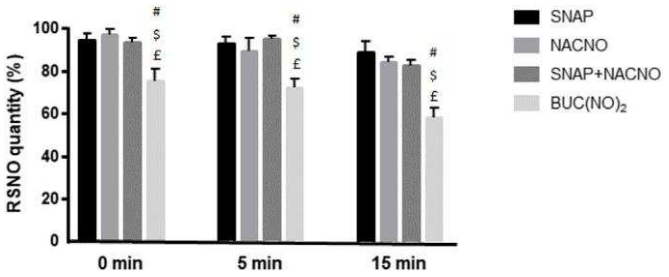


Fig. 3. *In vitro* degradation rate of *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO), SNAP + NACNO and *S,S′*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$).
Each RSNO was added (to obtain a theoretical $^{\bullet}NO$ concentration of 175 μmol/L) to freshly obtained plasma and quantified using the Griess-Saville assay (n = 9 to 14 per RSNO). Results are presented as percentage of the RSNO load (mean ± SEM). $p_{interaction} = 0.0513$, p_{drug} and $p_{time} < 10^{-4}$; #: $p < 0,05$ *vs* SNAP; $: $p < 0,05$ *vs* NACNO; £: $p < 0,05$ *vs* SNAP + NACNO (two-way ANOVA; *post-hoc* Bonferroni test).

Significant differences in *in vitro* RSNO degradation were determined by a two-way ANOVA (variables: “time” and “drug”) followed by a *post-hoc* Bonferroni test.

Significant differences in MAP, PAP and HR variations between controls, SNAP, NACNO, SNAP + NACNO or $BUC(NO)_2$ were determined at equivalent $^{\bullet}NO$-load (half dose for SNAP + NACNO and $BUC(NO)_2$ *versus* mononitrosothiols) by a two-way ANOVA (variables: “time” and “drug”) for repeated measurements (time factor) followed by a *post-hoc* Bonferroni test.

The duration of effects on PAP, MAP and HR variations was evaluated individually as the time of the last value remaining significantly lower (PAP and MAP) or higher (HR) than the mean of the next 20 points. These durations and the maximal hypotension values were then compared between groups by a two-way ANOVA (variables “dose” and “drug”) followed by a *post-hoc* Bonferroni test.

The null hypothesis was rejected at $p < 0.05$. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software).

3. Results

3.1. Thermodynamics of $^{\bullet}NO$ release from S,S′-dinitrosobucillamine: computational study

Since there are two different SNO groups in $BUC(NO)_2$, one can imagine two different pathways, depending on which S-NO bond dissociates first. In the first pathway (P_1), the primary SNO (*i.e.* the one attached to the RCH_2 group) dissociates first, and the sequential $^{\bullet}NO$ dissociation free energies, which are necessary to form the monoradical and the diradical species, amount 16.4 and 16.9 kcal mol^{-1}, respectively. In the second pathway (P_2), the tertiary SNO (*i.e.* the one attached to the $RC(CH_3)_2$ group) dissociates first, and the corresponding energies are 16.0 and 16.6 kcal mol^{-1}.

The second dissociation process is much faster than the first one because of the concerted formation of a disulfide bond, which substantially stabilizes the system. Accordingly, the second dissociation proceeds through a transition structure that leads to a disulfide product (Fig. 1) and it is only 9.1 kcal mol^{-1} above the monoradical species in path P_1 (or 12.3 kcal mol^{-1} in P_2). As a consequence of this low activation free energy for the second dissociation process, in $BUC(NO)_2$ the first dissociation step can be considered the rate determining for the double dissociation.

Applying transition state theory, and assuming first-order rate laws, the following kinetic constants have been roughly obtained from the quantum chemical models of $BUC(NO)_2$ (present work), SNAP and NACNO [20]:

$$BUC(NO)_2 \rightarrow \text{Disulfide} + 2\ ^{\bullet}NO\ [^{\bullet}NO] = 2(1 - e^{-kt})\ [BUC(NO)_2]\ k = 5.3\ s^{-1}$$

$$SNAP \rightarrow \text{Monoradical} + {}^{\bullet}NO\ [^{\bullet}NO] = (1 - e^{-kt})\ [SNAP]\ k = 2350\ s^{-1}$$

$$NACNO \rightarrow \text{Monoradical} + {}^{\bullet}NO\ [^{\bullet}NO] = (1 - e^{-kt})\ [NACNO]\ k = 0.5\ s^{-1}$$

3.2. Identification of the main degradation product of S,S′-dinitrosobucillamine

The degradation processes, monitored by mass-coupled liquid chromatography, led to similar results for both stress conditions. A chromatogram of a fresh $BUC(NO)_2$ solution is illustrated on Fig. 2A with its MS/MS spectrum in Fig. 2B showing a specific molecular ion at m/z 280. All the molecular structures determined in this part are described in Table 1.

Degradation conditions presently used led to the appearance of a chromatographic peak at a retention time of 6.8 min (Fig. 2C and E for oxidation and heating, respectively). The MS/MS spectra of this degradation product are given in Fig. 2D and F with a m/z major ion at 220 amu corresponding to the $[BUC(S\text{-}S)\text{-}H]^-$ structure. It is important to note that no other molecular ions were detected at m/z values upper than m/z 300, leading to the conclusion that the disulfide bond formation is only favored through an intramolecular pathway. Furthermore, the mononitrosated bucillamine was not observed whatever the chromatogram under study, indicating that the denitrosation process is rapid and simultaneously concerns the two thiol groups included in the $BUC(NO)_2$ structure.

3.3. Kinetics for RSNO decomposition in plasma

We added RSNO to plasma *in vitro*, to evaluate their decomposition rate. As shown in Fig. 3, a marked difference appears between $BUC(NO)_2$ and the other RSNO. At each time point (0, 5 and 15 min), the *in vitro* degradation of $BUC(NO)_2$ was significantly greater than that of SNAP, NACNO or SNAP + NACNO, indicating a faster metabolism and confirming our *in silico* and *in vitro* findings.

3.4. Hemodynamic responses to RSNO

As previously observed when similar protocols are applied [17,18], rats treated with the vehicle solution (controls) showed moderate increases in MAP (less than 20% *vs.* baseline, Figs. 4–6) and HR (Fig. 7) during the first 30 min after administration, related to the increase in activity during waking-up after the transient anesthesia. No significant change in PAP could be observed in controls (Figs. 4–6).

The increases in MAP were masked when rats received RSNO, except for the lowest dose of $BUC(NO)_2$ (Figs. 4–6). Each drug induced a dose-dependent hypotension (fall in MAP). When comparing the maximal hypotension produced by the different treatments, at doses that are expected to release similar amounts of $^{\bullet}NO$, there was no significant difference between $BUC(NO)_2$ and the SNAP + NACNO mixture at 3.5 and 7 μmol/kg, but a trend for a greater hypotension with $BUC(NO)_2$ compared to SNAP + NACNO at 14 μmol/kg (Table 2). The changes in

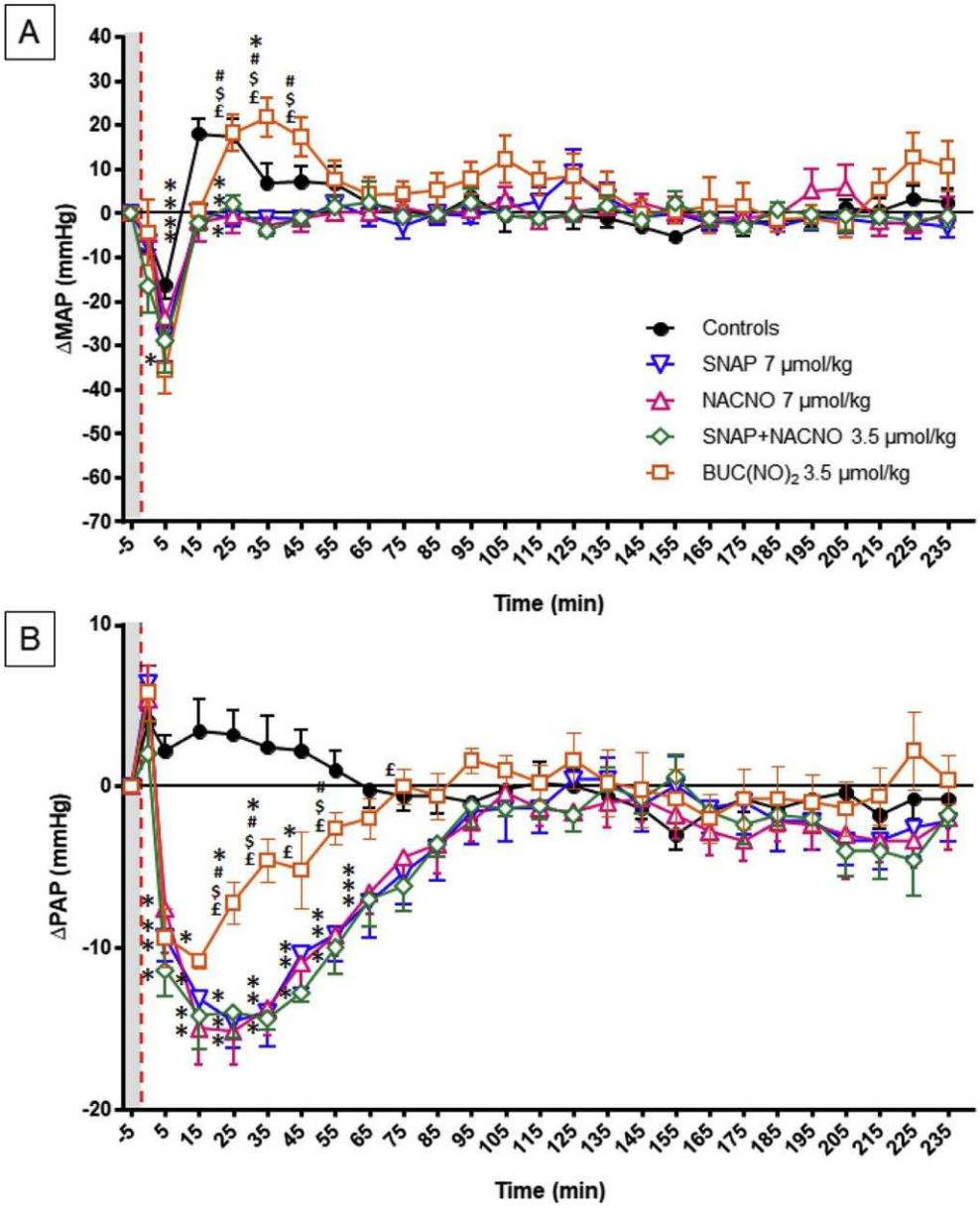


Fig. 4. Impact of low doses of *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO), the mixture SNAP + NACNO and *S,S′*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$) on mean arterial pressure (MAP, panel A) and pulse arterial pressure (PAP, panel B) variations (Δ) *versus* baseline.

For a better clarity, only one out of two values was plotted on the graph. Doses were compared on the basis of an equivalent $^{\bullet}NO$-load (half dose for SNAP + NACNO and $BUC(NO)_2$ *versus* mononitrosothiols). Each animal (n = 5) received all the drugs, each dose of each drug separated a by 2-day wash-out period. Grey boxes represent the duration of anesthesia and the red vertical dashed line the time of injection. *: $p < 0,05$ *vs* controls; #: $p < 0,05$ *vs* SNAP; $: $p < 0,05$ *vs* NACNO; £: $p < 0,05$ *vs* SNAP + NACNO; Panel A: $p_{interaction} < 10^{-4}$; $p_{drug} = 0.0688$; $p_{time} < 10^{-4}$; Panel B: $p_{interaction} < 10^{-4}$; $p_{drug} = 0.0210$; $p_{time} < 10^{-4}$; (two-way ANOVA; *post-hoc* Bonferroni test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

MAP lasted from 5 (lowest doses) to 50 min (highest doses) with no significant differences amongst the treatments ($p_{interaction} = 0.0680$; $p_{drug} = 0.2418$; $p_{dose} < 10^{-4}$; data not shown).

These changes in MAP induced significant increases in HR (stimulation of the baroreflex) when compared to vehicle-treated animals (Fig. 7). No noticeable difference could be observed among the groups receiving RSNO. The duration of the changes in HR did not differ amongst treatments, except for $BUC(NO)_2$ which induced a shorter effect than the SNAP + NACNO mixture (Fig. 8).

The duration of falls in PAP (around -15 mmHg for all drugs, whatever the doses used, Figs. 4 and 5) was dose-dependent. The effect of $BUC(NO)_2$ on PAP (from 37 to 96 min) was significantly shorter than those of the other treatments (SNAP: 69–113 min; NACNO: 78–117 min) and the SNAP + NACNO mixture had the most prolonged impact on PAP (92–136 min, Fig. 8).

4. Discussion

S,S′-dinitrosobucillamine seems to induce large and fast release of $^{\bullet}NO$ *in vivo*, as reflected by the stronger hypotension than the $^{\bullet}NO$-equimolar dose of SNAP + NACNO mixture (14 µmol/kg) and the shorter duration of effect on PAP compared to other RSNO. This parallels the *in vitro* results obtained in previous studies realized on isolated aortic rings, in which $BUC(NO)_2$ induced relaxation for the smallest concentration (Table 3, and [11]).

In the present study, changes in PAP were used to evaluate the duration of the RSNO effects. PAP is a function of arterial compliance/elastance, cardiac output and arterial tone, neither of which were measured in the present study as the protocols would have been too stressful for the animals. However, we used the duration of effect on PAP as a measure of the duration of the effect of RSNO, as (i) we previously published similar approach in Refs. [17,18] and (ii) RSNO are known to induce large venodilation [26]. Venodilation decreases venous return and cardiac preload and thus decreases stroke volume, the main factor controlling PAP. Therefore, PAP would decrease. We previously showed by direct measurements of aortic pulse wave velocity [27] that $^{\bullet}NO$-donor administration did not change the second factor controlling PAP, *i.e.* aortic wall elasticity. We thus suggest that the fall in PAP is most likely related to a fall in stroke volume consecutive to venodilation. However, we cannot rule out that other factors are

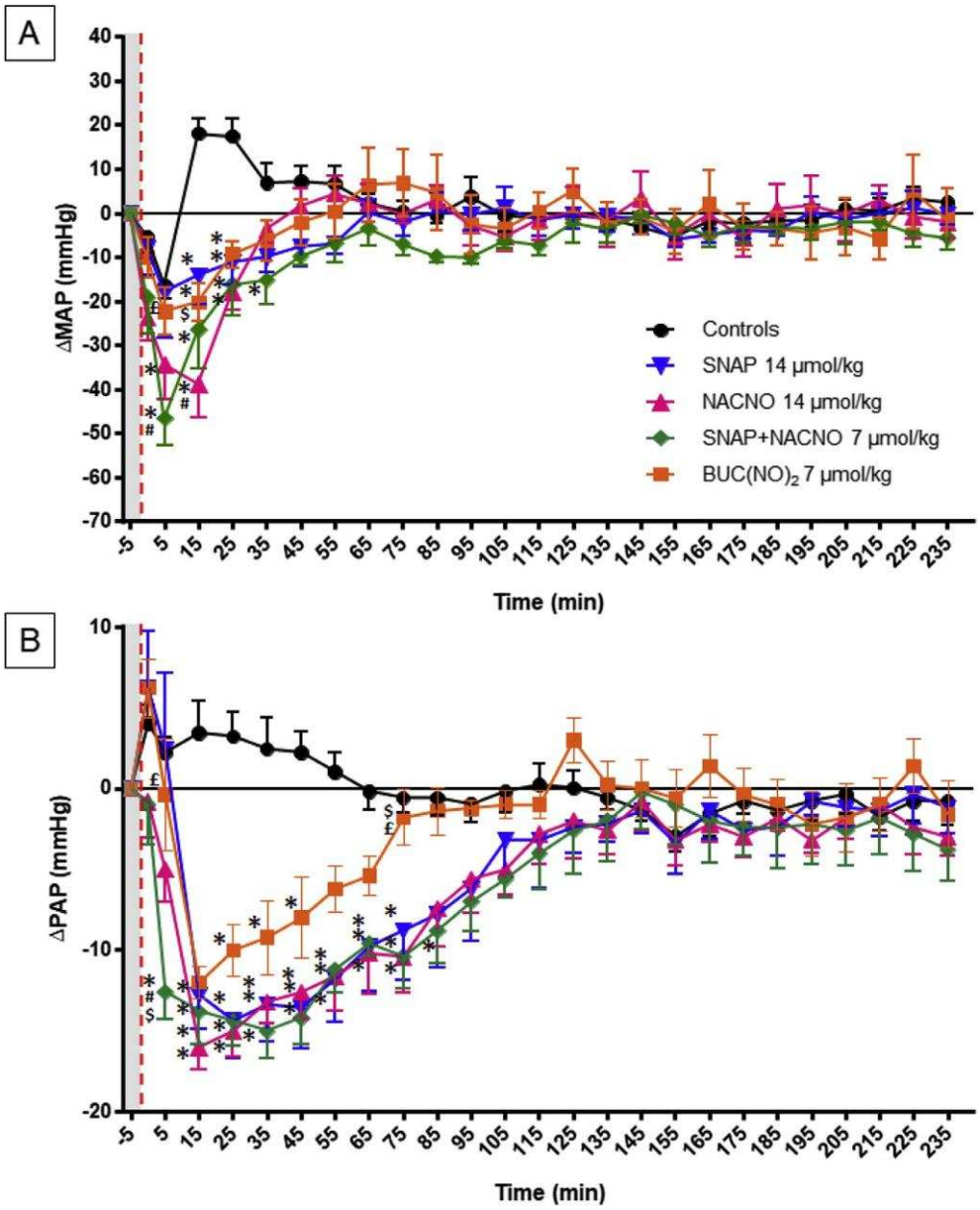


Fig. 5. Impact of medium doses of *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO), the mixture SNAP + NACNO and *S,S'*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$) on mean arterial pressure (MAP, panel A) and pulse arterial pressure (PAP, panel B) variations (Δ) *versus* baseline.

For a better clarity, only one out of two values was plotted on the graph. Doses were compared on the basis of an equivalent $^{\bullet}NO$-load (half dose for SNAP + NACNO and $BUC(NO)_2$ *versus* mononitrosothiols). Each animal (n = 5) received all the drugs, each dose of each drug separated a by 2-day wash-out period. Grey boxes represent the duration of anesthesia and the red vertical dashed line the time of injection. *: $p < 0,05$ *vs* controls; #: $p < 0,05$ *vs* SNAP; $: $p < 0,05$ *vs* NACNO; £: $p < 0,05$ *vs* SNAP + NACNO; Panel A: $p_{interaction} < 10^{-4}$; $p_{drug} = 0.2498$; $p_{time} < 10^{-4}$; Panel B: $p_{interaction} < 10^{-4}$; $p_{drug} = 0.0421$; $p_{time} < 10^{-4}$; (two-way ANOVA; *post-hoc* Bonferroni test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

involved in the effect of RSNO on stroke volume and PAP. A direct positive myocardial effect of RSNO [28] and the improvement of cardiac function due to hypotension-induced decrease in cardiac afterload or to baroreflex-stimulated sympathetic response might both compensate the fall in stroke volume and reduce or shorten the impact of RSNO on PAP.

We did not correlate these durations with plasmatic levels of the drugs as pharmacokinetics of RSNO and/or $^{\bullet}NO$ remain difficult to perform *in vivo*. The literature classically describes numerous pre-analytical and analytical difficulties to monitor plasma concentrations of RSNO such as *S*-nitrosoglutathione (GSNO) [29], in relationship with their poor stability (*e.g.* light, temperature and enzymes) [30]. For example, physiological concentration of GSNO is still a matter of debate, ranging from 0.00135 ± 0.00046 to 1.78 ± 0.76 µM [29]. In their recent paper [14], Heikal et al. attempted to evaluate the pharmacokinetic profiles of GSNO and SNOPCs by measuring both the total RSNO content in fractionated blood (plasma *vs.* blood cells) using gas-phase chemiluminescence reaction with ozone and the total nitrate and nitrite species (NO_x) using a Griess colorimetric-based method. Despite marked differences in hemodynamic effects, they failed to see any difference in the pharmacokinetic profiles of these drugs, suggesting that blood monitoring of total RSNO and NOx might not be sensitive enough to enable the determination of the pharmacokinetic profiles of RSNO.

In order to assess the metabolism of $BUC(NO)_2$, we used an *in vitro* approach consisting in loading freshly prepared plasma with RSNO. In this biological environment, we observed a significant faster degradation of $BUC(NO)_2$ compared with the other RSNO. Even though this approach cannot be considered as a pharmacokinetic study, these results are consistent with our *in silico* and *in vivo* results and seem to confirm a faster metabolism for $BUC(NO)_2$.

Assuming a 100% $^{\bullet}NO$ release, we compared, with respect to the molar concentrations of $^{\bullet}NO$, the effects of the dinitrosothiol $BUC(NO)_2$ and the SNAP + NACNO mixture, mononitrosothiols and other $^{\bullet}NO$-donors, *i.e.* isosorbide dinitrate (ISDN) and sodium nitroprusside (SNP) (Table 4). For a similar $^{\bullet}NO$-load, $BUC(NO)_2$ induces the shortest effects. The duration of its effects is half of the value obtained with SNAP + NACNO mixture and it is no longer than that of mononitrosothiols such as GSNO (Table 4 and [17,18]). When ISDN was injected subcutaneously, it did not induce any significant hypotension

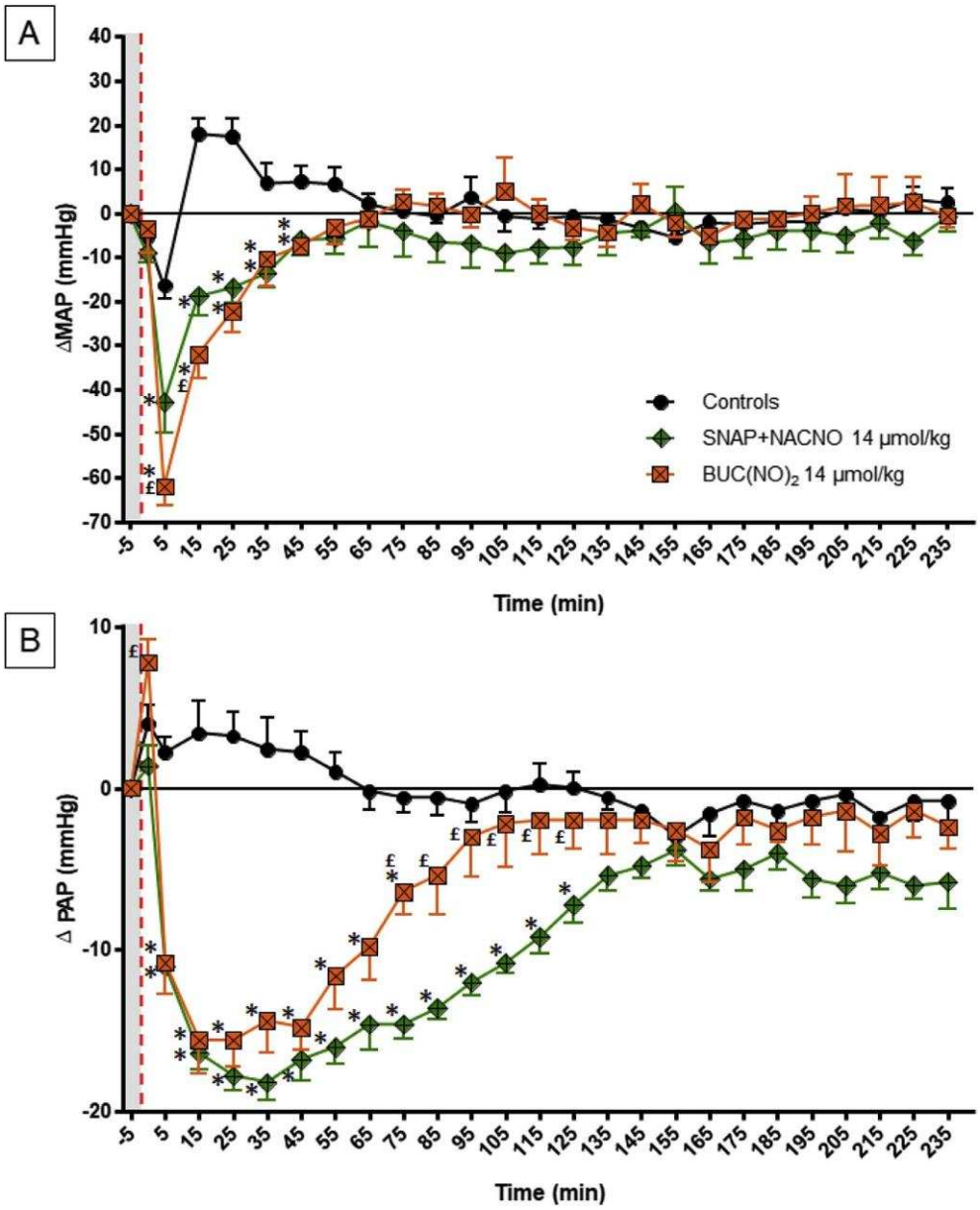


Fig. 6. Impact of high doses of the mixture *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine + *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (SNAP + NACNO) and *S,S'*-dinitrosobucillamine (BUC(NO)$_2$) on mean arterial pressure (MAP, panel A) and pulse arterial pressure (PAP, panel B) variations (Δ) *versus* baseline.

For a better clarity, only one out of two values was plotted on the graph. Each animal (n = 5) received all the drugs, each dose of each drug separated a by 2-day wash-out period. Grey boxes represent the duration of anesthesia and the red vertical dashed line the time of injection. *: $p < 0,05$ *vs* controls; £: $p < 0,05$ *vs* SNAP + NACNO; Panel A: $p_{interaction} < 10^{-4}$; $p_{drug} = 0.0979$; $p_{time} < 10^{-4}$; Panel B: $p_{interaction} < 10^{-4}$; $p_{drug} = 0.0003$; $p_{time} < 10^{-4}$; (two-way ANOVA; *post-hoc* Bonferroni test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

but a 15 mmHg decrease in PAP which lasted 37 min even at very high doses. Concerning SNP, the efficient dose to induce hypotension was 0.35 µmol/kg (0.0035 and 0.035 µmol/kg had no effect), with a -17 mmHg decrease in PAP lasting almost 100 min. At the dose of 3.5 µmol/kg, 2 out of the 5 rats died while the remaining ones underwent severe and prolonged hypotension (which led us to sacrifice the rats for exceeding the ethical limit points). These data led to several assumptions.

First, all RSNO produce *in vivo* both arterial (effect on MAP) and venous (effect on PAP) dilations. Despite the lack of report on PAP data, this can be assumed even for SNOPCs, with regards to the raw blood pressure recordings provided by Heikal et al. [14]. This is also the case for SNP but not for ISDN, which only produces a decrease in PAP, reflecting venodilation.

Second, regarding the arterial effect, RSNO seem less efficient than SNP, as they require a 20–40-fold higher ˙NO-load to produce similar hypotension. However, they appear safer, with a larger margin of safety, as they do not release cyanate leading to toxicity and death as observed at the end of this study (injection of SNP). The protocol used by Heikal et al. did not allow us to compare the arterial effect of SNOPCs to that of the drugs used in the present report as 1) the different routes of administration used (subcutaneous *vs.* intravenous) obviously imply a different dose range and 2) hemodynamics were not recorded in the same conditions (awake rats *vs.* anesthetized mice).

Third, regarding the venous effect (the main effect of ISDN and other organic nitrates explaining their use in angina pectoris, for instance, as venodilation decreases cardiac preload), RSNO seem more efficient than ISDN as they produce, for a much lower ˙NO-load, a comparable effect (-15 mmHg in PAP) which lasts longer. For example, BUC(NO)$_2$ induces the same effect duration on PAP (37 min) than ISDN but with a 6-fold lower ˙NO-load.

Finally, more than the total amount of administered ˙NO, the nature of the carrier and the number of SNO moieties seem to be major determinants of the biological activities of RSNO. At high doses, BUC(NO)$_2$ produced the most pronounced decrease in MAP (-62 mmHg), an effect that tend to be superior to that of the SNAP + NACNO mixture exhibiting the same ˙NO-load (Fig. 6 and Tables 2 and 4). This differential effect at high doses seems to be rather the consequence of a plateau effect reached at the medium dose for SNAP + NACNO, as the highest dose did not produce any further

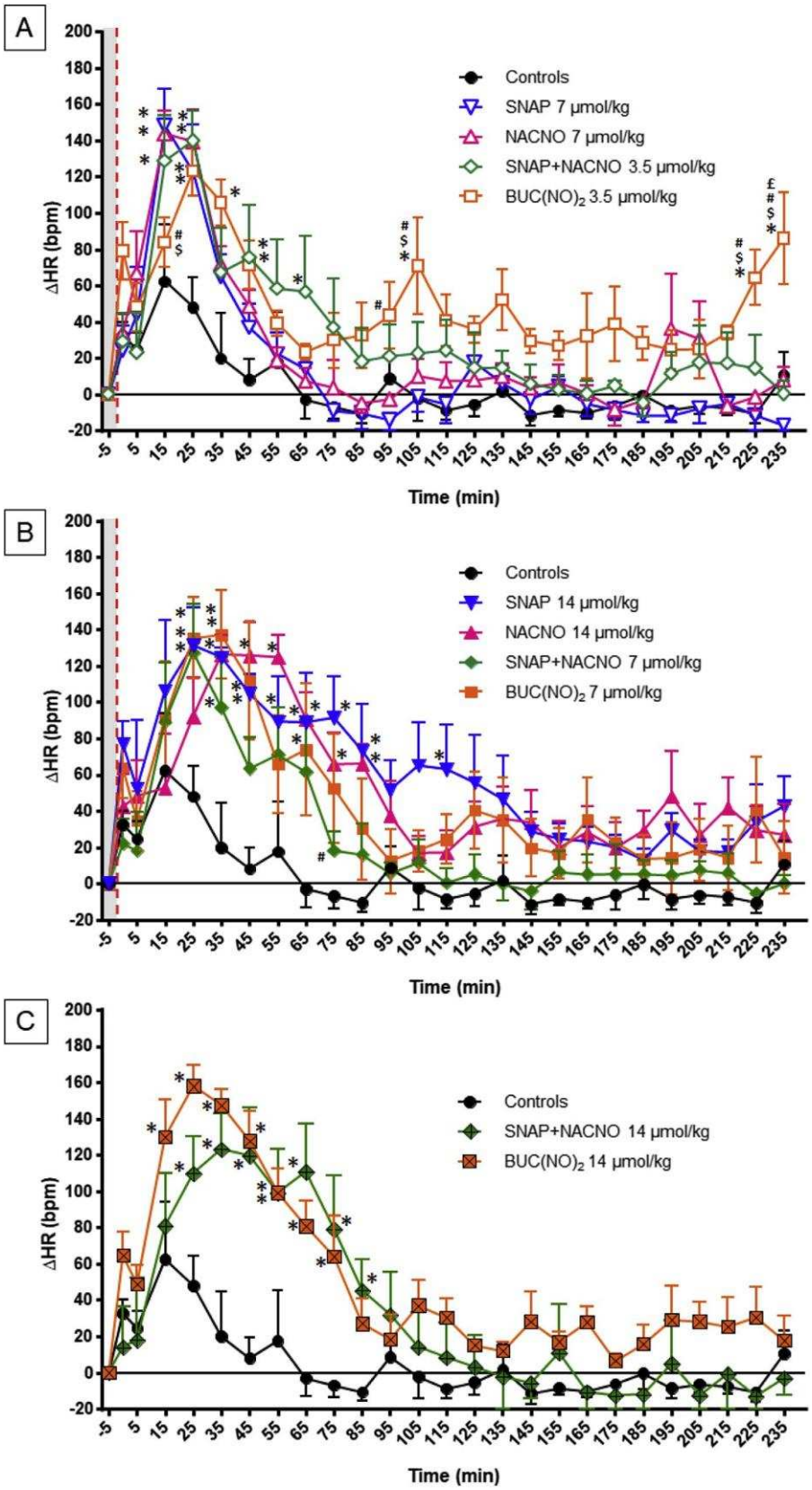


Fig. 7. Impact of low (panel A), medium (panel B) and high (panel C) doses of *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO), the mixture SNAP + NACNO and *S,S'*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$) on heart rate variations (ΔHR) *versus* baseline.

For a better clarity, only one out of two values was plotted on the graph. Doses were compared on the basis of an equivalent $^{\bullet}NO$-load (half dose for SNAP + NACNO and $BUC(NO)_2$ *versus* mononitrosothiols). Each animal (n = 5) received all the drugs, each dose of each drug separated a by 2-day washout period. Grey boxes represent the duration of anesthesia and the red vertical dashed line the time of injection. *: $p < 0,05$ *vs* controls; #: $p < 0,05$ *vs* SNAP; $: $p < 0,05$ *vs* NACNO; £: $p < 0,05$ *vs* SNAP + NACNO; Panel A: $p_{interaction} < 10^{-4}$; $p_{drug} = 0.0007$; $p_{time} < 10^{-4}$; Panel B: $p_{interaction} = 0.0853$; $p_{drug} = 0.0044$; $p_{time} < 10^{-4}$; Panel C: $p_{interaction} < 10^{-4}$; $p_{drug} = 0.0260$; $p_{time} < 10^{-4}$; (two-way ANOVA; *post-hoc* Bonferroni test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

reduction in MAP. This does not seem to be the case for $BUC(NO)_2$ as the highest dose induced a twofold higher impact on MAP variation compared with the medium dose. This is probably related to the faster metabolism of $BUC(NO)_2$ as suggested by our *in silico* findings and confirmed by our new data obtained in plasma. As the release of the first $^{\bullet}NO$ moiety facilitates the release of the second one (see below), this likely contributes to reach higher levels of $^{\bullet}NO$ than with the SNAP + NACNO mixture. Similar results were obtained by Heikal et al.

Table 2
Maximal mean arterial pressure effects of *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO), SNAP + NACNO and *S,S′*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$).
$p_{interaction}$ = 0.1463, p_{dose} = 0.0009 and p_{drug} = 0.0090 (two-way ANOVA; *post-hoc* Bonferroni test).

	SNAP			NACNO			SNAP + NACNO			$BUC(NO)_2$		
Dose (μmol/kg)	3.5	7	14	3.5	7	14	3.5	7	14	3.5	7	14
ΔMAP (mmHg)	−18 ± 6	−28 ± 6	−28 ± 10	−16 ± 7	−24 ± 11	−46 ± 6	−29 ± 2	−47 ± 6	−43 ± 7	−36 ± 5	−29 ± 5	−62 ± 4

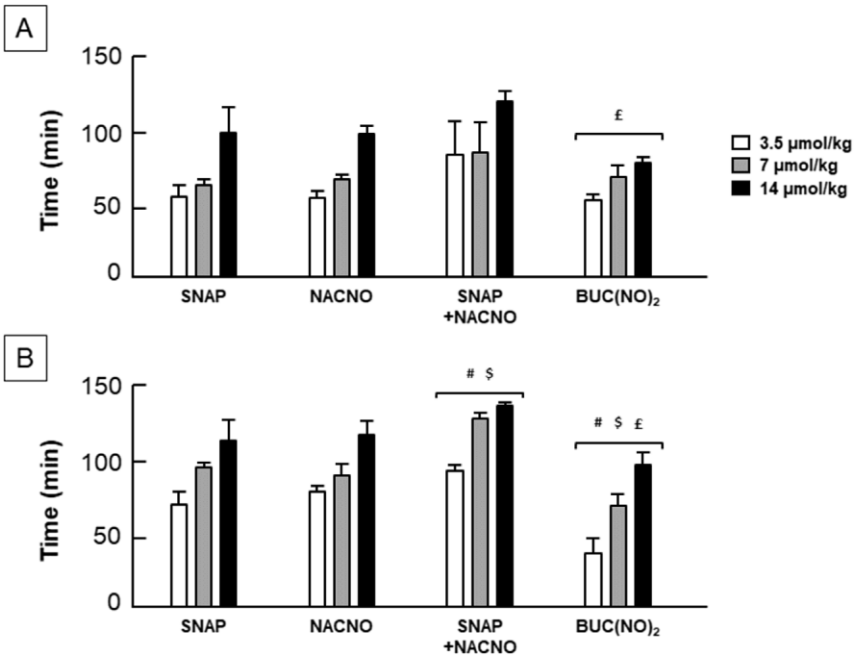


Fig. 8. Duration of effect of *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO), the mixture SNAP + NACNO and *S,S′*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$) on heart rate (HR, panel A) and pulse arterial pressure (PAP, Panel B).
#: p < 0,05 *vs* SNAP; $: p < 0,05 *vs* NACNO; £: p < 0,05 *vs* SNAP + NACNO; Panel A: $p_{interaction}$ = 0.6248; p_{drug} and p_{dose} < 10^{-4}; Panel B: $p_{interaction}$ = 0.9232; p_{drug} = 0.0127; p_{dose} < 10^{-4}; (two-way ANOVA; *post-hoc* Bonferroni test).

Table 3
Physicochemical and *ex vivo* vasorelaxant properties of *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO), SNAP + NACNO and *S,S′*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$).
Stability (expressed as RSNO half-life) was determined in a Krebs medium at 37 °C, pH 7.4. Hydrophobicity, determined by the partition coefficient (clog P), and •NO/RSNO mass ratio were calculated from ChemDraw software (CambridgeSoft, Perkin-Elmer, USA). The •NO content ([NO_x]) released from Wistar rat aortic rings exposed to RSNO was measured using the fluorogenic probe DAF-2 DA (4,5-diaminofluorescein diacetate). The vasorelaxant effects were evaluated *via* the pD_2 values (-log EC_{50}) from concentration response curves of isolated aortic rings precontracted with phenylephrine. Results are issued from Ref. [11].

	Half-life (h)	clog P	•NO/RSNO mass ratio	[NO_x] (μM)	pD_2
SNAP	5	0.08	0.16	–	6.7
NACNO	63	- 0.46	0.14	–	6.4
SNAP + NACNO	–	–	0.15	420	6.7
$BUC(NO)_2$	13	1.08	0.21	650	7.8

when they administered SNOPCs and GSNO *in vivo* at equal molar concentrations of SNO. The SNOPC carrying 6 SNO moieties induced a more pronounced decrease in blood pressure than GSNO or the SNOPC carrying 2 SNO [14]. Taken together, these data suggest that the intrinsic molecular characteristics of the SNO-carrier are a key determinant of the RSNO biological activity.In the present work, we have studied the •NO dissociation mechanism in $BUC(NO)_2$ and compared the results to those previously obtained for SNAP and NACNO [20]. As discussed before, the homolytic dissociation in SNAP and NACNO can be assumed to be a barrierless process. The calculated reaction free energies for •NO dissociation in SNAP and NACNO were 12.8 and 17.8 kcal mol^{-1}, respectively [20]. For $BUC(NO)_2$, all dissociation processes lie within the range of 16–17 kcal mol^{-1}, which suggests that

Table 4
Decreases in mean and pulse arterial pressures and duration of effects of *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO), SNAP + NACNO, *S,S′*-dinitrosobucillamine ($BUC(NO)_2$), *S*-nitrosoglutathione (GSNO), isosorbide dinitrate (ISDN) and sodium nitroprusside (SNP) at different doses and •NO -loads (subcutaneous administration).

Molecule	Dose (μmol/kg)	•NO-load (μmol/kg)	ΔMAP (mmHg)	Duration PAP (min)	Reference
SNAP	7.0	**7**	**−28**	95	Present results
NACNO	7.0	**7**	−24	89	
SNAP + NACNO	3.5	**7**	−29	92	
$BUC(NO)_2$	3.5	**7**	**−36**	37	
SNAP	17.0	17	**−27**	65	[17]
SNAP	14.0	14	−28	113	Present results
NACNO	14.0	14	−46	117	
SNAP + NACNO	7.0	14	−47	128	
$BUC(NO)_2$	7.0	14	**−29**	69	
GSNO	11.0	11	**−24**	60	[18]
SNAP	34.0	34	−30	85	[17]
SNAP + NACNO	14.0	28	−43	136	Present results
$BUC(NO)_2$	14.0	28	−62	96	
GSNO	22.0	22	**−37**	65	[18]
ISDN	21.0 (42.0, 85.0)	42 (84, 170)	No effect	37	Present results
SNP	0.035	0.035	No effect	No effect	
SNP	0.35	0.35	−49	96	

dissociation in $BUC(NO)_2$ is significantly less favorable than in SNAP and slightly more favorable than in NACNO. However, $BUC(NO)_2$

induced the shortest *in vivo* observed effects (Table 4).

Several explanations could contribute to this discrepancy. First, given the adopted assumptions in our calculations, these kinetic constant values are only approximations to the real experimental values. Moreover, the *in silico* theoretical results cannot augur for a potential faster degradation rate for $BUC(NO)_2$ than for NACNO and SNAP *in vivo*. Indeed, we previously showed *in vitro* that the denitrosation pathway [12,31] of $BUC(NO)_2$ depends on the protein disulfide isomerase (PDI) activity, which is not the case for either NACNO or SNAP [11]. While this remains to be evaluated *in vivo*, this could explain why $BUC(NO)_2$ has a shorter effect compared to mononitrosothiols and the mixture. In their studies, Heikal et al. also tried to explain the differences of $^{\bullet}NO$ release from RSNO studying the effect of various enzymes [12]. While PDI has an effect on both GSNO and SNOPCs, γ-glutamyl transpeptidase only had an effect on GSNO. Taken together, these results highlight the importance of enzyme-dependent metabolism in the observed difference of RSNO action.

Finally, the faster $^{\bullet}NO$ release from $BUC(NO)_2$ could also rely on specific physico-chemical properties such as the molecular electronic structure of $BUC(NO)_2$. After the release of the first $^{\bullet}NO$ moiety (possibly related to enzymatic processes, as suggested above), the resulting sulfur free radical reacts with the remaining SNO group leading to the immediate release of the second $^{\bullet}NO$ moiety and formation of an intramolecular disulfide bond (Fig. 1). This was confirmed by the LC-MS/MS analysis of the degradation products of $BUC(NO)_2$ under two operating conditions (heating and exposure to an oxidizing agent *i.e.* H_2O_2) showing the presence of a degradation product including an intramolecular disulfide bond (Fig. 2). A similar hypothesis has been proposed for SNOPCs, as they are prone to a more rapid physico-chemical degradation *in vitro* than GSNO, which correlates with the formation of intramolecular disulfide bonds, assessed by mass spectrometry [32]. This fast release of the first $^{\bullet}NO$ moiety followed by the formation of an intramolecular disulfide bridge can contribute to the faster metabolism of $BUC(NO)_2$ observed *in vitro* in plasma and thus to the its shorter effect compared to NACNO and SNAP. The more lipophilic nature of $BUC(NO)_2$ compared to SNAP and NACNO (Table 3, [11]) could also contribute to the faster $^{\bullet}NO$ release. When administered subcutaneously, the lipophilic properties of $BUC(NO)_2$ may accelerate its flow through cellular membranes within blood vessels and thus lead to a faster systemic effect.

In the field of RSNO and their clinical use, the most important challenge actually is to control kinetics and amounts of $^{\bullet}NO$ to be released, especially during pathologies where oxidative stress may lead to nitrosative derivation of $^{\bullet}NO$ when released from RSNO [33]. In this context, the capacity of $BUC(NO)_2$ to quickly release a great quantity of $^{\bullet}NO$ may be considered as a disadvantage. However, when compared to other commercially available fast $^{\bullet}NO$ donors such as SNP, $BUC(NO)_2$ would certainly not induce side effects, as bucillamine, when used as an anti-inflammatory and antioxidant agent, does not produce serious adverse events [16]. Furthermore, as lipophilic molecules are easier to encapsulate [34], formulation of $BUC(NO)_2$ would be a good strategy to increase duration of its effects in pathologies that requires a slow and sustained release of $^{\bullet}NO$ (*e.g.* post-stroke, [17]).

As a conclusion, the hypothesis that increasing $^{\bullet}NO$ payload on polythiols would increase the efficiency of corresponding RSNO seems to depend on the nature of the thiolated molecule carrying $^{\bullet}NO$. Rather than increasing the number of $^{\bullet}NO$, attention must be payed to the choice of the molecule carrying $^{\bullet}NO$, as numerous factors are involved in the degradation of RSNO.

Funding sources

This work was supported by the French Ministry of Research and Education (Paris, France).

Disclosures

None.

References

[1] S. Moncada, E.A. Higgs, Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance, Eur. J. Clin. Invest. 21 (1991) 361–374.
[2] J.A. Bauer, H.L. Fung, Differential hemodynamic effects and tolerance properties of nitroglycerin and an S-nitrosothiol in experimental heart failure, J. Pharmacol. Exp. Ther. 256 (1991) 249–254.
[3] J.D. Parker, T. Gori, Tolerance to the organic nitrates: new ideas, new mechanisms, continued mystery, Circulation 104 (2001) 2263–2265.
[4] U. Förstermann, T. Münzel, Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace, Circulation 113 (2006) 1708–1714.
[5] C. Gaucher, A. Boudier, F. Dahboul, M. Parent, P. Leroy, S-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of S-nitrosothiols, Curr. Pharm. Des. 19 (2013) 458–472.
[6] C. Mancuso, A. Bonsignore, E. Di Stasio, A. Mordente, R. Motterlini, Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide, Biochem. Pharmacol. 66 (2003) 2355–2363.
[7] J.L. Alencar, I. Lobysheva, K. Chalupsky, M. Geffard, F. Nepveu, J.C. Stoclet, B. Muller, S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries, J. Pharmacol. Exp. Ther. 307 (2003) 152–159.
[8] B. Furlong, A.H. Henderson, M.J. Lewis, J.A. Smith, Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation, Br. J. Pharmacol. 90 (1987) 687–692.
[9] H. Al-Sa'doni, A. Ferro, S-nitrosothiols as nitric oxide-donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications, Curr. Med. Chem. 11 (2004) 2679–2690.
[10] W. Wu, C. Perrin-Sarrado, H. Ming, I. Lartaud, P. Maincent, X.M. Hu, A. Sapin-Minet, C. Gaucher, Polymer nanocomposites enhance S-nitrosoglutathione intestinal absorption and promote the formation of releasable nitric oxide stores in rat aorta, Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 12 (2016) 1795–1803.
[11] F. Dahboul, C. Perrin-Sarrado, A. Boudier, I. Lartaud, R. Schneider, P. Leroy, S,S'-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other S-nitrosothiols, Eur. J. Pharmacol. 730 (2014) 171–179.
[12] L. Heikal, P.I. Aaronson, A. Ferro, M. Nandi, G.P. Martin, L.A. Dailey, S-nitrosophytochelatins: investigation of the bioactivity of an oligopeptide nitric oxide delivery system, Biomacromolecules 12 (2011) 2103–2113.
[13] I.L. Megson, I.R. Greig, A.R. Butler, G.A. Gray, D.J. Webb, Therapeutic potential of S-nitrosothiols as nitric oxide donor drugs, Scott. Med. J. 42 (1997) 88–89.
[14] L. Heikal, A. Starr, G.P. Martin, M. Nandi, L.A. Dailey, In vivo pharmacological activity and biodistribution of S-nitrosophytochelatins after intravenous and intranasal administration in mice, Nitric Oxide 59 (2016) 1–9.
[15] L.D. Horwitz, Bucillamine: a potent thiol donor with multiple clinical applications, Cardiovasc. Drug Rev. 21 (2003) 77–90.
[16] N. Sekiguchi, H. Kameda, K. Amano, T. Takeuchi, Efficacy and safety of bucillamine, a D-penicillamine analogue, in patients with active rheumatoid arthritis, Mod. Rheumatol. 16 (2006) 85–91.
[17] M. Parent, A. Boudier, F. Dupuis, C. Nouvel, A. Sapin, I. Lartaud, J.L. Six, P. Leroy, P. Maincent, Are in situ formulations the keys for the therapeutic future of S-nitrosothiols? Eur. J. Pharm. Biopharm. 85 (2013) 640–649.
[18] M. Parent, A. Boudier, J. Perrin, C. Vigneron, P. Maincent, N. Violle, J.F. Bisson, I. Lartaud, F. Dupuis, In Situ microparticles loaded with S-Nitrosoglutathione protect from stroke, PLoS One 10 (2015) e0144659.
[19] M. Parent, F. Dahboul, R. Schneider, I. Clarot, P. Maincent, P. Leroy, A. Boudier, A complete physicochemical identity card of S-nitrosoglutathione, Curr. Pharm. Anal. 9 (2013) 31–42.
[20] B. Meyer, A. Genoni, A. Boudier, P. Leroy, M.F. Ruiz-Lopez, Structure and stability studies of pharmacologically relevant S-Nitrosothiols: a theoretical approach, J. Phys. Chem. A 120 (2016) 4191–4200.
[21] J.P. Perdew, Y. Wang, Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy, Phys. Rev. B Condens Matter 45 (1992) 13244–13249.
[22] E. Cancès, B. Mennucci, J. Tomasi, A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics, J. Chem. Phys. 107 (1997) 3032–3041.
[23] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N.J. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, 2009.
[24] P. Pikul, M. Jamrogiewicz, J. Nowakowska, W. Hewelt-Belka, K. Ciura, Forced degradation studies of ivabradine and in silico toxicology predictions for its new designated impurities, Front. Pharmacol. 7 (2016) 117.
[25] J. Sun, X. Zhang, M. Broderick, H. Fein, Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay, Sensors 3 (2003) 276–284.

[26] N. Sogo, C. Campanella, D.J. Webb, I.L. Megson, S-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery, Br. J. Pharmacol. 131 (2000) 1236–1244.
[27] N. Niederhoffer, V. Marque, I. Lartaud-Idjouadiene, C. Duvivier, R. Peslin, J. Atkinson, Vasodilators, aortic elasticity, and ventricular end-systolic stress in nonanesthetized unrestrained rats, Hypertension 30 (1997) 1169–1174.
[28] T. Rassaf, L.W. Poll, P. Brouzos, T. Lauer, M. Totzeck, P. Kleinbongard, P. Gharini, K. Andersen, R. Schulz, G. Heusch, U. Modder, M. Kelm, Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans, Eur. Heart J. 27 (2006) 1699–1705.
[29] D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, R. Rossi, Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: a comparison among the most widely applied methodologies, J. Chromatogr. B 851 (2007) 124–139.
[30] E. Bramanti, V. Angeli, Z. Mester, A. Pompella, A. Paolicchi, A. D'Ulivo, Determination of S-nitrosoglutathione in plasma: comparison of two methods, Talanta 81 (2010) 1295–1299.
[31] R. Xiao, J. Lundström-Ljung, A. Holmgren, H.F. Gilbert, Catalysis of thiol/disulfide exchange. Glutaredoxin 1 and protein-disulfide isomerase use different mechanisms to enhance oxidase and reductase activities, J. Biol. Chem. 280 (2005) 21099–21106.
[32] L. Heikal, G.P. Martin, L.A. Dailey, Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelatins, Nitric Oxide 20 (2009) 157–165.
[33] Y. Liu, C. Xia, R. Wang, J. Zhang, T. Yin, Y. Ma, L. Tao, The opposite effects of nitric oxide donor, S-nitrosoglutathione, on myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic and non-diabetic mice, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 44 (8) (2017) 854–861, http://dx.doi.org/10.1111/1440-1681.12781.
[34] M. Parent, C. Nouvel, M. Koerber, A. Sapin, P. Maincent, A. Boudier, PLGA in situ implants formed by phase inversion: critical physicochemical parameters to modulate drug release, J. Control. Release 172 (2013) 292–304.

Conclusion de l'étude

Nos résultats montrent que $BUC(NO)_2$ tend à induire, *in vivo*, une hypotension plus forte que les autres RSNO, cependant la durée de l'effet est plus courte (mesurée *via* la durée de la diminution de PAP) comparée à NACNO, SNAP ou au mélange SNAP+NACNO. Comme expliqué précédemment, les RSNO sont connus pour induire une dilatation des artères et des veines. Ici les effets de $BUC(NO)_2$ sont plus importants comparés aux autres RSNO. Cela pourrait s'expliquer par une libération rapide de ses deux groupements NO. En effet notre étude de modélisation moléculaire a montré que la libération du premier groupement NO favorise la libération du second radical NO afin de permettre la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Ainsi une libération rapide de ces deux groupements expliquerait la plus grande hypotension et l'effet plus court. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de la dégradation des RSNO dans du plasma, qui montre une dégradation plus rapide de $BUC(NO)_2$.

Pour un développement clinique, la libération rapide de NO de $BUC(NO)_2$ pourrait constituer un désavantage. Cependant comparée à d'autres donneurs de NO, comme le SNP, $BUC(NO)_2$ présente l'avantage d'avoir une action anti-oxydante et anti-inflammatoire et de ne pas induire des effets secondaires comme la libération d'ions cyanure. De plus, son caractère lipophile lui permettrait d'être facilement encapsulée ce qui permettrait ainsi de contrôler sa cinétique de libération. L'encapsulation est une des voies explorées pour augmenter la demi-vie des RSNO (*Parent *et al*. 2013a).

Ces résultats mettent en évidence que l'augmentation de la charge de NO n'est pas forcément associée à une augmentation de la durée de l'effet, contrairement à l'hypothèse avancée par Heikal *via* les SNOPCs (Heikal *et al*. 2011). De nombreux facteurs (structure, lipophilie, enzymes…) interviennent dans la vitesse de dégradation des RSNO et rendent le choix du thiol primordial dans le développement de nouveaux donneurs de NO.

En conclusion, nous avons vu que le NO a de nombreuses fonctions *via* ses différentes voies de signalisation. Au niveau cérébral, il est principalement connu pour son rôle vasodilatateur mais peut aussi moduler l'activité de protéines impliquées dans la régulation de la circulation cérébrale. Il agit notamment sur des effecteurs du système rénine angiotensine que nous allons maintenant présenter.

II. Le système rénine angiotensine

La découverte du système rénine angiotensine (SRA) remonte à 1898 lorsque Tigersted et Bergman publièrent les résultats de leurs recherches sur une substance présente dans les reins provoquant une augmentation de la pression artérielle (Tigerstedt et Bergman 1898). Les auteurs proposèrent alors le terme « rénine » pour désigner cette substance. Cette découverte fut oubliée, contestée, jusqu'aux travaux de Goldblatt qui ont montré que l'ischémie provoquée par le clampage de l'artère rénale induisait une hypertension artérielle (Goldblatt *et al*. 1934). La rénine a un caractère protéolytique et permet la libération d'un peptide qui fut alors appelé « angiotonine » (Page 1939) ou « hypertensine » (Braun-Menèndez et Fasciolo 1939). Un consensus fut ensuite trouvé autour du terme « angiotensine ». Il fallut attendre 1954 pour que les travaux de Skeggs mettent en évidence l'existence de deux types d'angiotensines, l'angiotensine I (Ang I) et l'angiotensine II (Ang II) (Skeggs *et al*. 1954). Ils identifieront par la suite une enzyme, l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA), permettant le clivage de l'Ang I en Ang II (Skeggs *et al*. 1956).

L'ensemble de ces découvertes permettra d'établir le concept d'un système unique, le système rénine angiotensine, jouant un rôle prédominant dans la régulation de la pression artérielle.

1) Physiologie du système rénine angiotensine

Outre son rôle dans la régulation de la pression artérielle, le SRA participe à la régulation de l'homéostasie sodique et du volume plasmatique. L'activation du SRA se fait par une cascade de réactions enzymatiques qui commence par la synthèse de la rénine par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire sous forme de préprorénine. Cette protéine de 406 acides aminés est clivée pour former la prorénine. La prorénine est ensuite transformée au niveau de grains de sécrétion en rénine active avant d'être libérée au niveau plasmatique (Hackenthal *et al.* 1990). La libération de rénine est stimulée par différents facteurs, diminution de la perfusion glomérulaire, diminution de la concentration urinaire en sodium ou encore stimulation bêta-adrénergique des cellules juxtaglomérulaires. La rénine constitue le facteur limitant du SRA.

Une fois libérée, la rénine permet de cliver l'angiotensinogène, une protéine de 458 acides aminés produite en grande partie par le foie, en Ang I. L'Ang I est un décapeptide inactif, qui est rapidement clivé par l'ECA en Ang II (Skeggs *et al.* 1967). L'Ang II est ensuite dégradée en angiotensine III (Ang III) et angiotensine IV (Ang IV) respectivement pas les aminopeptidases de type A et de type N (Figure 6).

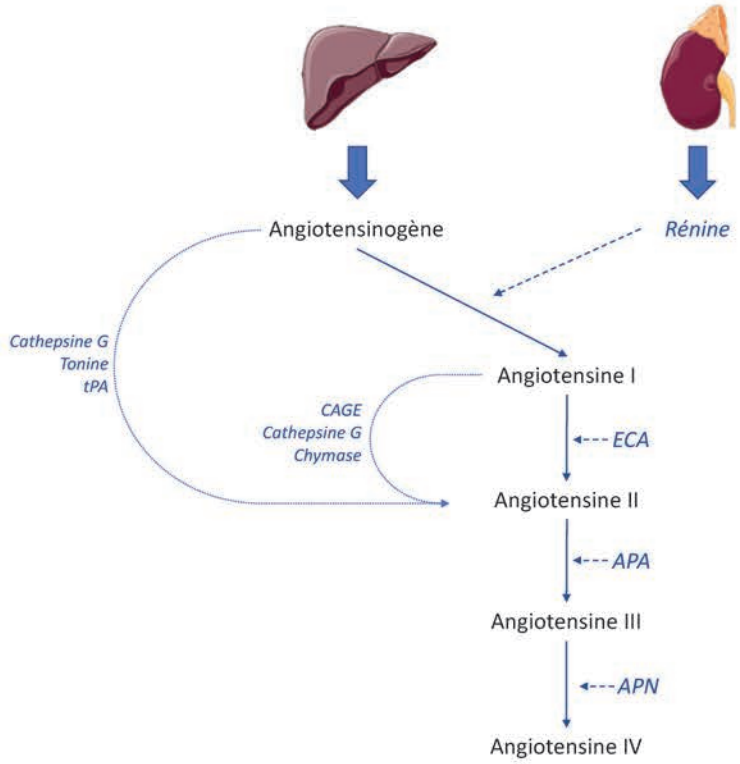


Figure 6 : Description du système rénine angiotensine

(APA : aminopeptidase A ; APN : aminopeptidase N ; CAGE : Chymostatin-sensitive Angiotensin II Generating Enzyme ; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine ; tPA : activateur tissulaire du plasminogène)

Bien que la conversion de l'Ang I par l'ECA constitue la principale voie de génération d'Ang II, d'autres voies ont été identifiées. L'angiotensinogène peut être directement clivée en Ang II par la cathepsine G, la tonine ou encore l'activateur tissulaire du plasminogène. De même l'Ang I peut être clivée en Ang II par la cathepsine G, des chymases ou encore l'enzyme de génération de l'angiotensine II sensible à la chymostatine (*Chymostatin-senstive Angiotensin II Generating Enzyme*, CAGE) (Weir et Dzau 1999). Il a été suggéré que la génération d'Ang II intratissulaire par ces voies alternatives pourrait jouer un rôle critique dans la progression de pathologies vasculaires (Urata *et al*. 1990 ; Ihara *et al*. 1999). Cependant la majorité de ces études ont été menées *in vitro*, si bien qu'aucun consensus sur l'importance de ces voies alternatives à l'échelle de l'organisme entier n'a été trouvé (Atlas 2007).

En condition physiologique, l'activité du SRA est augmentée suite à une diminution de la pression artérielle et de la perfusion rénale (Guyton 1991) grâce à une augmentation de la synthèse de rénine. L'Ang II sécrétée va alors agir de différentes manières pour rétablir une pression artérielle optimale.

Tout d'abord, l'Ang II se lie à ses récepteurs situés sur les cellules musculaires lisses (*cf*. paragraphe AT_1, p 55) entrainant ainsi une vasoconstriction et donc une augmentation de la pression artérielle (Timmermans *et al*. 1993). De plus la contraction des artérioles rénales afférentes entraine une diminution du débit de filtration glomérulaire et favorise donc une réabsorption d'eau et de sodium.

En parallèle, l'Ang II induit au niveau de la glande corticosurrénale, la libération d'aldostérone. Cette hormone minéralocorticoïde participe à l'augmentation de la pression artérielle en augmentant elle aussi la réabsorption d'eau et de sodium au niveau du tube distal.

Enfin, au niveau du système nerveux central l'Ang II est capable d'induire une sensation de soif et d'appétence pour le sel (Fitzsimons 1998), et de stimuler la libération de l'hormone anti-diurétique (aussi appelée vasopressine) (Ganong 1984) et de noradrénaline qui contribuent aussi à augmentation de la pression artérielle à long terme (Figure 7).

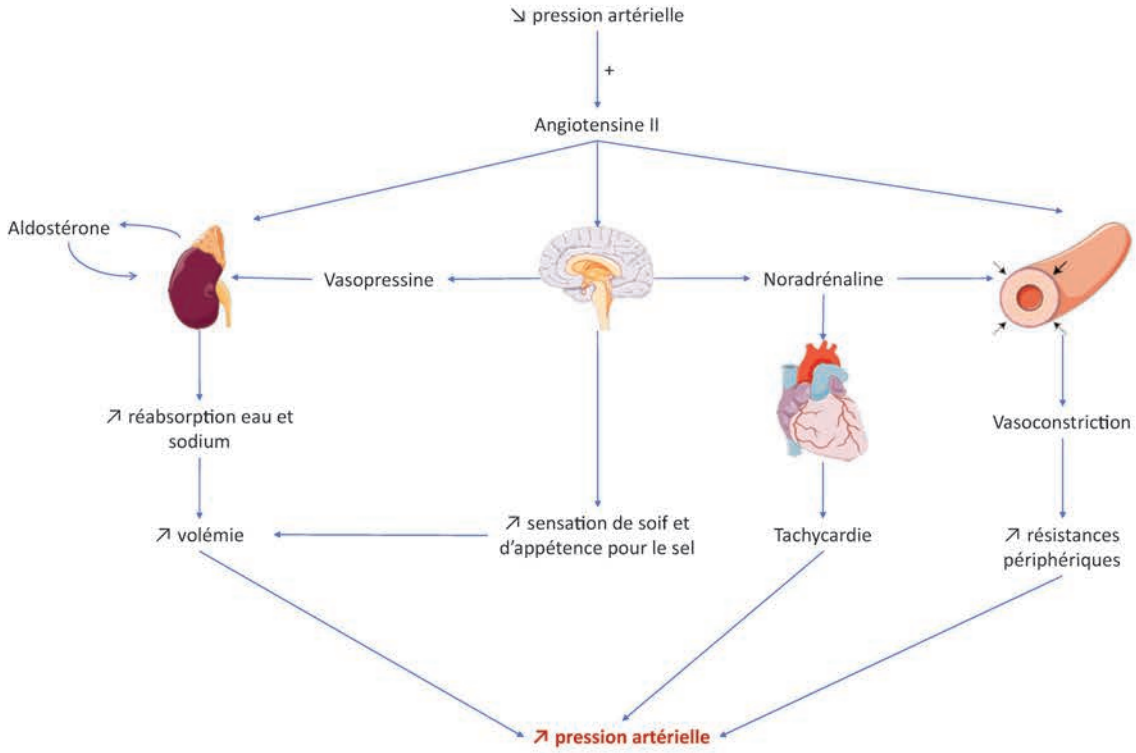


Figure 7 : Schéma simplifié des mécanismes d'action de l'angiotensine II induisant une augmentation de pression artérielle

Depuis plusieurs années, l'augmentation de notre compréhension du SRA fait apparaître un système beaucoup plus complexe que celui initialement décrit (Bril et Félétou 2014 ; Santos 2014) (Figure 8).

Nous décrirons en particulier ci-après les axes « ECA2- Ang(1-7) - MAS » et « angiotensine A – Alamandine – MrgD » qui font actuellement l'objet de nombreuses recherches.

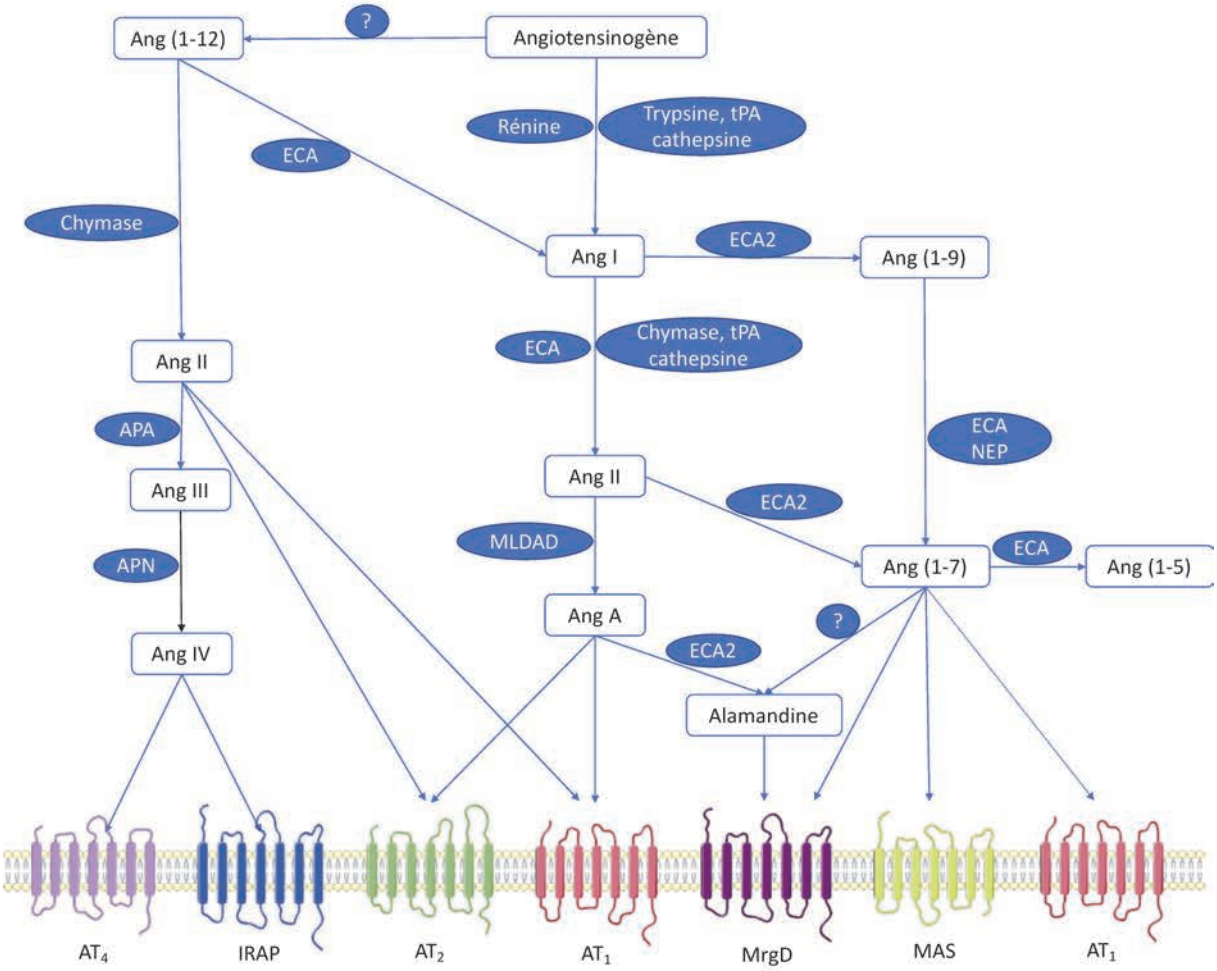


Figure 8 : Schéma du système rénine angiotensine intégrant certains des nouveaux acteurs identifiés

(Ang : angiotensine ; APA : aminopeptidase de type A ; APN : aminopeptidase de type N ; AT_1, AT_2 : récepteurs de type 1 et de type 2 de l'angiotensine II ; AT_4 : récepteur de l'angiotensine IV ; ECA(2) : enzyme de conversion (2) de l'angiotensine I ; IRAP : insulin-regulated aminopeptidase enzyme ; MAS : récepteur à l'angiotensine oncogène Mas ; MLDAD : mononuclear leukocyte-derived aspartate decarboxylase ; MrgD : Mas-related G protein-coupled receptor D ; NEP : endopeptidase neutre ; tPA : activateur tissulaire du plasminogène)

- *L'axe ECA2- Ang (1-7) - MAS*

Bien que découverte en 1976, l'Ang (1-7) fut longtemps considérée comme inactive (Semple *et al*. 1976). Il fallut attendre la fin des années 80 pour mettre en évidence que l'Ang (1-7) induisait une diminution de la pression artérielle lorsqu'elle était injectée à très petites doses (fmol) (Campagnole-Santos *et al*. 1989).

La découverte de l'enzyme de conversion 2 de l'angiotensine I (ECA2) a permis d'élucider l'origine de l'Ang (1-7) (Donoghue *et al*. 2000 ; Tipnis *et al*. 2000). L'Ang (1-7) peut être synthétisée soit directement à partir d'Ang II grâce à l'ECA2, soit indirectement par une première conversion de l'Ang I en Ang (1-9) *via* l'ECA2 puis par clivage de l'Ang (1-9) en Ang (1-7) par l'ECA (Figure 9, p52). Par la suite, l'équipe de Santos a mis en évidence la fixation de l'Ang (1-7) à un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), le récepteur MAS (Santos *et al*. 2003).

De nombreuses études se sont intéressées aux effets cardiovasculaires de l'Ang (1-7). Elle est principalement connue pour son rôle vasodilatateur. Il a par exemple été montré qu'elle induisait une vasodilatation des artères coronaires de porcs (Pörsti *et al*. 1994), de chiens (Brosnihan *et al*. 1996) ou encore d'anneaux aortiques de rongeurs (Marques *et al*. 2012) *via* une libération de NO. Ces résultats ont été confirmés sur un modèle de cardiomyocytes, où l'exposition à l'Ang (1-7) entraine une libération de NO *via* activation de la eNOS et de la nNOS (Dias-Peixoto *et al*. 2008 ; Costa *et al*. 2010). Chez l'homme les résultats sont plus conflictuels. En effet certaines études soutiennent un effet vasodilatateur de l'Ang (1-7) (Sasaki *et al*. 2001 ; Durand *et al*. 2016 ; Schinzari *et al*. 2018), alors que d'autres n'ont pas réussi à reproduire ces résultats (Wilsdorf *et al*. 2001).

En plus de cet effet vasodilatateur, l'Ang (1-7) a d'autres effets cardioprotecteurs. Elle entraine notamment une diminution du remodelage ventriculaire (Santos *et al*. 2004), des résistances périphériques (Sampaio *et al*. 2003), de la prolifération des CML (Freeman *et al*. 1996) ou encore une diminution des arythmies cardiaques provoquées par un protocole d'ischémie/reperfusion (Ferreira *et al*. 2001). Une revue détaillée des effets de l'Ang (1-7) au niveau cardiovasculaire a été publiée par Santos (Santos 2014). L'ensemble de ces effets

cardioprotecteurs de l'Ang (1-7), qui s'opposent à ceux de l'Ang II, la rendent intéressante pour le développement de nouvelles thérapeutiques.

Outre son rôle vasodilatateur l'Ang (1-7) a aussi des propriétés anti-angiogéniques (Krishnan *et al*. 2013) qui sont actuellement évaluées en clinique chez des patients atteints de sarcomes métastatiques (Savage *et al*. 2016).

Encore plus récemment, de nouvelles découvertes ont été faites autour de l'Ang (1-7), qui a été identifiée comme un agoniste biaisé β-arrestine d'AT_1 (Teixeira *et al*. 2017). Cette notion d'agonisme biaisé pour AT_1 sera discuté dans la partie suivante (cf - paragraphe Structure et conformation d'AT_1 - p57). De nouvelles études sont donc nécessaires pour définir clairement le rôle de l'Ang (1-7) chez l'homme et confirmer son éventuel intérêt thérapeutique.

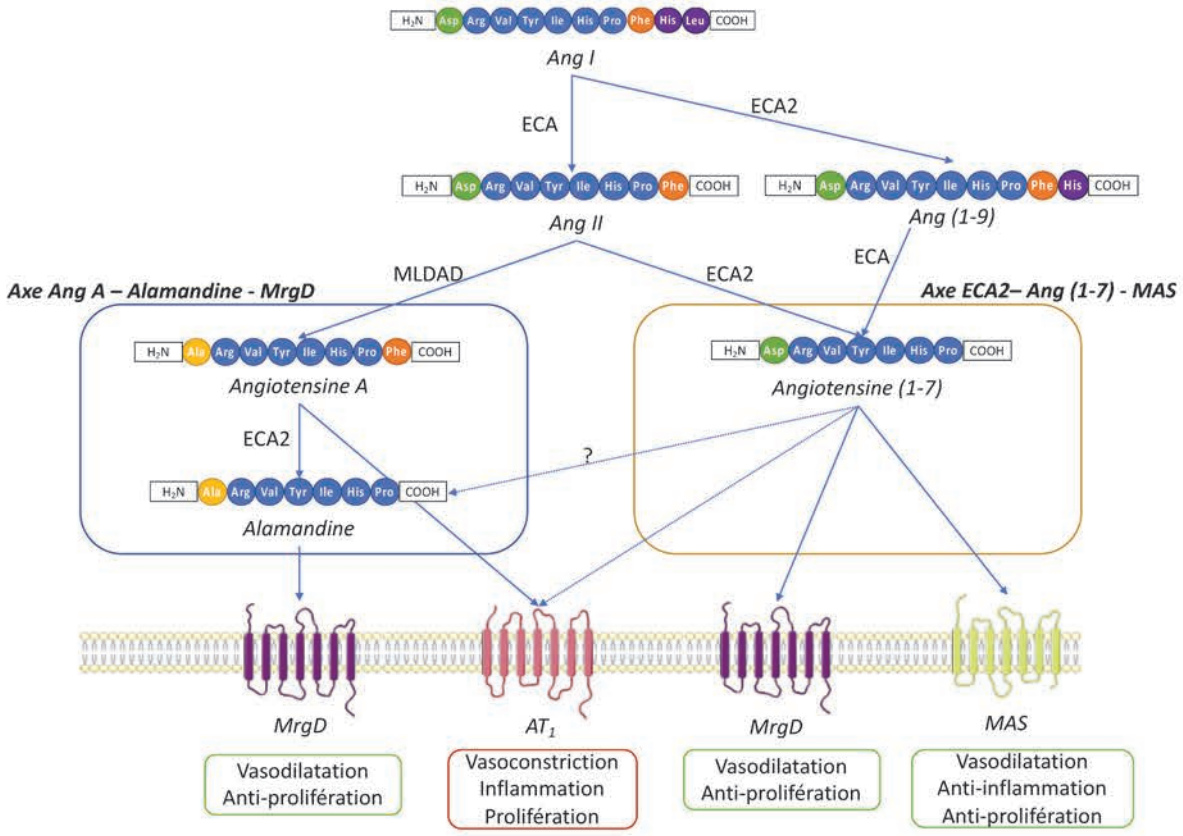


Figure 9 : Principaux rôles des nouveaux acteurs du système rénine angiotensine

(Ang : angiotensine ; AT_1 : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; ECA2 : enzyme de conversion 2 de l'angiotensine ; MAS : récepteur MAS ; MLDAD : mononuclear leukocyte-derived aspartate decarboxylase ; MrgD : Mas-related G protein-coupled receptor D)

- *L'axe angiotensine A – Alamandine – MrgD*

Les dernières avancées faites sur le SRA ont mis en lumière un nouvel axe, l'axe « angiotensine A – Alamandine – MrgD ».

L'angiotensine A (Ang A) est un métabolite de l'Ang II dont la séquence diffère d'un acide aminé, une alanine en position 1 au lieu d'une asparagine (Figure 9, p52). La transformation de l'Ang II en Ang A est catalysée par une aspartate décarboxylase dérivée des leucocytes mononucléaires (*mononuclear leukocyte-derived aspartate decarboxylase* ; MLDAD) (Jankowski *et al*. 2007). Tout comme l'Ang II, l'Ang A peut se lier aux récepteurs AT_1 et AT_2. Il fut initialement suggéré que l'Ang A avait une plus grande affinité pour AT_2 que l'Ang II (Jankowski *et al*. 2007), cependant d'autres études indiquent une affinité similaire des deux peptides pour AT_2 (Yang *et al*. 2011).

L'ensemble des données actuellement disponibles s'accorde sur un rôle vasoconstricteur de l'Ang A (Jankowski *et al*. 2007; Habiyakare *et al*. 2014), induisant une augmentation de la pression artérielle (Badejo Jr *et al*. 2009) , mais avec une efficacité moindre que l'Ang II (Yang *et al*. 2011). De plus, la concentration plasmatique d'Ang A augmente chez des patients en insuffisance rénale terminale (environ 28 pg/mL *vs* 7 pg/mL chez des patients sains) potentialisant ainsi son effet délétère (Jankowski *et al*. 2007).

Plus récemment, un nouveau peptide du SRA a été mis en évidence, l'alamandine. La génération d'alamandine peut se faire soit à partir d'Ang A (*via* l'action de l'ECA2) ou à partir d'Ang (1-7) par décarboxylation du résidu aspartate (Figure 9, p52) (Lautner *et al*. 2013). Les effets de l'alamandine s'opposent à ceux de l'Ang A. En effet, sur un modèle d'anneaux aortiques de souris, elle induit une vasodilatation similaire à celle de l'Ang (1-7). Cependant cette vasodilatation n'est pas abolie en présence d'un antagoniste du récepteur MAS, ni chez des souris déficientes pour le récepteur (Lautner *et al*. 2013) suggérant donc la liaison de l'alamandine à un autre récepteur.

Par son effet vasodilatateur, l'alamandine aboutit chez des rats hypertendus, à une diminution de la pression artérielle (Lautner *et al*. 2013), mais a aussi un effet sur le remodelage

cardiaque. En effet l'administration d'alamandine à des rats traités par isoprénaline est associée à une diminution de l'accumulation de collagène I, III et de fibronectine *(*Lautner *et al*. 2013).

Le dernier élément de cet axe est le récepteur D relié à MAS, couplé aux protéines G (*Mas-related G-Protein Coupled Receptor D* ; MrgD), mis en évidence de 2001 dans des neurones (Dong *et al*. 2001). Dans un modèle cellulaire transfecté avec ce récepteur, il fut montré que l'alamandine induisait une libération de NO, suggérant que son effet était médié par MrgD. Depuis ils ont été identifiés dans de nombreux tissus dont les artères, le cœur, les poumons, les muscles squelettiques ou encore la prostate (Etelvino *et al*. 2014). Outre l'alamandine, d'autres peptides peuvent se lier à MrgD : la β-alanine (Shinohara *et al*. 2004), l'acide β-aminoisobutyrique et le diéthylstilbestrol (Uno *et al*. 2012). Une étude récente rapporte par ailleurs que l'Ang (1-7) est aussi un ligand physiologique de MrgD (Tetzner *et al*. 2016).

En conclusion, bien que l'identification de la rénine remonte à plus 100 ans, le SRA fait toujours l'objet de nombreuses études. Les récentes avancées scientifiques nous ont permis d'affiner nos connaissances et notre compréhension de ce système complexe. La grande homologie de séquences des différentes angiotensines conduit à un double effet du SRA, à la fois délétère et protecteur.

Il est à noter que malgré l'émergence de ces nouveaux axes, les principaux effets du SRA restent médiés par l'Ang II et plus particulièrement par sa liaison aux récepteurs AT_1 et AT_2.

2) Les récepteurs AT_1 à l'angiotensine II

a. Généralités

En 1970, Lin et Goodfriend furent les premiers à suggérer que l'action de l'Ang II passait par une liaison à un récepteur (Lin et Goodfriend 1970). Le clonage en 1991 du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT_1) a permit d'obtenir plus d'informations sur sa structure (Murphy *et al*. 1991). AT_1 est retrouvé dans la majorité des tissus, avec une localisation préférentielle pour le cœur, le cerveau, les reins et les vaisseaux. Il fait partie de la grande famille des RCPG et plus particulièrement de la sous-famille des rhodopsines (Classe A). Chez l'homme le gène codant pour son expression est localisé sur la bande q22 du chromosome 3. Ce gène présente cinq exons séparés par quatre introns, cependant la partie codante pour AT_1 se situe exclusivement sur le cinquième exon (Curnow *et al*. 1992). AT_1 est composé de 359 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 41 kDa (Figure 11 p61). Dans ce manuscrit, les acides sont dénommés selon la nomenclature internationale (Cornish-Bowden 1985).

Chez les rats et les souris il existe deux isoformes d'AT_1 : AT_{1A} et AT_{1B} (Iwai et Inagami 1992). Ces deux isoformes présentent la même affinité pour l'Ang II et empruntent des voies de signalisation similaires, cependant elles diffèrent dans leurs localisations. Chez la souris adulte, AT_{1A} est retrouvé dans un grand nombre d'organes (rein, foie, glandes surrénales, ovaire, testicule, poumon, cœur, tissus adipeux) alors que l'expression d'AT_{1B} se limite à quelques tissus (cerveau, testicules, surrénales) (de Gasparo *et al*. 2000). Il est à noter que les rats et souris font figures d'exception car, tout comme l'Homme, les bovins (Sasaki *et al*. 1991), porcs (Itazaki *et al*. 1993), lapins (Burns *et al*. 1993) ou encore les chiens (Burns *et al*. 1994) ne présentent qu'une seule isoforme d'AT_1.

Chez le rat, l'homologie de séquence entre AT_{1A} et AT_{1B} est de 95% (variation de 17 acides aminés). Comparés au récepteur AT_1 humain, AT_{1A} et AT_{1B} varient de respectivement 19 et 21 acides aminés (Figure 10, p56). Dans ces séquences, certains acides aminés ont été identifiés comme jouant un rôle clé dans la fonction du récepteur, que nous allons voir ci-après.

```
                    10         20         30         40         50         60         70         80         90        100

AT1 (HUMAIN)  MILNSSTEDG IKRIQDDCPK AGRHNYIFVM IPTLYSIIFV VGIFGNSLVV  IVIYFYMKLK TVASVFLLNL ALADLCFLLT LPLWAVYTAM  EYRWPFGNYL
  AT1A (RAT)  -A----A--- ---------- ----S----- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- --------H-
  AT1B (RAT)  -T-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- --------H-

                   110        120        130        140        150        160        170        180        190        200
              CKIASASVSF NLYASVFLLT CLSIDRYLAI VHPMKSRLRR TMLVAKVTCI  IIWLLAGLAS LPAIIHRNVF FIENTNITVC AFHYESQNST LPIGLGLTKN
              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----M----- ---V-----Y ---------- ------R--- ----------
              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----M----- ---V-Y---Y ---------- ---------- ----------

                   210        220        230        240        250        260        270        280        290        300
              ILGFLFPFLI ILTSYTLIWK ALKKAYEIQK NKPRNDDIFK  IIMAIVLFFF FSWIPHQIFT FLDVLIQLGI IRDCRIADIV DTAMPITICI AYFNNCLNPL
              ---------- ---------- ---------- ---------R ---------- ---V------ ---------V -H--K-S--- ---------- ----------
              ----V----- ---------- ------K--- -T-------R ---------- ---V------ ---------- ----E----- ---------- ----------

                   310        320        330        340        350       359
              FYGFLGKKFK RYFLQLLKYI PPKAKSHSNL STKMSTLSYR PSDNVSSSTK KPAPCFEVE
              ---------- K--------- --------S- ---------- ----M---A- ---S-----
              ---------- K--------- --T----AG- ---------- ----M---A- -S-SF----
```

Figure 10 : Comparaison des séquences d'acides aminés des récepteurs AT_1 (humain) et AT_{1A}, AT_{1B} (rat)

(Les acides aminés identiques à la séquence humaine sont représentés par un tiret)

b. Structure et conformation

AT_1 possède plusieurs séquences de grande importance qui participent à son activité. Nous pouvons citer notamment les 3 sites de N-glycosylation (résidus 4, 176 et 188), essentiels pour le repliement du récepteur et son adressage à la membrane (Deslauriers *et al*. 1999 ; Lanctôt *et al*. 1999). Ainsi que les 4 résidus cystéines impliqués dans des ponts disulfures (Cys 18-Cys 274 et Cys 101-Cys180) et essentiels pour la liaison à l'Ang II (Ohyama *et al*. 1995). L'implication des acides aminés d'AT_1 dans ces différentes fonctions a fait l'objet de revues par Aplin (Aplin *et al*. 2009) et Balakumar (Balakumar et Jagadeesh 2014), et sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Implication de certains acides aminés dans la fonction d'AT_1 (D'après Balakumar et Jagadeesh 2014)

Acide aminé	Localisation	Fonction
Asp74	2ème DTM	Essentiel pour le signal G_q et la production d'IP_3 Interaction avec la Tyr292 du 7ème DTM qui pourrait stabiliser la conformation active Sa mutation maintient l'activation ERK1/2 Essentiel pour l'activation du récepteur
Phe77	2ème DTM	Activation du récepteur
Trp94-Gly97	1ère boucle extracellulaire	Activation du récepteur
Lys102	3ème DTM	Sa mutation entraine une perte de l'intégrité structurale du récepteur
Ser105-Val116	3ème DTM	Essentiels pour l'affinité du récepteur pour l'Ang II
Asn111	3ème DTM	Activation et affinité du récepteur
Ser115	3ème DTM	Essentiel pour l'activation et le couplage du récepteur
Asp125, Arg126, Tyr 127	3ème DTM	Participent à l'activation de la protéine G Mutation diminue la production d'IP_3 Mutation n'affecte pas la signalisation ERK1/2 et l'activation des kinases Src dépendantes des β-arrestines Internalisation suite à la stimulation par l'Ang II
Lys135, Ser136, Arg137, Arg139, Arg140	2ème boucle intracellulaire	Substitution altère le couplage à la protéine G Substitution n'altère pas l'internalisation
Arg167	4ème DTM	Lie la tyrosine 4 de l'Ang II
Lys199	5ème DTM	Lie la phénylalanine 8 de l'Ang II Mutation entraine une perte de l'affinité pour l'Ang II
Tyr215	5ème DTM	Essentiel pour le couplage à la protéine G Essentiel pour l'internalisation
Ala221, Leu 222	3ème boucle intracellulaire	Délétion altère le signal *via* la protéine G et la génération d'IP_3, l'activation de ERK et l'internalisation

Tableau 3 : suite

Acide aminé	Localisation	Fonction
Asp236, Asp237	3ème boucle intracellulaire	Mutation n'a pas d'impact sur la production d'IP_3, l'activation des MAPK et l'internalisation Nécessaire pour la conformation du récepteur Mutation affecte la phosphorylation de la PKC
Ile 238, Phe239	3ème boucle intracellulaire	Remplacement altère le couplage à la protéine G et l'internalisation
His256	6ème DTM	Participe à la transduction du signal Importance pour l'activation et l'affinité du récepteur
Leu265	3ème boucle extracellulaire	Mutation diminue la liaison du ligand et la production d'IP_3
Asp 263, Asp278, Asp281	3ème boucle extracellulaire	Essentiels pour la liaison de l'agoniste
Tyr292	7ème DTM	Essentiel pour le couplage à la protéine G Mutation altère la production d'IP_3
Phe293	7ème DTM	Activation du récepteur
Asn294	7ème DTM	Essentiel pour le couplage à la protéine G
Asn295	7ème DTM	Nécessaire pour l'orientation des hélices et l'activation du récepteur Pas nécessaire pour la production d'IP_3
Motif NPLFY (298-302)	7ème DTM	Essentiel pour le couplage à la protéine G et la production d'IP_3 Pas essentiel pour l'internalisation
Phe301	7ème DTM	Nécessaire pour la liaison de l'Ang II
Tyr292, Tyr302, Tyr312, Tyr319, Tyr339	7ème DTM et C-term	Mutation altère le couplage à la protéine G, la production d'IP_3 et l'activation des tyrosines kinases JAK2 et STAT1
Tyr312, Phe313, Leu314	C-term	Essentiel pour le couplage à la protéine et l'activation de G_Q
Ser331, Ser338, Ser348	C-term	Mutation réduit la phosphorylation de la PKC

Parmi tous les acides aminés présentés dans le tableau 3, AT_1 possède plusieurs séquences retrouvées classiquement chez les RCPG de classe A. D'une part, le motif DRY (Rovati *et al*. 2007), situé sur la partie C-terminale du 3ème domaine transmembranaire (DTM) (résidus 125-127), qui est impliqué dans le couplage et l'activation de la protéine G_q (Ohyama *et al*. 2002). D'autre part, le motif NPXXY localisé sur la partie C-terminale du 7ème DTM (résidus 298-302), qui est impliqué dans la médiation du signal d'AT_1 (Hunyady *et al*. 1995). Il a été montré que la mutation de la tyrosine de cette séquence entraine une diminution de la signalisation médiée par G_q mais pas de diminution de l'internalisation (Hunyady *et al*. 1995 ; Laporte *et al*. 1996). Ces études sont intéressantes car elles posent les bases d'un nouveau concept, le récepteur AT_1 serait capable de médier son signal selon deux voies : dépendante et indépendante de la protéine G.

Par la suite, de nombreuses études viendront étayer cette théorie. Nous pouvons citer notamment l'étude de Conchon, qui a montré chez le mutant Δ329 (délétion de 31 résidus) une diminution de l'internalisation et une augmentation de la signalisation médiée par G_q (Conchon *et al*. 1998). De plus, l'étude menée par Thomas a permis d'identifier un résidu critique pour l'activité d'AT_1, l'aspartate 74. La mutation en asparagine (D74N) entraine une diminution de l'action de la phospholipase C (PLC) sans modifier la cinétique d'internalisation du récepteur. Cependant la mutation de l'aspartate en tyrosine (D74Y) a un effet inverse, diminution de la cinétique d'internalisation mais une capacité d'activation de la PLC inchangée (Thomas *et al*. 2000).

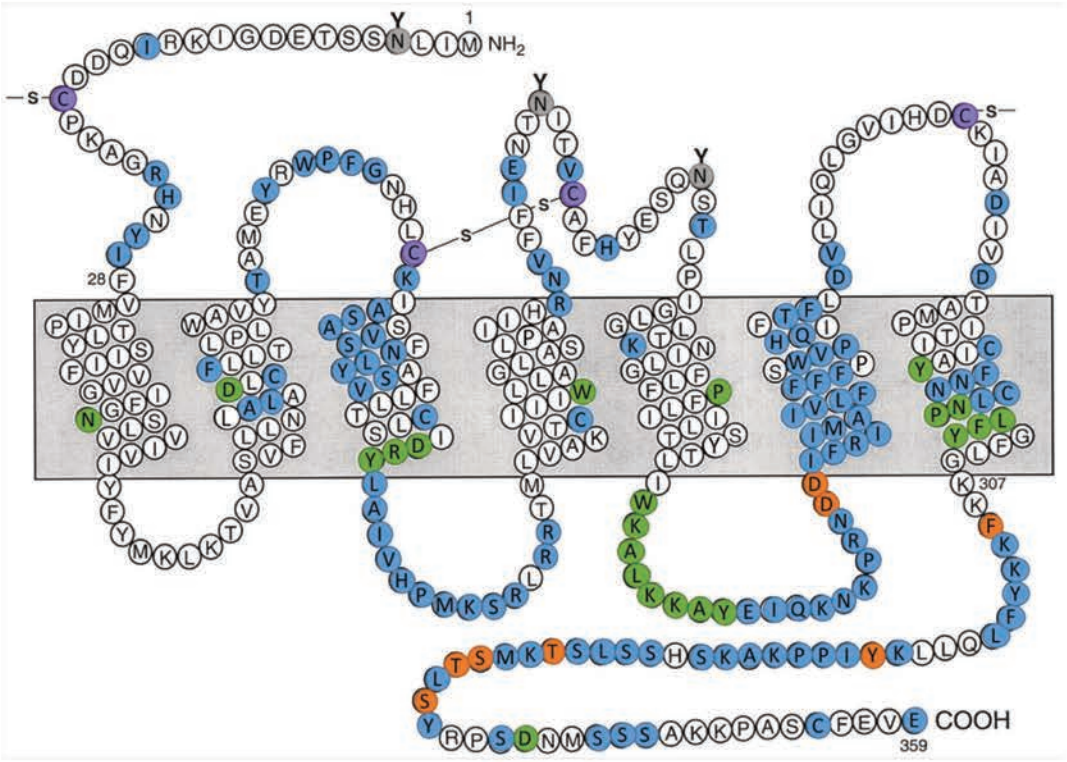


Figure 11 : Structure du récepteur AT_1 et implication des différents acides aminés

(Modifié d'après de Gasparo *et al.* 2000)

La capacité d'AT_1 d'activer la voie β-arrestine plutôt que la voie protéine G (et inversement, *cf* paragraphe Voies de signalisation p64) semble liée à son état conformationnel. Les études de Hunyady (Hunyady *et al*. 1994) et Thomas (Thomas *et al*. 2000) ont permis de montrer que le récepteur n'a pas qu'une seule conformation active mais plutôt différentes conformations qui lui permettent d'activer différentes voies. L'étude menée par Cabana a conforté ces travaux en mettant en évidence des conformations distinctes pour activer la voie protéine G dépendante ou β-arrestine dépendante (Cabana *et al*. 2015) (Figure 12).

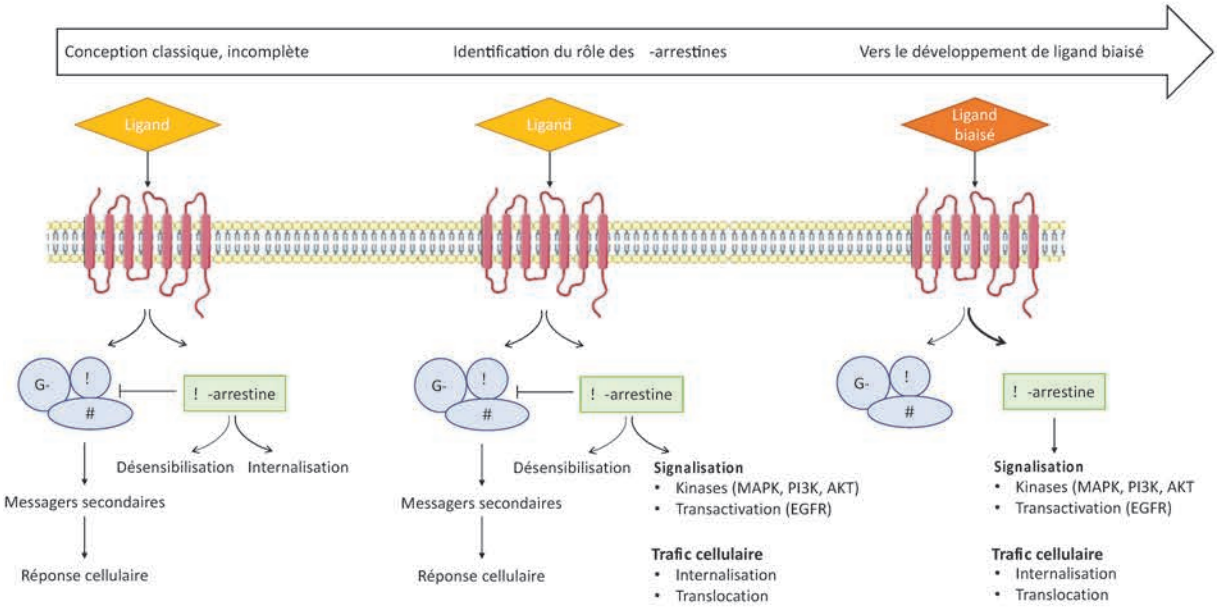


Figure 12 : Évolution de notre compréhension des signalisations protéines G et implication des β-arrestines

(D'après Rajagopal *et al*. 2010)

Le développement d'agonistes biaisés (capables d'activer spécifiquement une voie) représente donc un intérêt thérapeutique non négligeable (Rajagopal *et al*. 2010). Récemment l'essai clinique BLAST-AHF *(Biased Ligand of the Angiotensin Receptor Study in Acute Heart Failure*) s'est donné pour objectif de tester chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque aiguë un agoniste biaisé d'AT_1, le TRV027 (Felker *et al*. 2015). TRV027 inhibe la stimulation de la protéine G tout en stimulant les β-arrestines. Dans un modèle animal d'insuffisance cardiaque aiguë, TRV027 diminue la pression artérielle, les résistances vasculaires rénales, augmente le débit sanguin rénal et préserve le débit de filtration glomérulaire (Boerrigter *et al*. 2011, 2012).

Cependant, malgré ces résultats précliniques prometteurs, l'étude BLAST-AHF publiée l'année dernière indique qu'en phase IIb le TRV027 n'a pas amélioré le statut clinique des patients comparé au placebo (Pang *et al*. 2017).

Bien que ces résultats semblent décevants, ils illustrent que nos connaissances sur les mécanismes d'action des RCPG sont encore incomplètes et que d'autres études sont nécessaires pour élucider complètement l'agonisme biaisé des RCPG et d'AT_1.

Nous avons évoqué que AT_1 peut médier son signal à la fois par sa protéine G mais aussi par les β-arrestines. Nous allons maintenant décrire les voies de signalisations sous-jacentes impliquées.

c. *Voies de signalisation*

Actions dépendantes de l'angiotensine II médiées pas les protéines G

L'activité d'AT_1 passe principalement par son couplage à la protéine G_q, cependant il a été démontré qu'AT_1 pouvait aussi agir *via* les protéines $G_{i/o}$ (de Gasparo *et al*. 2000) et $G_{12\text{-}13}$ (Wirth *et al*. 2008). Le couplage d'AT_1 aux protéines $G_{i/o}$ entraine une diminution de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans certains tissus (de Gasparo *et al*. 2000). Des études ont montré que cette baisse est impliquée dans la synthèse d'angiotensinogène par le foie (Pobiner *et al*. 1991 ; Klett *et al*. 1993). Le couplage d'AT_1 à G_q entraine l'activation de la PLC β qui permet l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate en inositol trisphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG) (Alexander *et al*. 1985 ; Griendling *et al*. 1986) (Figure 13). La production d'IP_3 entraine une libération de calcium par le réticulum endoplasmique (Ferris *et al*. 1992), qui forme un complexe avec la calmoduline. Ce complexe phosphoryle les chaînes légères de la myosine entrainant la contraction des cellules musculaires lisses et la vasoconstriction. Par ailleurs, les canaux calciques permettent l'entrée massive de calcium du milieu extracellulaire dans le cytoplasme et permettent ainsi d'élever la concentration calcique intracellulaire. Cette élévation suite à l'activation de la PLC permet d'activer la phospholipase D (Freeman *et al*. 1995). Celle-ci hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique qui sera lui-même hydrolysé en DAG par les phosphohydrolases (Billah 1992). Le DAG, en présence de calcium, active la protéine kinase C (PKC). La PKC participe à la vasoconstriction en activant l'échangeur Na^+/H^+ qui entraine une alcalinisation du milieu intracellulaire. Ce changement de pH favorise les interactions entre l'actine et la myosine et donc la vasoconstriction (Aalkjaer et Peng 1997) (Figure 13 p65).

Outre cette voie classique, l'augmentation de calcium suite à la production d'IP_3 permet l'activation de la kinase Jak2 (Marrero *et al*. 1995 ; Guilluy *et al*. 2010). L'étude menée par Guilluy a permis de montrer que Jak2 phosphoryle un facteur d'échange de guanine de RhoA : Arhgef1 (*Rho guanine nucleotide exchange factor 1*) (Guilluy *et al*. 2010) (Figure 13). Arhgef permet d'activer RhoA, qui active à son tour les Rho kinases (ROCK). Les ROCK permettent la phosphorylation des sous unités ciblant les phosphatases de la myosine (MYPT, *myosin phosphatase target subunit*) (Kimura *et al*. 1996). La phosphorylation de MYPT permet

d'inhiber la déphosphorylation des chaînes légères de la myosine et donc *in fine* augmente la vasoconstriction (Kawano *et al*. 1999 ; Feng *et al*. 1999).

Par ailleurs, cette voie semble spécifique d'AT_1 car la vasoconstriction médiée par la phénylephrine ou un analogue du thromboxane A2 (tous deux couplés à $G_{q/11}$) n'est pas affectée en présence d'un inhibiteur de JAK2 (Guilluy *et al*. 2010). Des résultats similaires ont été retrouvés dans des cellules musculaires lisses d'artères coronaires humaines (Carbone *et al*. 2015). Enfin, le couplage d'AT_1 aux protéines $G_{12\text{-}13}$ permettrait également l'activation de cette voie RhoA/ROCK (Wirth *et al*. 2008) (Figure 13).

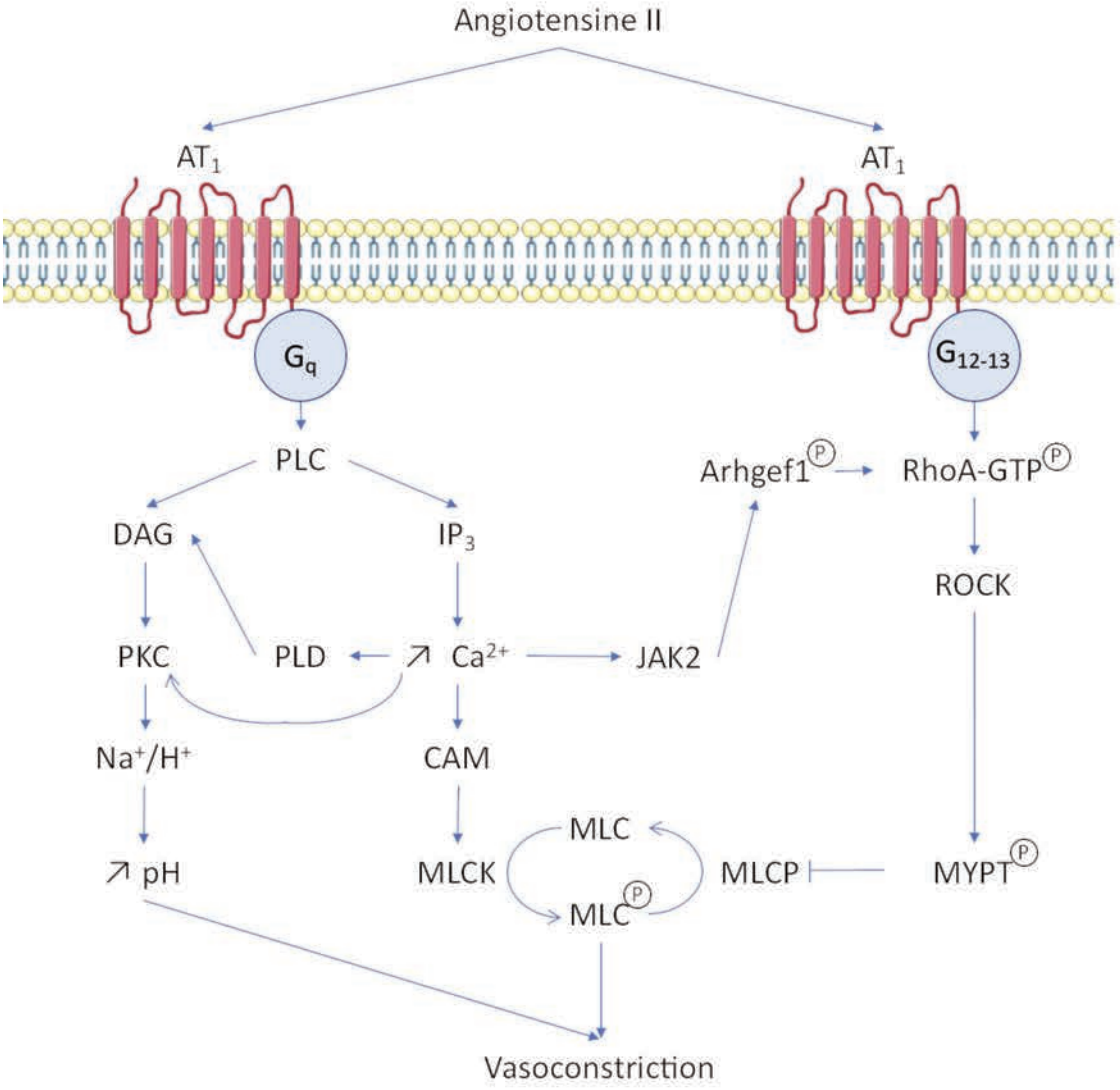


Figure 13 : Voies de signalisations impliquées dans la vasoconstriction médiée par AT_1

(AT_1 : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; Arhgef 1 : Rho guanine nucleotide exchange factor 1 ; CAM : calmoduline ; DAG : diacylglycérol ; GTP : guanosine triphosphate ; IP_3 : inositol triphosphate ; JAK2 : janus kinase 2 ; MLC : chaînes légères de la myosine ; MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine : MLCP : phosphatase des chaînes légères de la myosine ; MYPT : myosin phosphatase target subunit ; PKC : protéine kinase C ; PLC : phospholipase C ; PLD : phospholipase D ; RhoA : Ras homolog gene family member A ;ROCK : Rho kinase)

Outre la vasoconstriction, AT_1 est capable d'activer des voies de signalisation aboutissant à l'activation des MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*) responsables, entre autres, de la synthèse et du métabolisme des protéines, de l'expression génique ou encore de la croissance cellulaire (Mehta et Griendling 2007). AT_1 active notamment les ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*), les JNKs (*c-Jun NH_2-terminal protein kinases*) ou la p38MAPK (Sugden et Clerk 1997 ; Taniyama *et al*. 2004). L'activation de ERK se fait par une cascade de réaction et influe sur la différenciation, la migration ou encore l'adhésion cellulaire (Touyz 2004). Les kinases JNK et p38MAPK ont un rôle sur la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation mais aussi sur l'inflammation médiée par l'Ang II (Force *et al*. 1996 ; Kudoh *et al*. 1997) (Figure 14, p67).

De plus, l'Ang II *via* AT_1 peut activer la NAD(P)H oxydase, responsable de la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Cette activation implique différents médiateurs dont les Src, l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*), les PI3 kinases mais aussi la PLD, PKC et la p47phox (Seshiah *et al*. 2002 ; Touyz *et al*. 2005). La production d'EROs comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 contribue aux effets délétères de l'Ang II, notamment l'hypertrophie vasculaire (Ushio-Fukai *et al*. 1996 ; Zafari *et al*. 1998), l'hypertension (Rajagopalan *et al*. 1996), ou encore la stimulation de facteurs de transcriptions comme NF-κB, PAR-1 ou Nrf2 connus pour leur implication dans l'athérosclérose (Mehta et Griendling 2007). De plus, il a été montré que la génération d'EROs induisait une inactivation du NO (Gryglewski *et al*. 1986 ; Rubanyi et Vanhoutte 1986) ainsi qu'une inflammation vasculaire (Marui *et al*. 1993).

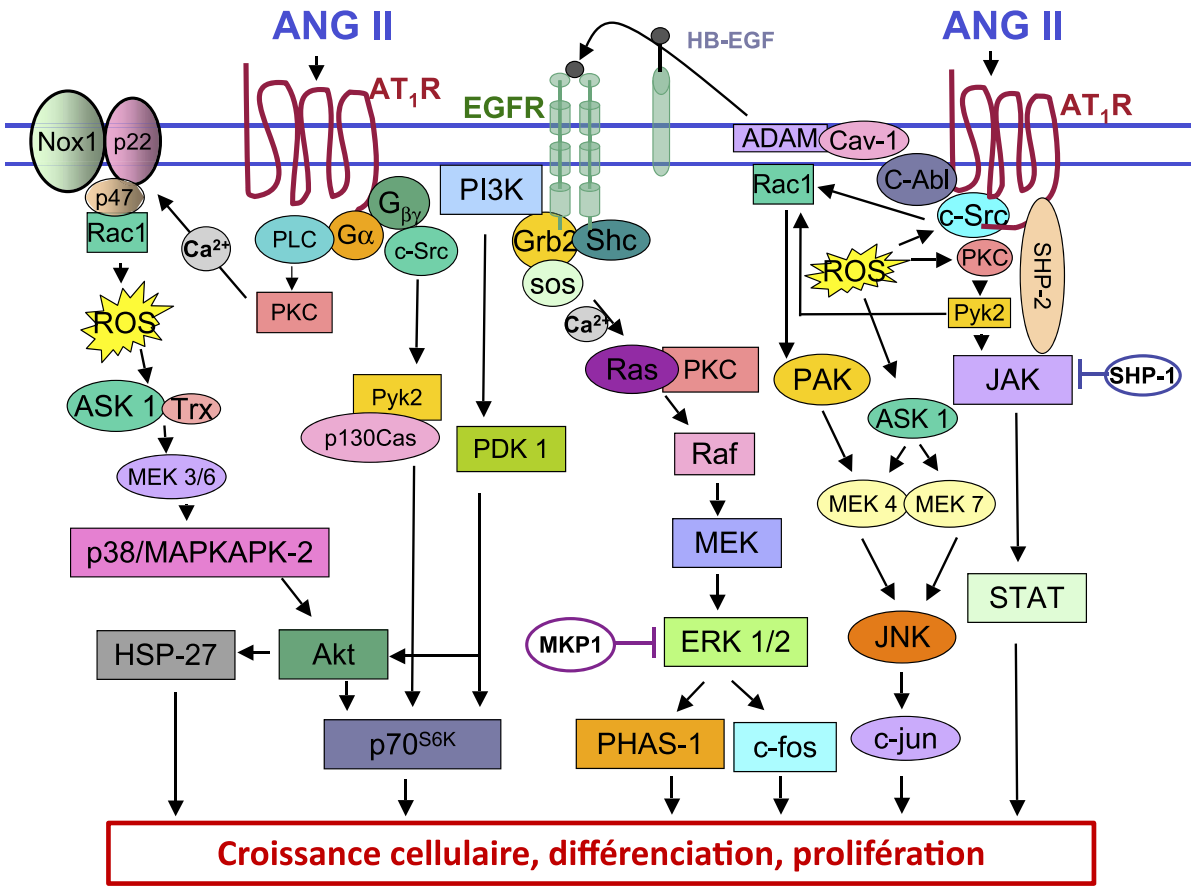


Figure 14 : Régulation de la croissance cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose par les récepteurs AT_1

(Modifié d'après Mehta et Griendling 2007)

(ADAM : A desintegrin and metalloprotease ; AKT : protéine kinase B ; Ang II : angiotensine II ; ASK1 : apoptosis signal-regulating kinase 1 ; AT1 : récepteur AT_1 de l'angiotensine II ; Cav-1 : caveoline-1 ; c-Src : sarcoma non-receptor tyrosine kinase ; EGFR : epidermal growth factor receptor ; ERK ½ : extracellular regulated kinases ; G ($\alpha\beta\gamma$) : sous unite α, β et γ de la protéine G ; Grb2 : growth factor receptor bound protein 2 ; HB-EGF : heparin-binding epidermal growth factor ; HSP-27 : heat-shock protein ; Jak :janus kinase ; JNK : c-jun NH_2-terminal kinase ; MEK (4,7,3/6) : mitogen activated protein kinase ; MKP1 : phosphatase des MAP kinase-1 ; NOX 1 : sous unité NOX1 de la NAD(P)H oxydase ; PDK1 : 3-phosphoinositide-dependent kinase ;Phas-1 : Protéine Phas-1 ; PI3K :phosphotidylinositiol 3-kinase ; PLC : phospholipase C ; PKC : protéine kinase C ; Pyk2 : protein-tyrosine kinase 2-beta ; Rac1 :ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 ; Raf : kinase Raf ; Ras :ras protein ; ROS :espèces reactive de l'oxygène ; Shc : protéine Shc ; SHP (1,2) : src homology 2 domain tyrosine phosphatases ; SOS : ras-guanine echange factor SOS ; Stat : signal transducers and Activators of Transcription ; Trx : thioredoxine)

Actions dépendantes de l'angiotensine II médiées pas les β-arrestines

Nous avons évoqué précédemment qu'AT_1 peut médier son signal indépendamment de la protéine G en passant par les β-arrestines. Il existe 4 isoformes d'arrestines, les arrestines 1 et 4 sont uniquement retrouvées au niveau de la rétine alors que les arrestine 2 et 3 (aussi appelées β-arrestines 1 et β-arrestine 2) sont exprimées dans tous les tissus (Rajagopal *et al*. 2010). Les β-arrestines 1 et 2 ont une homologie de séquence de 80%, les différences se retrouvant majoritairement au niveau C-terminal. Initialement, il a été montré que les β-arrestines étaient impliquées dans la désensibilisation des RCPG (Benovic *et al*. 1987 ; Lohse *et al*. 1990) et le recrutement d'enzymes permettant la dégradation des seconds messagers (Perry *et al*. 2002). Par la suite d'autres rôles des β-arrestines ont été mis en évidence, notamment leur implication dans l'internalisation (Ferguson *et al*. 1996) *via* une interaction avec les clathrines (Goodman Jr *et al*. 1996), dans la translocation des récepteurs (Kovacs *et al*. 2008) ou encore l'exocytose de molécules (Barlic *et al*. 2000; Imamura *et al*. 2001).

Enfin, plus récemment, les β-arrestines ont été identifiées comme des acteurs à part entière dans la signalisation des RCPG, permettant notamment de réguler certaines kinases. L'activation de la voie β-arrestine d'AT_1 permet notamment la régulations des PKB (*protein kinase B* ou AKT) (Kendall *et al*. 2014) ou encore des ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Luttrell *et al*. 2001). Ces kinases semblent impliquées dans la croissance et la migration cellulaire ainsi que dans le remodelage vasculaire (Berk et Corson 1997 ; Taniyama *et al*. 2004).

L'ensemble des voies de signalisation activées par la fixation d'Ang II sur AT_1 a fait l'objet de revues exhaustives par Touyz et Schiffrin, Mehta et Griendling, et Costa-Neto (Touyz et Schiffrin 2000 ; Mehta et Griendling 2007 ; Costa-Neto *et al*. 2014).

Actions indépendantes de l'angiotensine II

Bien que la majorité des effets médiés par AT_1 soit due à la fixation d'Ang II sur le récepteur, il a été montré que ce dernier pouvait être activé par un stress mécanique. L'implication de l'angiotensinogène et de l'Ang II ayant été exclue dans cette étude, AT_1 a pu être décrit comme mécanosenseur (*i.e.* molécule pouvant être activée par un stimulus mécanique) (Zou *et al.* 2004). L'hypothèse émise par les auteurs était que le stress mécanique induisait un changement conformationnel, permettant au récepteur de passer dans un état actif et ainsi activer sa protéine G et la voie Jak2 (Zou *et al.* 2004). En 2008, cette hypothèse sera confirmée par les travaux de Yasuda. En effet, un stress mécanique induit une rotation et un réarrangement du 7ème DTM permettant au récepteur de passer en conformation active (Yasuda *et al.* 2008) (Figure 15). Par ailleurs, les études de Zou et Yasuda montrent que l'exposition à un antagoniste des récepteurs AT_1 (candesartan) inhibe cette activation mécanique. Ces résultats mettent en lumière le mécanisme d'action du candésartan, qui agit comme agoniste inverse (*i.e.* agoniste stabilisant le récepteur dans sa conformation inactive, inhibant ainsi le signal médié par le récepteur dans sa conformation active) (Zou *et al.* 2004 ; Yasuda *et al.* 2008).

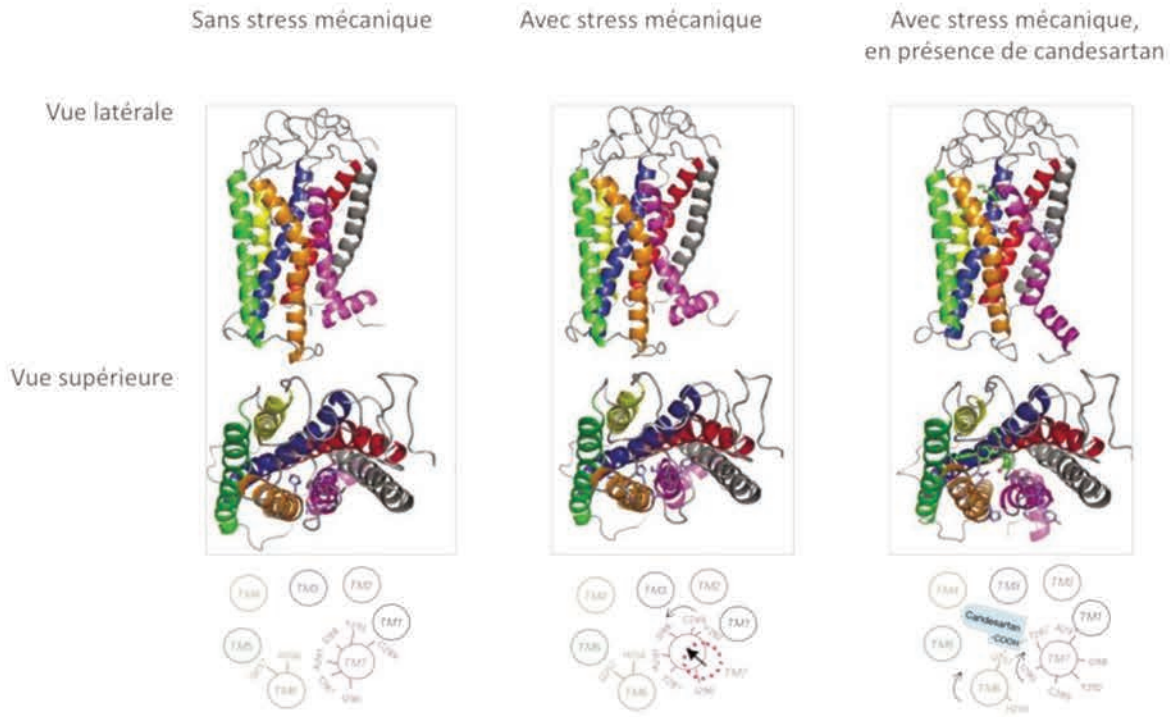


Figure 15 : Changements conformationnels du récepteur AT_1 suite à une activation par un stress mécanique (Modifié d'après Yasuda *et al.* 2008)

Pour évaluer l'importance de cette activation mécanique d'AT_1, la vasoconstriction d'artères cérébrales de rats a été étudiée en présence de losartan (autre agoniste inverse d'AT_1). La perfusion de losartan diminue la vasoconstriction induite par la pression (Mederos y Schnitzler *et al*. 2008). Ces résultats suggèrent que cette voie AngII-indépendante d'AT_1 joue un rôle prépondérant dans la vasoconstriction des CML et dans le tonus myogénique (TM) (la notion de tonus myogénique sera vue par la suite, *cf* paragraphe Circulation cérébrale : généralités, p79). Par la suite, de nombreuses études se sont intéressées à l'implication d'AT_1 et d'autres RCPG couplés à $G_{q/11}$ dans le TM. Nous pouvons notamment citer l'étude de Rakesh ayant montré que l'activation mécanique d'AT_1 entrainait une médiation du signal par la voie β-arrestine (Rakesh *et al*. 2010). Les études de Blodow et Schleifenbaum ayant évalué l'implication d'AT_{1A} et AT_{1B} dans le TM (Blodow *et al*. 2014; Schleifenbaum *et al*. 2014), ou encore l'étude de Hong, ayant reproduit des résultats similaires au niveau d'artérioles de muscles crémasters (Hong *et al*. 2016).

En conclusion, le récepteur AT_1 est capable d'activer de nombreuses voies de signalisation. Les dernières avancées montrent qu'il est capable d'agir *via* sa protéine G et/ou *via* les β-arrestines. De plus, il n'est pas uniquement activé par l'Ang II. En effet le stress mécanique est responsable d'une partie de l'activité d'AT_1, très importante dans le maintien du TM des artères.

3) Les récepteurs AT_2 à l'angiotensine II

a. Généralités

Les récepteurs AT_2 furent identifiés pour la première fois en 1989 (Whitebread *et al*. 1989 ; Chiu *et al*. 1989) et clonés en 1993 (Kambayashi *et al*. 1993 ; Mukoyama *et al*. 1993). L'étude des rôles et fonctions d'AT_2 s'est avérée bien plus complexe que pour AT_1, si bien qu'il a d'abord était supposé qu'AT_2 n'était pas un RCPG (Bottari *et al*. 1991). Ce seront les études menées par Kambayashi et Nakajima qui permettront de révéler une structure composée de sept DTM, typique des RCPG (Kambayashi *et al*. 1993; Nakajima *et al*. 1993).

AT_2 est principalement exprimé au stade fœtal (Grady *et al*. 1991), cependant son expression décroit rapidement après la naissance. Il devient même parfois indétectable, notamment dans la peau (de Gasparo *et al*. 2000). Son expression se cantonne alors à certains tissus comme le cerveau, les reins, le cœur, les ovaires ou encore les vaisseaux (Kaschina et Unger 2003). Chez l'homme, le gène codant pour AT_2 se trouve sur la bande q22-q2 du chromosome X (Koike *et al*. 1994). L'ADN génomique est composé de 3 exons, la région codante étant confinée dans le troisième exon. Dans d'autres espèces, dont le rat et la souris, le gène codant pour AT_2 a aussi été retrouvé sur le chromosome X (Tissir *et al*. 1995; Hein *et al*. 1995).

Les séquences humaines et murines du récepteur AT_2 sont proches. L'homologie de séquences entre le rat et la souris est de 99% et de 72% entre le rat et l'homme, les différences se situant essentiellement sur la partie N-terminale (de Gasparo *et al*. 2000). La différence est cependant beaucoup plus grande entre les séquences d'AT_1 et d'AT_2 avec une homologie de séquence de seulement 34% (Mukoyama *et al*. 1993 ; Ichiki *et al*. 1994).

b. Structure et conformation

Le récepteur AT_2 est composé de 363 acides aminés, pour un poids moléculaire d'environ 41 kDa (Figure 16). Il possède 5 résidus asparagine situés sur l'extrémité N-terminale pouvant permettre sa N-glycosylation. Il a été démontré que la variabilité du poids moléculaire des récepteurs AT_2 serait due à différents degrés de N-glycosylation (Servant *et al.* 1994). Cependant, contrairement à AT_1, ces sites ne semblent pas essentiels pour l'adressage à la membrane du récepteur AT_2 ou sa liaison avec le ligand (Servant *et al.* 1996).

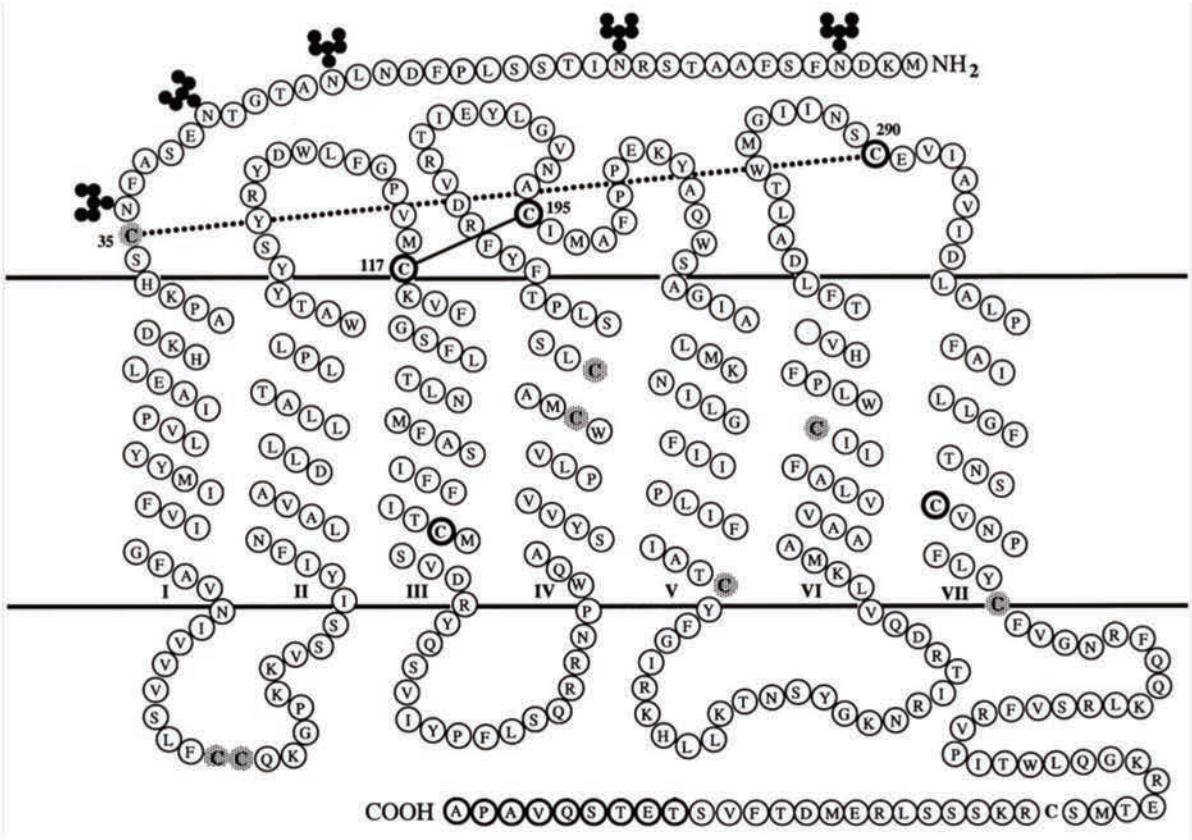


Figure 16 : Structure du récepteur AT_2

(Modifié d'après Feng *et al.* 2000)

Par ailleurs, 4 résidus cystéines localisés sur la partie extracellulaire sont impliqués dans la formation de pont disulfure. La cystéine 35 localisée sur la partie N-terminale se lie avec la cystéine 290 située sur le 3ème domaine extracellulaire. La cystéine 117 se lie à la cystéine 195 localisées respectivement sur la 1ère et 2ème boucle extracellulaire (Heerding *et al.* 2001). Il fut montré pour AT_1 que la réduction de ces ponts disulfure par du dithiothréitol (DTT) diminue fortement sa liaison avec l'Ang II (Ohyama *et al.* 1995). Contrairement à AT_1, l'exposition d'AT_2

à du DTT augmente légèrement sa liaison avec l'Ang II, suggérant que ces pont disulfures ne sont pas primordiaux pour la liaison à l'Ang II (Heerding *et al*. 2001).

À l'heure actuelle peu d'études de mutagénèse dirigée ont été réalisées pour déterminer l'implication des différents résidus d'AT_2 dans la médiation de son signal. Quelques travaux ont cependant permis d'identifier des acides aminés participant à l'activité d'AT_2. Nous pouvons citer notamment les travaux de Yee, ayant montré que la mutation de la lysine 215 diminue la liaison de l'Ang II (Yee *et al*. 1997). Cet acide aminé est commun aux deux récepteurs de l'Ang II, de plus il participe à la liaison de l'Ang II sur AT_1 (Yamano *et al*. 1992, 1995). Ces résultats suggèrent donc que malgré leur faible homologie, les deux récepteurs pourraient partager des résidus communs essentiels à la liaison de l'Ang II. D'autres études viendront confirmer cette hypothèse en identifiant notamment l'aspartate 279 (Heerding *et al*. 1998), l'histidine 273 (Turner *et al*. 1999) et l'asparagine 182 (Heerding *et al*. 1997) comme participant à la liaison du ligand. Ces acides aminés correspondent respectivement à l'aspartate 263, l'histidine 256 et l'asparagine 167 d'AT_1 (*cf* Tableau 3 p58).

Bien qu'AT_2 possède 7 DTM, il n'est cependant pas un RCPG classique. En effet, l'activation d'AT_2 ne fait pas varier les concentrations de calcium intracellulaire (caractéristique d'un couplage à G_q) ou d'AMP cyclique (caractéristique d'un couplage à G_s ou G_i) (Bottari *et al*. 1991 ; Dudley *et al*. 1991 ; Kambayashi *et al*. 1993 ; Mukoyama *et al*. 1993). La liaison du ligand n'entraine pas une internalisation du récepteur (Dudley *et al*. 1991 ; Csikós *et al*. 1998). Enfin, contrairement aux autres RCPG, les analogues du GTP ne diminuent pas la liaison du ligand à AT_2 (Bottari *et al*. 1991). L'étude menée par Zhang et Pratt a montré sur des fœtus qu'AT_2 pourrait se lier aux protéines $G_{i\alpha 2}$ et $G_{i\alpha}$. Cependant cette liaison est insensible aux analogues du GTP, les auteurs suggèrent donc que le couplage à la protéine G pourrait se faire par mécanisme non conventionnel (Zhang et Pratt 1996). La troisième boucle intracellulaire du récepteur semblerait impliquée dans le couplage à la protéine G (Hayashida *et al*. 1996). Cependant cela n'a pas été confirmé par d'autres travaux.

Bien que la liaison d'AT_2 aux protéines G soit encore controversée, il est capable d'activer différentes voies de signalisation que nous allons maintenant décrire.

c. *Voies de signalisation*

L'activation d'AT_2 stimule la eNOS qui induit une production de NO. Le NO active à son tour la voie GCs/GMPc que nous avons décrite précédemment (*cf* paragraphe Nitrosylation p18). La conséquence de cette activation est un relâchement des CML et donc une vasodilatation (Figure 17). L'étude de Siragy et Carey a montré, au niveau rénal, que la stimulation des récepteurs AT_2 (par l'Ang II en présence de losartan) entraine une augmentation de la production de GMPc (Siragy et Carey 1996). Par la suite, ils montreront que cette production de GMPc est en fait due à une libération de NO car cet effet est bloqué par un inhibiteur de la eNOS (Siragy et Carey 1997). Des résultats similaires ont été obtenus au niveau aortique (Gohlke *et al*. 1998), cardiaque (Liu *et al*. 1997) et sur des cellules endothéliales bovines (Wiemer *et al*. 1993). En plus de cette découverte, les travaux de Siragy suggèrent que l'activité d'AT_2 passe par une stimulation de la production de bradykinine (Siragy *et a*l. 1996).

Les travaux de Tsutsumi viendront confirmer cette hypothèse. En effet, leur étude montre qu'AT_2 entraine une inhibition de l'activité des échangeurs Na^+/H^+ ayant pour conséquence une acidification du milieu cellulaire. Cette acidification augmente l'activité de kininogénases et aboutit à la libération de bradykinine (Tsutsumi *et al*. 1999). Ces résultats ont été par la suite reproduits dans d'autres études (Sosa-Canache *et al*. 2000 ; Abadir *et al*. 2003 ; Hannan *et al*. 2003). La stimulation AT_2-dépendante des récepteurs B_2 de la bradykinine semble entrainer une activation de la protéine kinase A (PKA), responsable de la phosphorylation de la eNOS (Yayama *et al*. 2006) (Figure 17). Par ailleurs, l'étude d'Abadir a permis de montrer que les récepteurs AT_2 et B_2 étaient capables de former des hétérodimères et que cela augmentait la production de GMPc et de NO (Abadir *et al*. 2006). En effet, cette étude a montré une proximité moléculaire des deux récepteurs. La troisième boucle extracellulaire d'AT_2 se trouvant à une distance d'environ 50 angström de la deuxième boucle extracellulaire du récepteur B2 (Abadir *et al*. 2006). Cette proximité est d'ailleurs retrouvée en l'absence de stimulation par l'Ang II, suggérant donc une formation constitutive d'hétérodimères.

Nous avons vu précédemment que la vasoconstriction médiée par AT_1 passait, entre autre, par la voie RhoA/ROCK (*cf* paragraphe Voies de signalisation p64). Les études menées par Savoia ont montré qu'AT_2 diminue l'activation de la voie RhoA/ROCK et la phosphorylation

des chaînes légères de la myosine (Savoia *et al*. 2005). Cela semble associé à une augmentation de l'expression de la PKGI qui inactive RhoA en la phosphorylant (Savoia *et al*. 2006) (Figure 17).

Outre ces voies, AT_2 est capable d'induire une vasodilatation par des voies indépendantes du NO. En effet la fixation d'Ang II sur AT_2 permet notamment l'activation de la phospholipase A_2 (PLA2) et entraine une libération d'acide arachidonique (Jacobs et Douglas 1996 ; Dulin *et al*. 1998). L'acide arachidonique serait dégradé par les cytochromes P450 en acides époxy-eicosatrienoiques qui, en stimulant les canaux potassiques à large conductances activés par le calcium (BK_{Ca}), permettrait la vasodilatation (Arima *et al*. 1997; Stockand *et al*. 1998; Dimitropoulou *et al*. 2001) (Figure 17).

Par ailleurs, AT_2 serait capable d'induire une hyperpolarisation des CML induisant une vasodilatation. L'étude de Dimitropoulou a montré que la vasodilatation AT_2-dépendante est médiée par des canaux potassiques BK_{Ca} (Figure 17). L'inhibition de ces canaux, responsables d'une hyperpolarisation, au niveau des microvaisseaux mésentériques prévient la vasodilatation (Dimitropoulou *et al*. 2001). L'implication de ces canaux a été montré dans d'autres lits vasculaires, notamment les artérioles (*Vincent *et al*. 2005) et artères cérébrales (Wackenfors *et al*. 2006).

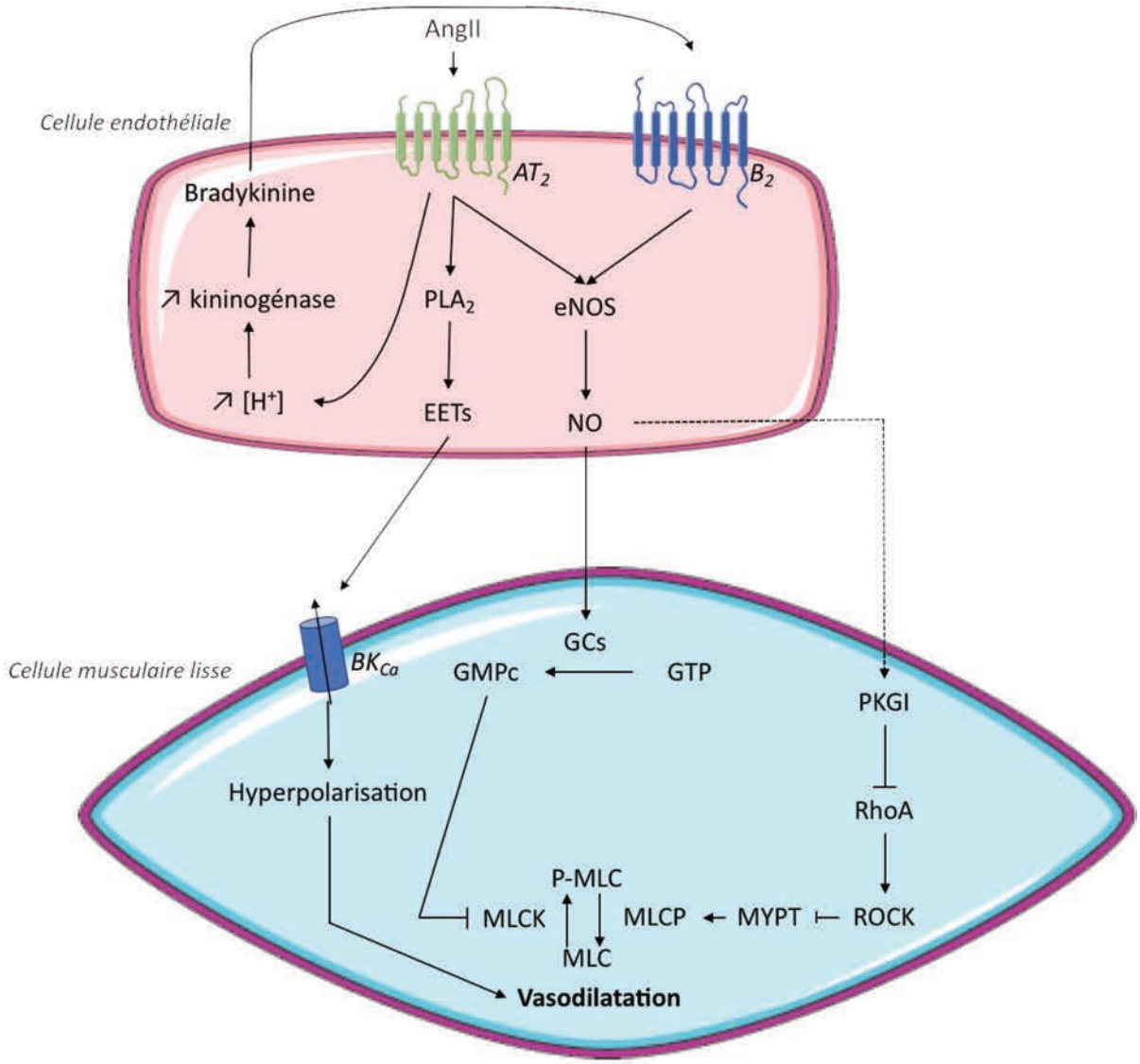


Figure 17 : Voies de signalisations impliquées dans la vasodilatation médiée par AT_2

(Ang II : angiotensine II AT_2 : récepteur de type 2 de l'angiotensine II ; B_2 : récepteur B_2 de la bradykinine ; BK_{Ca} : canaux potassiques à large conductance activés par le calcium ; eNOS : NO synthase endothéliale ; EETs : acides époxy-eicosatrienoiques ; GCs ; guanylate cyclase solube ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; GTP : guanosine triphosphate ; MLC : chaînes légères de la myosine ; MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine : MLCP : phosphatase des chaines légères de la myosine ; MYPT : sous unité régulatrice de la phosphatase des chaînes légères de la myosine ; NO : monoxyde d'azote ; PKGI : protéine kinase G I ; PLA_2 : phospholipase A_2 ; RhoA : Ras homolog gene family member A ; ROCK :Rho-associated protein kinase)

En plus de la vasodilatation, AT_2 a aussi une action antiproliférative et pro-apoptotique. AT_2 active trois phosphatases, PP2A (*protein phosphatase 2A*), MKP-1 (*Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1*) et SHP-1 (*SH2 domain-containing phosphatase 1*) responsables de la déphosphorylation de ERK 1 et ERK 2 (Huang *et al*. 1995 ; Bedecs *et al*. 1997 ; Horiuchi *et al*. 1997). L'inactivation de ces deux kinases inhibe leurs effets pro-prolifératif et anti-apoptotique (Horiuchi *et al*. 1998). Enfin, AT_2 exerce aussi un rôle anti-inflammatoire en inhibant l'activité de la NAD(P)H oxydase, responsable de la production d'EROs (Iwai *et al*. 2005).

Les différentes voies de signalisation activées par AT_2 s'opposent donc à celles activées par AT_1 (Figure 18). Bien que les antagonistes des récepteurs AT_1 soient largement utilisés en préclinique et en clinique, pendant longtemps peu d'agonistes spécifiques d'AT_2 étaient disponibles et leur utilisation se faisait uniquement en recherche.

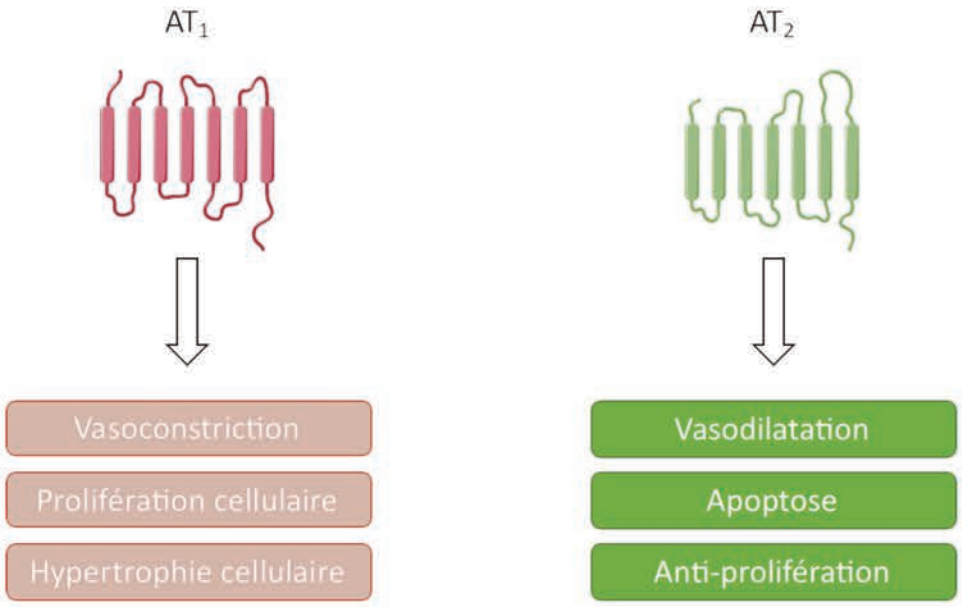


Figure 18 : Actions opposées médiées par les récepteurs AT_1 et AT_2

(AT_1 : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; AT_2 : récepteur de type 2 de l'angiotensine II)

En 2004, l'équipe de Wan développa le premier agoniste non-peptique d'AT_2, le C21 (*compound 21*) (Wan *et al*. 2004). Depuis, le C21 a largement été utilisé en préclinique, notamment dans des modèles d'AVC où il améliore la survie et le score neurologique (Joseph *et al*. 2014; Mateos *et al*. 2016; Bennion *et al*. 2017). Le C21 a aussi été utilisé au niveau vasculaire (Verdonk *et al*. 2012; Gao *et al*. 2014; Verbrugghe *et al*. 2018), rénal (Castoldi *et al*. 2014 ; Matavelli *et al*. 2015 ; Pandey et Gaikwad 2017) ou encore pulmonaire (Bruce *et al*. 2012, 2015). Les travaux de Bruce ont montré, dans un modèle de rats présentant une hypertension pulmonaire, que le C21 prévient la fibrose pulmonaire (Bruce *et al*. 2015). Ces résultats ont été confirmés très récemment par l'étude de Rathinasabapathy (Rathinasabapathy *et al*. 2018).

Actuellement, le C21 est testé en clinique pour le traitement des fibroses pulmonaires idiopathiques. Les résultats de la phase I publiés il y a quelques mois montrent une innocuité du C21 chez des patients sains (Steckelings *et al*. 2017). La demande de poursuite en phase IIa a été faite en décembre 2017.

En conclusion, les voies de signalisation activées par le récepteur AT_2 s'opposent à celles activées par AT_1. Il est un RCPG atypique, ne se couplant pas de manière classique aux protéines G. D'autres études sont nécessaires pour mieux le caractériser et confirmer son rôle au niveau cardiovasculaire.

4) *S*-nitrosation des récepteurs à l'angiotensine II et intérêt au niveau cérébrovasculaire

a. Circulation cérébrale : généralités

Le cerveau n'est pas capable de stocker de l'oxygène et ses réserves en glycogène sont faibles. La circulation cérébrale est donc primordiale pour maintenir un bon fonctionnement de cet organe. Cette circulation est dite tétrapodique. Deux paires d'artères assurent la bonne irrigation du cerveau, les artères carotides internes droite et gauche et les artères vertébrales droite et gauche. Les deux artères vertébrales s'anastomosent pour former l'artère basilaire, qui va elle-même s'anastomoser avec les artères carotides internes, *via* les artères communicantes postérieures, pour former le polygone de Willis (Figure 19). Ce polygone donne naissance à trois paires d'artères : les artères cérébrales antérieures, moyennes et postérieures (Sokoloff 1997 ; Edvinsson et Mackenzie 2002). Cela permet en cas d'occlusion d'une des artères principales d'apport de redistribuer le débit des trois autres artères dans le polygone de Willis. Cette particularité anatomique est particulièrement importante car elle permet une répartition homogène du sang sur l'ensemble du territoire cérébrale.

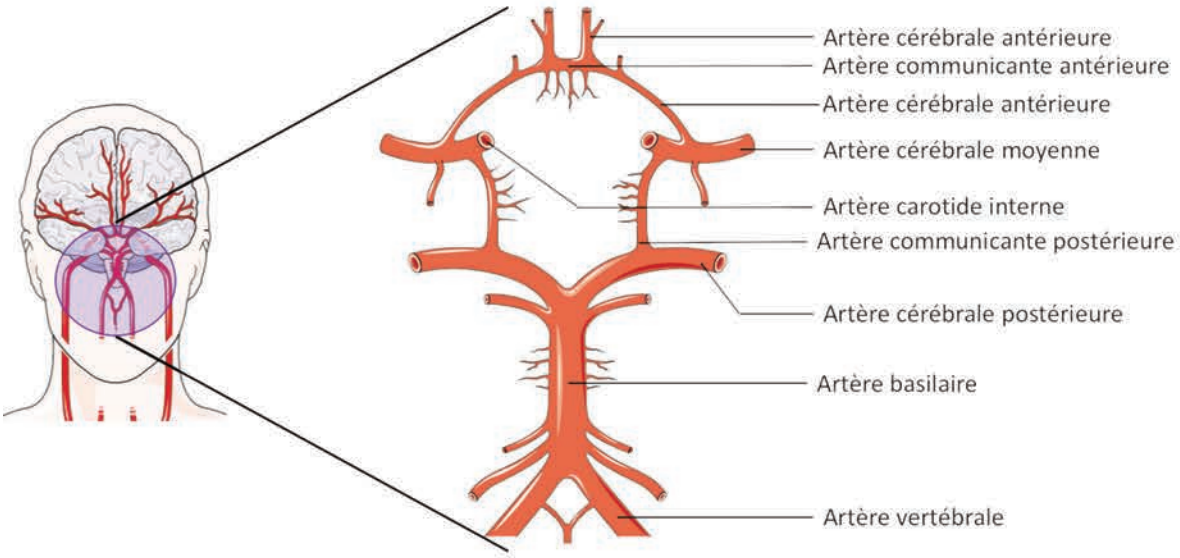


Figure 19 : Représentation schématique du polygone de Willis et de sa localisation

Les trois paires d'artères permettent d'irriguer des régions distinctes du cerveau. Les artères cérébrales antérieures permettent d'irriguer les pôles frontaux et les parties médianes des lobes frontaux et pariétaux. Les artères cérébrales postérieures assurent l'irrigation des parties inférieures et médianes des lobes temporaux et occipitaux. Enfin les artères cérébrales moyennes (ACM), jouent un rôle prépondérant dans cette circulation car elles irriguent la majeure partie des surfaces latérales des hémisphères cérébraux (Figure 20). Notre étude s'est focalisée sur la régulation des récepteurs de l'Ang II des ACM car elles sont impliquées dans 70% des AVC (Bogousslavsky *et al*. 1988 ; Moulin et Decavel 2004).

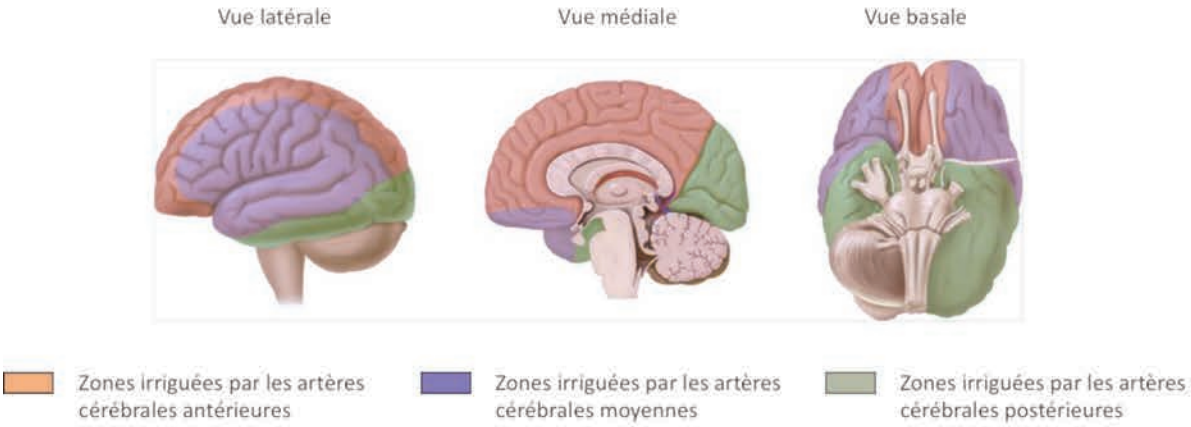


Figure 20 : Zones du cerveau irriguées par les différentes artères cérébrales

(Modifié d'après Edvinsson et Mackenzie 2002)

Outre cette anatomie particulière, le cerveau possède aussi la capacité de maintenir un débit sanguin cérébral (DSC) constant. Il s'agit de l'autorégulation du DSC qui est définie comme la capacité intrinsèque du cerveau à maintenir un débit sanguin constant en dépit de variation de la pression de perfusion (Paulson *et al*. 1990). Cela contribue à maintenir un apport constant en oxygène et en nutriment. La pression de perfusion se définit comme la différence entre la pression artérielle et la pression intracrânienne. En condition physiologique, la pression intracrânienne est négligeable comparée à la pression artérielle. Ainsi, lorsque la pression diminue, le diamètre des artères augmente, et inversement : lorsque la pression augmente, le diamètre des artères diminue. Plusieurs mécanismes sont évoqués pour expliquer le phénomène d'autorégulation du DSC, notamment le TM.

Le réflexe myogénique a été défini en 1902 par Bayliss comme la capacité des artères à faire varier leurs diamètres en réponse à des variations de pression intraluminale (Bayliss 1902). Cette découverte fut d'abord contestée, la majorité de la communauté scientifique n'admettant pas que cette réponse puisse se faire sans l'intervention de facteurs métaboliques (von Anrep 1912). Il fallut attendre les études de Folkow pour confirmer les résultats de Bayliss. En effet dans des vaisseaux dénués de nerfs, il parvint à montrer une réponse pression-dépendante (Folkow 1949, 1952). Cela permit donc de définir la notion de TM comme la contraction spontanée des artères en réponse à une variation de pression. Ainsi une diminution de la pression transmurale subie par l'artère entraine une vasodilatation rapide, à l'inverse une augmentation de la pression entraine une vasoconstriction (Schubert et Mulvany 1999).

D'un point de vue mécanistique, l'augmentation de pression induit un étirement de la paroi des artères. Cela permet d'activer des mécanosenseurs qui, *via* leurs différentes voies de transductions, modulent des canaux ioniques, augmentent le Ca^{2+} puis *in fine* induisent une vasoconstriction (Davis et Hill 1999). Nous avons vu précédemment qu'AT_1 était un mécanosenseur et que son rôle avait été établi dans le TM. D'autres RCPG couplés aux protéines G_{q11} participent également au TM, notamment les récepteurs H_1 de l'histamine, les récepteurs muscariniques M_5 et les récepteurs TP du thromboxane A2 (Mederos y Schnitzler *et al*. 2008 ; Kauffenstein *et al*. 2012).

Deux autres hypothèses ont été proposées pour expliquer l'autorégulation du DSC. L'hypothèse métabolique et l'hypothèse neurogénique, qui ne serons pas discutées en détail ici (Chillon et Baumbach 2002). L'hypothèse métabolique suppose que les variations du DSC induiraient une libération locale d'espèces chimiques (notamment Ca^{2+}, K^+) par les neurones ou les astrocytes (Kuschinsky et Wahl 1978) et des conséquences sur la vasomotricité. L'hypothèse neurogénique suggère que les innervations sympathiques et parasympathiques moduleraient la libération de neuromédiateurs impliqués dans la vasomotricité artérielle (Paulson *et al*. 1990).

Au niveau cérébral, AT_1 participe donc à la vasomotricité des artères *via* le TM, cependant une grande partie de son action passe par la fixation de l'Ang II. Au niveau cérébral la barrière hémato-encéphalique empêche le passage de molécules comme les protéines, cela suggère donc une production d'Ang II locale.

b. Le système rénine angiotensine cérébrovasculaire

En 1970, l'équipe de Goldstein détecta un peptide similaire à l'Ang I dans des cerveaux de rats (Goldstein *et al*. 1970). L'année suivante la présence d'Ang II fut mise en évidence dans des cerveaux de rats et de chiens (Fischer-Ferraro *et al*. 1971). Par la suite, les différents effecteurs du SRA furent retrouvés au niveau cérébral. Notamment l'angiotensinogène (Sernia et Mowchanuk 1983), l'ECA (Saavedra *et al*. 1982), la rénine (Miller *et al*. 1989), les différentes enzymes constituant les voies alternatives de génération d'Ang II (tonine, cathepsine G, chymase, et les activateurs tissulaires du plasminogène) (Bader *et al*. 2001), mais aussi les récepteurs AT_1 et AT_2 qui ont été retrouvés à la fois chez l'homme (Barnes *et al*. 1993) et chez le rat (Tsutsumi et Saavedra 1991). Ce SRA cérébral permet de réguler l'apport en sodium, la sensation de soif, la balance hydrosodée ou encore la pression artérielle (Phillips 1987). Au niveau des microvaisseaux cérébraux, les ARNm de l'angiotensinogène, de l'ECA, d'AT_1 et d'AT_2 ont été mis en évidence (Zhou *et al*. 2006).

Notre équipe a contribué à la mise en évidence du rôle des récepteurs de l'Ang II au niveau cérébrovasculaire. L'étude de Vincent a montré sur un modèle de fenêtre crânienne, que l'administration *in situ* d'Ang I induit une vasoconstriction des artérioles cérébrales. Cet effet est inhibé en présence d'IEC, suggérant une conversion locale en Ang II et la présence des récepteurs AT_1. De plus, la stimulation à l'Ang II en présence d'un antagoniste des récepteurs AT_1 induit une vasodilatation, suggérant la présence des récepteurs AT_2 (*Vincent *et al*. 2005). Les études de Dupuis ont confirmé le rôle d'AT_1 dans le remodelage des artérioles cérébrales intervenant au cours de l'hypertension artérielle (*Dupuis *et al*. 2005a) en suggérant que l'utilisation d'IEC et d'antagonistes d'AT_1 pourrait avoir un rôle bénéfique dans la prévention du remodelage (*Dupuis *et al*. 2010). Enfin, les études de Foulquier ont montré que la réponse fonctionnelle d'AT_1 et d'AT_2 peut être modifiée en absence de variation de leurs expressions géniques et protéiques. Cela suggère l'existence d'une régulation post-traductionnelle de leur activité (*Foulquier *et al*. 2011, 2012).

Parmi les nombreuses modifications post-traductionnelles, les travaux présentés dans cette thèse s'intéressent à la *S*-nitrosation dans récepteurs de l'Ang II. Deux études ont montré que l'activité d'AT_1 et AT_2 pouvait être modulée par *S*-nitrosation.

c. *S*-nitrosation d'AT_1 et AT_2

Nous avons vu précédemment que la *S*-nitrosation régule l'activité de nombreuses protéines, notamment des RCPG (Daaka 2012).

S-nitrosation d'AT_1

AT_1 possède 10 résidus cystéines. Nous avons vu que les 4 cystéines situées sur les boucles extracellulaires sont engagées dans des ponts disulfures. Une cystéine est localisée sur la queue cytoplasmique du récepteur. Les 5 autres sont réparties sur les 7 DTM en position 76, 121, 149, 289 et 296 (Figure 11 p61). Le NO se diffusant préférentiellement dans les membranes (Liu *et al*. 1998) et l'environnement hydrophobe étant plus propice à la *S*-nitrosation (Hess *et al*. 2005), ces 5 cystéines sont susceptibles d'être nitrosées.

En 2006, les travaux de Leclerc montrent dans un modèle de cellules surexprimant le récepteur AT_1 (HEK, *human embryonic kidney*), que l'exposition à du SNP diminue l'affinité de l'Ang II pour AT_1 (Leclerc *et al*. 2006). L'effet est dû à la capacité du SNP à libérer du NO car des résultats similaires ont été obtenus avec du SNAP ou du diethylenetriamine/NO (DEA-NO). Le découplage d'AT_1 de sa protéine G induisant un passage du récepteur à un état de basse affinité (Poitras *et al*. 1998), les auteurs ont donc voulu vérifier si l'effet du SNP était dû à un découplage du récepteur de sa protéine G. Leurs résultats montrent, qu'en présence de SNP, l'addition de GTPγS (agent permettant le découplage de la protéine G) diminue encore plus l'affinité de l'Ang II (Figure 21). Ces résultats suggèrent donc qu'AT_1 était toujours couplé à sa protéine G.

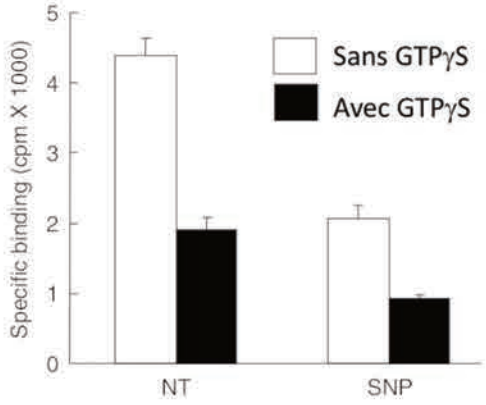


Figure 21 : Effet du SNP et du GTPγS sur la liaison de l'angiotensine II à AT_1 (Modifié d'après Leclerc *et al*. 2006)

(GTPγS : agent de découplage à la protéine G ; NT : non traité ; SNP : nitroprussiate de sodium)

Le NO étant principalement connu pour son action sur la GCs, les auteurs ont vérifié que son action ne passait pas par cette voie. L'utilisation d'un inhibiteur de la GCs ne prévient pas l'effet du SNP, suggérant que la voie GCs/GMPc n'est pas impliquée. Les auteurs ont ensuite vérifié que l'action passait par une *S*-nitrosation en mutant les cystéines transmembranaires. La mutation de la cystéine 289 en sérine entraine une insensibilité du récepteur au SNP (Leclerc *et al*. 2006).

L'exposition de cellules HEK au SNP entraine donc la *S*-nitrosation du récepteur AT_1 au niveau de la cystéine 289. La *S*-nitrosation est responsable de la baisse d'affinité de l'Ang II pour AT_1. L'effet est cependant réversible car après un lavage rapide (5 min), l'Ang II retrouve son affinité pour le récepteur (Leclerc *et al*. 2006).

À ce jour seule cette étude a rapporté une *S*-nitrosation d'AT_1.

S-nitrosation d'AT_2

AT_2 possède 14 résidus cystéines. Nous avons vu que les 4 cystéines situées sur les boucles extracellulaires sont engagées dans des ponts disulfure. Les 10 autres cystéines sont réparties sur les DTM et la queue cytoplasmique (Figure 16 p72).

En 2015, l'étude de Jang s'est intéressée à la régulation de la eNOS et nNOS par les récepteurs AT_1 et AT_2 dans des cardiomyocytes. Leur précédente étude avait montré que l'Ang II induisait une augmentation de l'expression protéique de la nNOS et son activité dans des myocytes cardiaques isolés (Jin *et al*. 2012). Cependant le mécanisme moléculaire permettant cette stimulation de la nNOS n'avait alors pas été élucidé.

Les résultats de l'étude de 2015 montrent qu'AT_1, AT_2 et les EROs semblent impliqués dans l'augmentation de l'activité de la nNOS. Lors d'une stimulation à l'Ang II, l'expression membranaire d'AT_1 diminue avec le temps alors que celle d'AT_2 augmente. De manière surprenante, le losartan ou l'apocynine (composé permettant de piéger les EROs), ainsi que le L-NAME (inhibiteur de la eNOS), inhibent la translocation à la membrane d'AT_2 (Jang *et al*. 2015). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la translocation d'AT_2 à la membrane pourrait être dépendante du NO. Les auteurs ont montré que l'exposition d'AT_2 à du SNP entrainait sa *S*-nitrosation. De plus, la mutation de la cystéine 349 en alanine induit une augmentation de l'expression à la surface d'AT_2 suggérant ainsi qu'elle joue un rôle dans la translocation du récepteur à la membrane (Jang *et al*. 2015).

Les auteurs proposent un schéma pour expliquer cette *S*-nitrosation d'AT_2, présenté ci-après (Figure 22 p87).

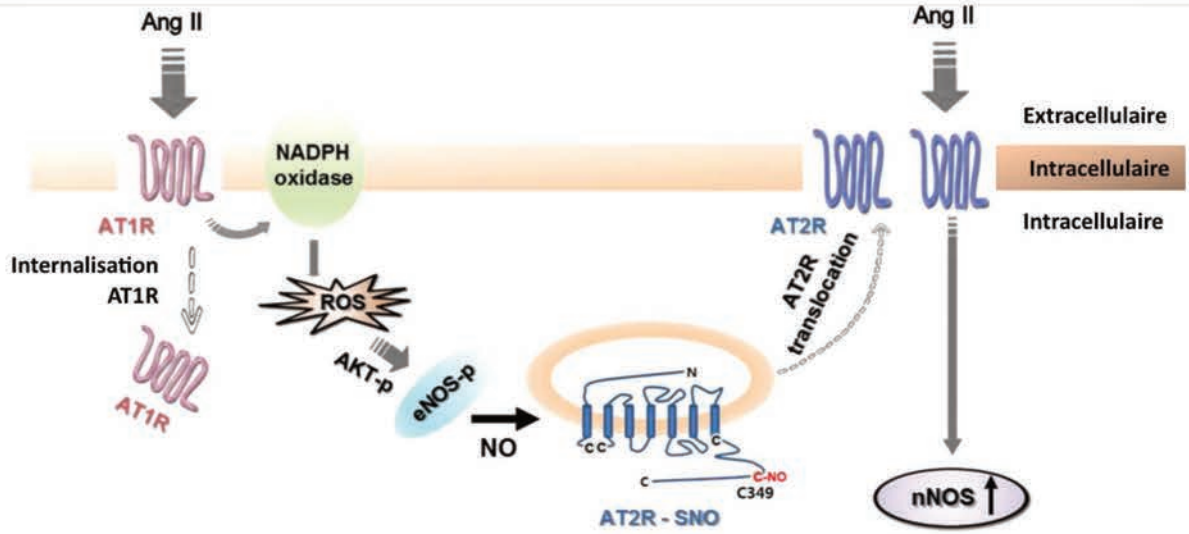


Figure 22 : Schéma illustrant le lien entre la stimulation des récepteurs AT_1, la production d'EROs et la nitrosation d'AT_2

(Modifié d'après (Jang *et al.* 2015)

(Ang II : angiotensine II ; AT1(2)R : récepteur de type 1 (2) de l'angiotensine II ; eNOS : NO-synthase endothéliale ; nNOS : NO-synthase neuronale ; ROS : espèce réactive de l'oxygène)

Tout comme pour AT_1, cette publication est la seule à avoir rapporté une *S*-nitrosation d'AT_2. Cette *S*-nitrosation se fait au niveau de la cystéine 349, impliquée dans l'adressage du récepteur. Aucune étude ne s'est cependant intéressée aux conséquences sur la vasomotricité.

En conclusion, nous avons vu que les récepteurs AT_1 et AT_2 sont impliqués dans la régulation de la circulation cérébrale. Ils possèdent tous les deux des résidus cystéines et des études ont montré qu'ils pouvaient être *S*-nitrosés. La nitrosation d'AT_1 entraine une diminution d'affinité de l'Ang II tandis que celle d'AT_2 pourrait modifier son expression à la membrane. Bien que la stimulation d'AT_1 et AT_2 entraine une vasomotricité des artères, aucune étude ne s'est intéressée aux conséquences que pourrait avoir la *S*-nitrosation des récepteurs de l'Ang II sur cette fonction.

III. Objectifs expérimentaux

Nous avons vu en introduction que le NO et le SRA sont deux acteurs de grande importance en biologie. Le NO, connu principalement pour son rôle vasodilatateur, est aussi capable d'induire une modification post-traductionnelle des protéines *via* la *S*-nitrosation. Cette voie de signalisation fait l'objet de nombreuses études, et est maintenant reconnue comme une voie à part entière dans la signalisation du NO. Nous avons vu que le SRA est un système bien plus complexe que celui initialement décrit et qu'il fait intervenir de nombreux messagers. La littérature s'accorde sur le fait que l'Ang II reste le principal médiateur du SRA *via* sa fixation aux récepteurs AT_1 et AT_2.

Bien que ces deux systèmes aient été largement étudiés individuellement, peu d'études se sont intéressées à l'interaction entre les deux. À l'heure actuelle, seules deux études rapportent une *S*-nitrosation des récepteurs de l'Ang II mais aucune ne s'est intéressée aux conséquences fonctionnelles de ce phénomène.

Dans ce contexte, les travaux présentés dans cette thèse ont eu pour objectif d'étudier l'importance de la *S*-nitrosation des récepteurs de l'Ang II au niveau cérébrovasculaire.

Dans un premier temps nous discuterons d'un aspect méthodologique important, l'aspécificité des anticorps anti-AT_1. La littérature les a décrits comme non-spécifiques, cependant nos études nécessitaient leur utilisation (notamment afin d'évaluer l'internalisation du récepteur). Nous avons donc voulu vérifier si les anticorps monoclonaux, plus récemment mis sur le marché et supposés plus spécifiques, pouvaient être utilisés.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux réponses vasomotrices d'ACM suite à une exposition à un donneur de NO. Nous avons d'abord étudié l'impact de la *S*-nitrosation sur les réponses AngII-dépendantes et AngII-indépendantes (TM). Nous avons ensuite évalué l'action du NO spécifiquement sur AT_1, puis nous avons caractérisé son mode d'action, en vérifiant que l'action passait bien par une *S*-nitrosation. Enfin nous avons évalué si le NO pouvait modifier l'internalisation du récepteur AT_1.

La troisième partie de notre étude s'est intéressée aux protéines de la voie de signalisation d'AT_1. Nous avons voulu vérifier si le NO pouvait modifier l'activation des protéines en amont et en aval de la voie de signalisation. Nous présenterons les résultats obtenus pour deux protéines, PLC et MYPT, ainsi que les limites rencontrées au cours de cette étude.

Nous nous sommes ensuite intéressés à AT_2, en évaluant spécifiquement l'impact de la nitrosation sur la vasodilatation AT_2-dépendante. Nous présenterons les premiers résultats obtenus.

Enfin, dans la dernière partie nous présenterons les résultats préliminaires obtenus sur une souche de rat hypertendus (SHR, *Spontaneous hypertensive rat*).

CHAPITRE 2 : TRAVAUX EXPERIMENTAUX

I. Aspécificité des anticorps anti-AT_1

1) Etude expérimentale, article 2 : No answer to the lack of specificity: Mouse monoclonal antibody targeting the angiotensin II type 1 receptor AT_1R fails to recognize its target

Le génome des mammifères code pour plus de 1000 RCPG, ils ont donc un rôle prépondérant dans l'organisme (Wettschureck et Offermanns 2005). De ce fait, de nombreuses études s'intéressent à l'expression de ces récepteurs. La détection de RCPG endogènes implique l'utilisation de radioligands, de ligands marqués ou d'anticorps. À l'heure actuelle, de nombreux anticorps sont disponibles sur le marché, permettant de cibler une grande majorité des RCPG.

Cependant, depuis quelques années plusieurs publications sont venues questionner la spécificité des anticorps anti-RCPG (Michel *et al*. 2009). Plusieurs groupes ont montré notamment l'aspécificité des anticorps dirigés contre les récepteurs α_1-adrénergiques (Jensen *et al*. 2009), β-adrénergiques (Hamdani et van der Velden 2009), les récepteurs de la dopamine (Bodei *et al*. 2009), les récepteurs muscariniques (Pradidarcheep *et al*. 2009) ou encore les récepteurs de l'histamine (Beermann *et al*. 2012).

Bien que des *guidelines* sur la validation d'anticorps (Mackrill 2004 ; Gupta et Devi 2006) ainsi que les démarches permettant de prouver leurs spécificités (Michel *et al*. 2009) aient été publiées, de trop nombreuses études continuent à utiliser des anticorps aspécifiques.

Les anticorps ciblant les récepteurs de l'Ang II ne font pas exception. En effet, les anticorps anti-AT_1 (Benicky *et al*. 2012) et anti-AT_2 (Hafko *et al*. 2013) ont été décrits comme non-spécifiques. Dans l'étude de Benicky, six anticorps ont été testés, dont l'anticorps polyclonal sc-1173 de Santa Cruz. Cet anticorps a été utilisé dans beaucoup d'études, notamment par notre laboratoire (*Foulquier *et al*. 2011). Bien que décrit comme non spécifique, cet anticorps est encore largement utilisé dans la littérature (Chao *et al*. 2017; Young *et al*. 2017; Zhao *et al*. 2018; Ribeiro *et al*. 2018).

Pour répondre à ces critiques, des anticorps monoclonaux (*i.e*. reconnaissant un seul épitope) ont été développés. L'objectif de notre étude était donc de tester la spécificité du nouvel anticorps monoclonal vendu par Santa Cruz, le sc-57038.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle hétérologue d'expression d'AT_1. Nous avons surexprimé le récepteur marqué par la GFP (*Green fluorescent protein*) dans des cellules HEK qui n'expriment pas AT_1 de manière endogène. Nous avons ensuite visualisé le marquage obtenu avec les anticorps sc-1173 (polyclonal AT_1 décrit comme non-spécifique) et sc-57038 (monoclonal AT_1) par Western blot et par immunofluorescence.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
https://doi.org/10.1007/s00210-018-1522-4

BRIEF COMMUNICATION

No answer to the lack of specificity: mouse monoclonal antibody targeting the angiotensin II type 1 receptor AT_1 fails to recognize its target

Marie-Lynda Bouressam[1] &Isabelle Lartaud[1] &François Dupuis[1] &Sandra Lecat[2,3]

Received: 23 May 2018 / Accepted: 28 May 2018
Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract
Numerous antibodies targeting G protein-coupled receptors (GPCRs) have been described as non-specific among the polyclonal antibodies against angiotensin II type 1 receptor (AT_1). We have tested the newly developed AT_1 receptor mouse monoclonal antibody for its specificity. Human embryonic kidney (HEK293) cells, which do not endogenously express AT_1 receptor, were transfected in order to overexpress a fluorescently labeled enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged human AT_1 receptor. Western blot and immunofluorescence assays were performed to test the specificity of the Santa Cruz monoclonal antibody sc-57036. These results were compared to the ones obtained with the polyclonal sc-1173 anti-AT_1 receptor antibodies that have already been described as non-specific. While the positive controls using GFP antibodies detected the EGFP-tagged AT_1 receptor, both polyclonal and monoclonal anti-AT_1 receptor antibodies failed to specifically recognize the corresponding band by Western blot, as similar bands were revealed in either transfected or non-transfected cells. It also failed to detect AT_1 receptor in immunofluorescence experiments. The lack of target recognition of the monoclonal AT_1 receptor antibody in our experimental conditions suggests that this antibody could give misleading results such as misidentification of the protein. To our knowledge, no specific antibodies targeting AT_1 receptors have been developed so far and the field is thus in need of new technical developments.

Keywords G protein-coupled receptors · Angiotensin II type 1 receptor · Antibody · Specificity

Introduction

G protein-coupled receptor (GPCR) antibodies raise a lot of questions concerning off-target detections (Michel et al. 2009). Numerous publications criticize the non-specificity of different GPCR antibodies: histamine H4-receptors (Beermann et al. 2012); P2Y6 receptors (Yu and Hill 2013); cannabinoid receptors (Cécyre et al. 2014); dopamine receptors (Bodei et al. 2009).

Polyclonal antibodies targeting both angiotensin II (AngII) receptors type 1 (AT_1) and type 2 (AT_2) have been described as non-specific (Benicky et al. 2012; Herrera et al. 2013; Hafko et al. 2013). Despite these findings, antibodies directed against AT_1 receptors are still widely used in the literature with more than 20 publications in 2017 using the Santa Cruz aspecific sc-1173 polyclonal antibodies (Chao et al. 2017; Young et al. 2017; Liu et al. 2017) and already five publications in 2018 (Ahad et al. 2018; Ishikane et al. 2018; Rizzetti et al. 2018; Zhao et al. 2018; Ribeiro et al. 2018). In these papers, authors assume that they proved the specificity of these antibodies. However, in most cases, the control consisted of using the blocking peptide provided by the supplier to highlight the disappearance of the detected bands (Oestreicher et al. 2006). This type of experiment proves that the antibodies recognize the peptide used for immunization; however, it is not sufficient to confirm that they recognize the targeted full-length protein. To overcome this issue, companies have developed monoclonal anti-AT_1 receptor antibodies presented as more specific.

* Sandra Lecat
lecat@unistra.fr

1 Université de Lorraine, CITHEFOR, 54000 Nancy, France

2 BSC UMR7242 BGPCRs, pain and inflammation^ team, CNRS, Université de Strasbourg Labex Medalis, 67412 Illkirch, France

3 Institut de recherche de l'École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg: Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242, Illkirch, France

Published online: 04 June 2018

In the present work, we evaluated the specificity of the Santa Cruz sc-57036 monoclonal anti-AT_1 receptor antibody.

Human embryonic kidney (HEK293) cells, which lack endogenous AT_1 receptor expression, were transfected with a plasmid containing the human AT_1 receptor tagged at its extracellular N-terminus with the enhanced green fluorescent protein (EGFP-AT_1). First, we assessed the robustness of our model by verifying the functionality of the fluorescent receptor and its localization. Second, we tested the specificity of the monoclonal sc-57036 antibody by Western blot and immunofluorescence. We compared our data to the ones obtained using the polyclonal sc-1173 antibodies that have already been described as non-specific. Our results indicate that the Santa Cruz anti-AT_1 receptor monoclonal antibody sc-57036 does not label human AT_1 receptor. Moreover, we confirm here the aspecificity of the AT_1 receptor polyclonal antibodies sc-1173, since bands were revealed by Western blot in all lysates whether AT_1 receptor was present or not.

Materials and methods

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney (HEK 293) cells were cultured to ~ 80% confluence in T-75-cm^2 flasks in MEM with Earle's salt supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) and re-plated twice a week. The expression vector pIRES (Clontech) encoding for the fluorescent EGFP-human AT_1 receptor was a gift from Prof. Haiech and Prof. Kilhoffer (University of Strasbourg) and PCBIS UMS3286 CNRS-University of Strasbourg.

Cells stably expressing human EGFP-AT_1 receptors were, in addition, cultured with 600 µg/ml G418 (Invitrogen).

Antibodies

EGFP was detected with mouse monoclonal anti-GFP (A11120 Life technologies) and goat polyclonal anti-GFP directly coupled to horse radish peroxidase (HRP) (AB6663, ABCAM). Tested antibodies against AT_1 receptors were the anti-AT_1 N-10 (Santa Cruz sc-1173 batch number C2415) and the anti-AT_1 TONI-1 (Santa Cruz sc-57036 batch number I2111). The anti-AT_1 N-10 is a rabbit polyclonal IgG with an epitope mapping within the N-terminal extracellular domain of AT_1 receptor of human origin. It has just been discontinued. The anti-AT_1 TONI-1 is a mouse monoclonal antibody raised against a GST fusion protein corresponding to amino acids 297-356 of AT_1 receptor of human origin. Both antibodies are recommended by the manufacturer for detection of AT_1 receptor of mouse, rat, and human origin by Western blot, immunoprecipitation, immunofluorescence, and ELISA.

Calcium mobilization assay

Cells were cultured for 3 days in T10, then loaded with 2.5 µM Fluo-4 AM (Molecular Probes) for 1 h. Cells were rinsed in PBS, collected in PBS 5 mM EDTA, and suspended in 9 mL Hepes-BSA buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl2, 1.25 mM CaCl2, 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM NaH2PO4, 0.1% bovine serum albumin). Cells were loaded in 96-well plates (Greiner 655090, 100 µL/well) and centrifuged for 3 min at 800 rpm. AngII-evoked increases in intracellular calcium were recorded over time using a Flexstation III (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (3-s intervals over 220 s) at 37 °C through fluorescence emission at 520 nm (excitation at 485 nm). Peak response amplitudes were normalized to basal fluorescence levels. For each concentration of the agonist, we determined the maximal value of the increase in calcium concentration in order to build concentration response curves to AngII.

Cell surface expression of the fluorescent EGFP-AT_1 receptor

Cells were cultured for 2 days in T10 then rinsed in PBS, collected in PBS-5 mM EDTA. Immunolabeling of EGFP-AT_1 receptors expressed at the cell surface was done on intact cells (approximately one million cells) pre-incubated in 1 mL PBS-1% BSA on ice for 1 h, then labeled using mouse monoclonal anti-GFP (A11120 Life technologies 1/100 dilution in PBS 1% BSA) for 30 min on ice and secondary labeling done using a R-phycoerythrin-conjugated AffiniPure F(ab')2 fragment goat anti-mouse IgG (1/100 dilution). EGFP fluorescence and phycoerythrin (PE) staining were detected by flow cytometric analysis (20,000 cells per sample) on a cytometer (FACSCalibur, Becton-Dickinson).

Western blotting to detect the EGFP-tagged AT_1 receptor

Cells were cultured for 2 days in 6-well plates. Cell lysates were performed in 250 µL RIPA buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, complete protease inhibitor EDTA-free, Roche) according to Lecat et al. (2015). In order to concentrate the receptors, in some experiments, cell lysates underwent immunoprecipitation. Briefly, 450 µg of proteins was exposed to mouse monoclonal anti-GFP (A11120 Life technologies, 1:100) overnight on a wheel at 4 °C before coupling to Protein A sepharose 4B (Life technologies) for 2 h at 4 °C the following day. Protein A/antibodies complexes were washed 3 times in 1 mL RIPA buffer by successive centrifugations at 2000 rpm for 1 min at 4 °C before being suspended in 2× Laemmli buffer.

Proteins were not heated and directly separated on 10% acrylamide SDS-PAGE gel electrophoresis. Proteins were

then transferred onto polyvinyl difluoride (PVDF) membranes for 2 h and Western blotting was performed according to Lecat et al. (2015). Concentrations of antibodies were as follows: polyclonal rabbit anti-AT_1 receptor (Santa Cruz sc-1173) 1:500 and monoclonal mouse anti-AT_1 receptor (Santa Cruz sc-57036) 1:500. PVDF membranes were washed in acid buffer for desorbing the antibodies and reprobed with goat polyclonal anti-GFP directly coupled to horse radish peroxidase (HRP) (AB6663, ABCAM) 1:250000. Secondary anti-rabbit HRP and anti-mouse HRP antibodies were used at a dilution of 1:10000 and 1:5000 respectively (Immuno Research Laboratories).

Immunofluorescence

Cells were cultured for 24 h in 24-well plates on 12-mm diameter coverslips coated with rat type I collagen. Cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde, rinsed twice with PBS, and exposed 15 min to 50 mM ammonium chloride in order to quench remaining paraformaldehyde fluorescence. Cells were then rinsed three additional times in PBS. Cells exposed to the monoclonal sc-57036 antibody were permeabilized 3 min in PBS containing 0.1% Triton X-100. Immunolabeling was performed in PBS-0.2% BSA with either polyclonal anti-AT_1 receptor (sc-1173, 1:50), monoclonal anti-AT_1 receptor (sc-57036, 1:50), or monoclonal anti-GFP (A11120, 1:100). Cells were washed three times in PBS-0.2% BSA and incubated further with either secondary goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibodies coupled to Alexa 594 (Invitrogen; 1:200). After further washes in PBS, coverslips were mounted onto slides using an anti-fading agent (Mowiol; Calbiochem). Image acquisition was performed with a fluorescent microscope LEICA (motorized microscope Leica DM5500B together with cold-camera Leica CTR 6000). Figures were created with FigureJ.

Results

Validation of the experimental model: in transfected cells, fluorescently labeled AT_1 receptors are functional and localized AT the plasma membrane

In cells expressing the fluorescently labeled EGFP-AT_1, the receptor is fused at its extracellular N-terminus with the fluorophore (Fig. 1a). We verified that the receptor was active in these cells by measuring calcium responses to AngII. While the parental HEK293 cells did not respond to the agonist, showing that the receptor is not endogenously expressed, EGFP-AT_1 cells gave a nice AngII dose-response with an EC50 around 2.10^{-8} mol/L AngII (Fig. 1b). Using fluorescence cell sorting analysis, we have controlled that all the cells were expressing the fluorescent receptor (as detected by the peak of EGFP fluorescence as compared to non-transfected cells, Fig. 1c, left) and that the receptor was properly localized at the cell surface (as detected by surface labeling with anti-GFP antibodies followed by red fluorescent secondary antibody labeling, Fig. 1c, right).

Polyclonal and monoclonal anti-AT_1 antibodies detected bands in Western blot whether the receptor was expressed or not

The expected size of the fusion protein, EGFP-AT_1 receptor, estimated from the amino acid sequence, is 73 kDa. The estimation does not take into account post-translational modifications such as N-glycosylation. In Western blot of total cell extracts (40 µg of proteins), both monoclonal sc-57036 and polyclonal sc-1173 antibodies detected bands whether the fluorescently labeled receptor was expressed or not (Fig. 2A; total lysates). Reprobing of the membrane with monoclonal anti-GFP antibody specifically revealed a major band in HEK-EGFP-AT_1 transfected cells (but not in parental cells) around 90 kDa corresponding to the tagged receptor. A smaller band around 40 kDa is also detected with the anti-GFP that could correspond to degraded receptors mainly with the EGFP tag left.

In a second attempt to detect the receptors with anti-AT_1 receptor antibodies, we performed immunoprecipitations of 450 µg of protein extracts with monoclonal anti-GFP antibody in order to concentrate the receptors prior to Western blotting. Again, polyclonal sc-1173 and monoclonal sc-57036 revealed unspecific bands in both non-transfected and HEK-EGFP-AT_1 transfected cell lysates (Fig. 2A; anti-GFP-immunoprecipitated lysates). Reprobing the membrane with anti-GFP-HRP antibody specifically revealed the EGFP-AT_1 receptor bands only in cells expressing the fluorescently labeled receptor (Fig. 2A; immunoprecipitated lysates).

Both anti-AT_1 receptor antibodies failed to recognize the receptor by immunofluorescence

Next, we tested the antibodies in immunofluorescence labeling experiments on EGFP-tagged AT_1 receptor expressing cells. Cells cultured on coverslips were labeled either with anti-GFP or anti-AT_1 receptors antibodies, followed by a red fluorescent secondary antibody detection. Using epifluorescence microscopy, images collected in the green channel to directly visualize the fluorescence of EGFP showed a localization of the receptor principally at the cell plasma membrane and in some intracellular perinuclear compartments (Fig. 2B (a, d, g)).

Staining with the monoclonal GFP antibody on non-permeabilized cells revealed only the plasma membrane localization of the receptor (Fig. 2B (b)).

When using the polyclonal anti-AT_1 receptor antibodies, no plasma membrane staining was detected (Fig. 2B (e)). We

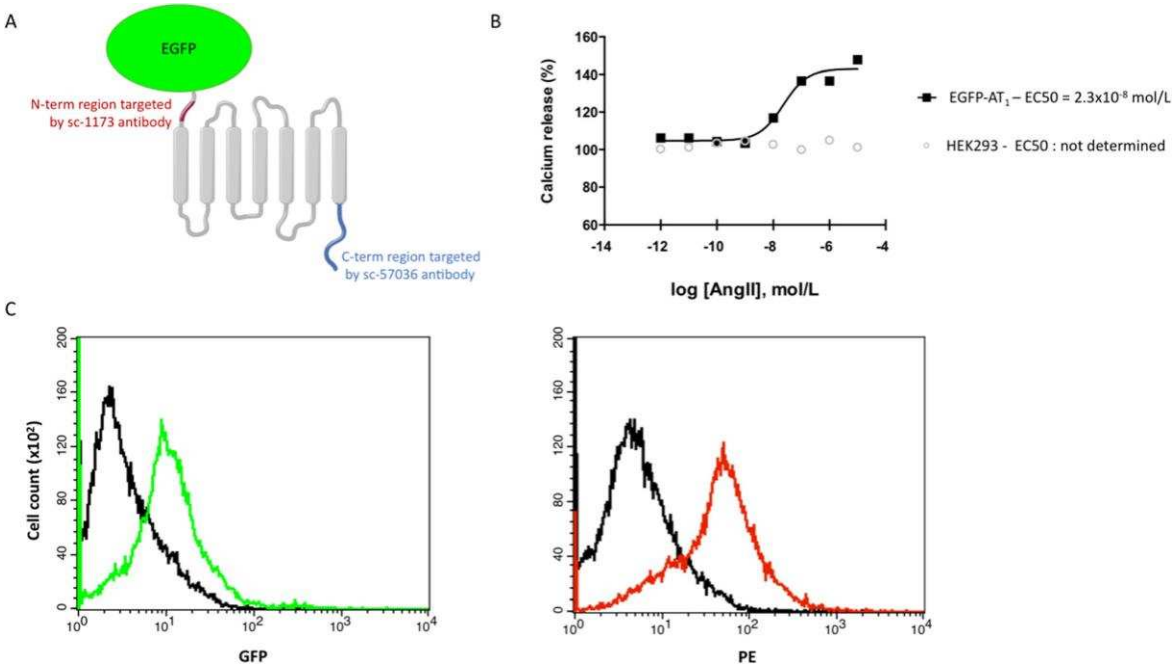


Fig. 1 In EGFP-AT_1 transfected cells, AT_1 receptor is properly localized at the cell surface. a Schematic view of the fusion protein EGFP-AT_1 receptor. The EGFP fluorophore is localized in the extracellular N-terminal part of the receptor. The sc-1173 polyclonal anti-AT_1 receptor targets the short N-terminal domain of the receptor while the epitope for the sc-57036 monoclonal anti-AT_1 receptor encompassed the whole C-terminal tail of the receptor. b HEK293 and EGFP-AT_1 transfected cells were exposed to angiotensin II (AngII; 10^{-12} to 10^{-4} mol/L). AngII-evoked increases in intracellular calcium were recorded over time using a Flexstation III (3-s intervals over 220 s) at 37 °C through fluorescence emission at 520 nm (excitation at 485 nm). Peak response amplitudes were normalized to basal fluorescence levels. Each point represents the maximal value at 520 nm for a given AngII concentration. c The cell population expressing the EGFP-AT_1 receptors was compared to non-transfected cells by fluorescence-activated cell sorting. Left panel: histogram of cells expressing the GFP fluorescence (green line: cells expressing stably the EGFP-AT_1 receptors; black line: non-transfected HEK293 cells). Right panel: histogram of cells labeled with phycoerythrin (PE): intact cells were stained with anti-GFP antibodies and secondary phycoerythrin-labeled antibodies (PE). Fluorescence intensities of non-transfected HEK cells (black line) and cells expressing stably the EGFP-AT_1 receptors (red line).

obtained similar results with the monoclonal anti-AT_1 receptor antibody. For this antibody, we performed permeabilization of the cells due to the localization of the epitope in the C-terminus tail of the receptor. Meanwhile, in the green channel, the receptor could still be detected by the direct fluorescence of EGFP (Fig. 2B (g)); no specific labeling with the monoclonal anti-AT_1 receptor antibody in the red channel (Fig. 2B (h)) and no colocalization in the overlay channel were visible (Fig. 2B (i)).

Therefore, in accordance with our results obtained by Western blot, monoclonal and polyclonal anti-AT_1 receptor antibodies also failed to recognize AT_1 receptors by immunofluorescence.

Discussion

Here, we bring the first evidence of the lack of specificity of the Santa Cruz monoclonal anti-AT_1 antibody sc-57036 as it failed to specifically recognize the AT_1 receptor. In the present work, we used a heterologous model of human AT_1 receptor expression in which the receptor is tagged with the EGFP fluorescent protein at its extracellular N-terminal domain. Before assessing the specificity of anti-AT_1 receptor antibodies, we first evaluated the robustness of our model. HEK cells stably expressed the EGFP-AT_1 receptors homogeneously in the cell population. The receptors were properly localized at the cell surface and functional.

We confirm here the aspecificity of the AT receptor polyclonal antibodies sc-1173, since bands were revealed by Western blot in all lysates whether AT_1 receptor was present or not. We obtained the same results with the AT_1 receptor monoclonal antibody sc-57036. Moreover, both AT_1 receptor antibodies failed to recognize the receptor in immunofluorescence labeling assays. To our knowledge, this is the first report questioning the specificity of Santa Cruz monoclonal AT_1 receptor antibody sc-57036. Already used in ten publications (including three in 2017 and one in 2018) (Filice et al. 2017; Yim et al. 2017; Ferrão et al. 2017; Sinphitukkul et al. 2018), this antibody that lacks specificity could lead to false-positive staining on tissue or primary cell culture and therefore misinterpretations.

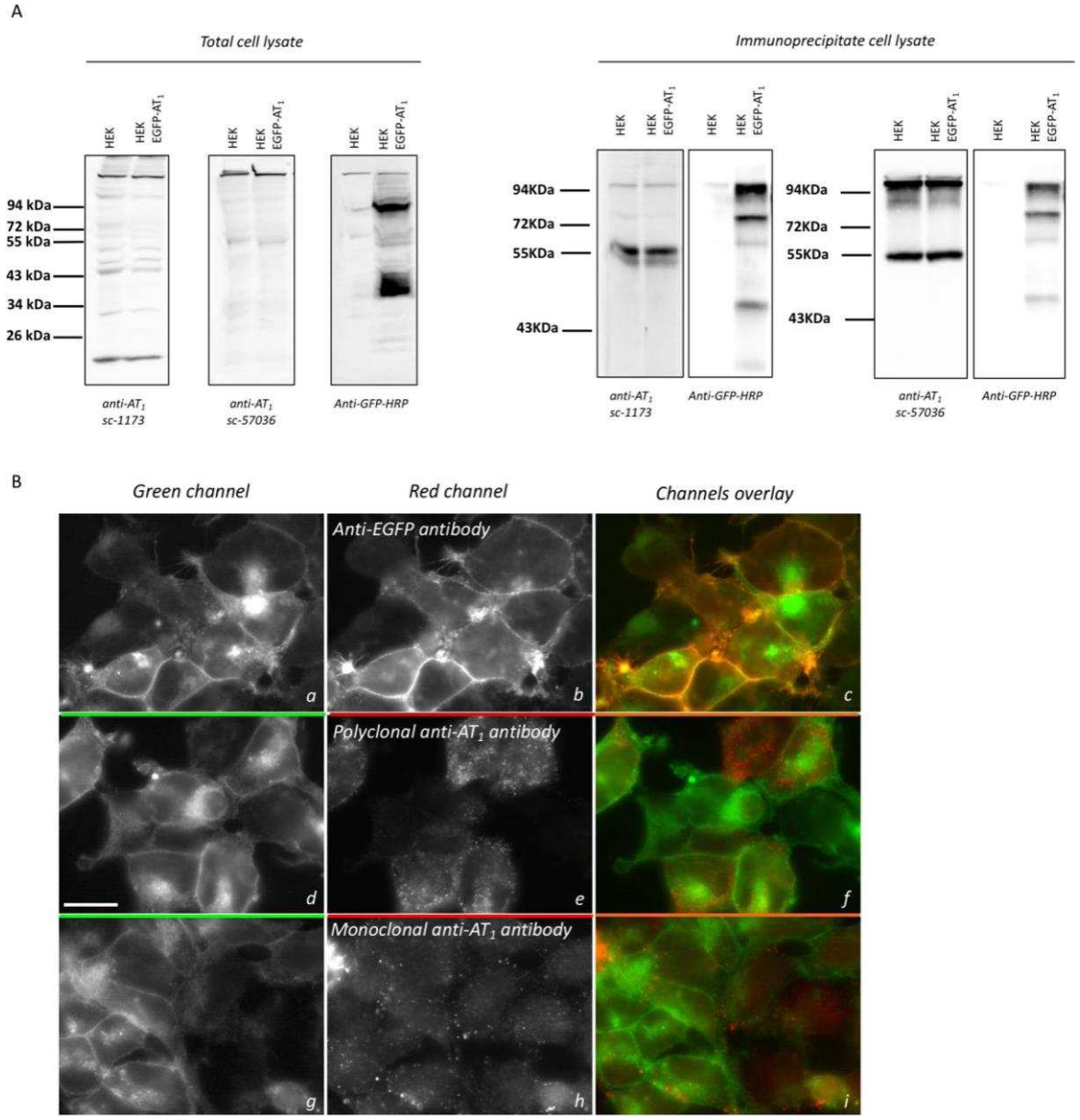


Fig. 2 Monoclonal and polyclonal anti-AT_1 receptor antibodies failed to recognize EGFP-AT_1 receptor in both Western blot and immunofluorescence assays. (A) Immunoblot of total cell lysates (left—40 µg of proteins) or of anti-GFP immunoprecipitated material (right—450 µg of proteins) of non-transfected HEK293 cells and of cells expressing stably the EGFP-AT_1 receptors. Proteins were revealed with either polyclonal anti-AT_1 sc-1173, monoclonal anti-AT_1 sc-57036, or anti-GFP-HRP antibodies. Anti-GFP antibody revealed bands only in cells expressing the EGFP-AT_1 receptor whereas sc-1173 and sc-57036 anti-AT_1 antibodies revealed unspecific bands whether the receptor had been transfected or not. (B) Antibodies immunolabeling on EGFP-tagged AT_1 cells. (a, d, g) Images collected in the green channel using epifluorescence microscopy showing the fluorescence of the EGFP-tagged receptor which is localized principally at the cell plasma membrane and in some perinuclear compartments. (b, e, h) Images collected in the red channel, stained with primary antibodies directed against GFP epitope in b, or AT_1 receptor (e sc-1173; h, sc-57036) followed by a red secondary antibody. Plasma membrane localization of the receptor and colocalization with the GFP signal (displayed in the channel overlay) is only detected with the anti-GFP labeling (b and c respectively), whereas no plasma membrane signal (e and h) or colocalization (g and i) could be detected when using anti-AT_1 antibodies. Scale bar is 10 µM

Concerning the sc-1173 antibodies, our results are in accordance with the ones obtained by Benicky et al. (2012). They tested six commercially available anti-AT_1 receptor antibodies (including sc-1173) by Western blot and immunofluorescence. All of them failed to recognize specifically the receptor. First, they assessed the robustness of their models (AT_{1A} knockout mice and rat hypothalamic 4B cells) by verifying the lack of expression of AT_1 receptor in both models using radioligand binding assays. Second, they compared the immunoreactivity of the antibodies in knockout tissues and in cells transfected or not with AT_1 receptor. The six antibodies (including sc-1173) displayed very different pattern and intensity of immunoreactivity. But all tested antibodies gave signals in tissues from AT_{1A} knockout mice and non-transfected 4B cells. Despite this first report of aspecificity, the sc-1173 antibodies were still widely used in the literature up to now (Rizzetti et al. 2018; Zhao et al. 2018; Ribeiro et al. 2018) and it has just been discontinued.

Since antibodies directed against GPCR have been widely criticized for their lack of specificity, a correct validation of the used antibodies should be provided by the authors and requested by journal editors. Use of blocking peptide is a weak proof of specificity and using tagged receptors is a more reliable alternative method. Authors could also rely on one of the four criteria proposed by Michel et al. (2009) to demonstrate specific immunolabeling of receptors in tissues: (a) disappearance of staining in knockout animals of the target receptor, (b) reduction of staining upon knockdown approaches such as siRNA treatment, (c) selectivity of staining in immunoblots or immunocytochemistry for the target receptor vs related subtypes when expressed in the same cell line, and/or (d) antibodies raised against multiple distinct epitopes of a receptor yielding very similar staining patterns.

Given the issues concerning GPCR antibody specificity, the use of new tools to detect these membrane proteins is thus essential. Single-domain antibody (or nanobody) arouse great interest in the scientific community. Indeed, they show a promising potential for research or therapeutic (Rasmussen et al. 2011; Maussang et al. 2013). They have smaller sizes (around 15 vs 150 kDa for a classical antibody), they can be expressed intracellularly, they can display higher affinity and specificity, and they have lower cost of production. Hence, the emergence of nanobodies is likely to replace actual existing polyclonal and monoclonal antibodies to ensure a reliable detection of GPCR proteins.

In conclusion, we demonstrate here that the monoclonal AT_1 receptor antibody sc-57036 should be added to the long list of non-specific antibodies targeting GPCRs.

Author contributions SL conceived and designed the experiments. MLB and SL conducted the experiments. MLB, IL, FD, SL analyzed data and wrote the manuscript. All the authors read and approved the manuscript.

Abbreviations AngII, angiotensin II; AT_1, angiotensin II type 1 receptor; AT_2, angiotensin II type 2 receptor; EGFP, enhanced green fluorescent protein; HEK293, human embryonic kidney cell; GPCR, G protein-coupled receptor; PE, phycoerythrin; PBS, phosphate-buffered saline

References

Ahad A, Raish M, Al-Jenoobi FI, Al-Mohizea AM (2018) Sorbitane monostearate and cholesterol based niosomes for oral delivery of telmisartan. Curr Drug Deliv 15:260–266. https://doi.org/10.2174/1567201814666170518131934

Beermann S, Seifert R, Neumann D (2012) Commercially available antibodies against human and murine histamine H-receptor lack specificity. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 385:125–135. https://doi.org/10.1007/s00210-011-0700-4

Benicky J, Hafko R, Sanchez-Lemus E, Aguilera G, Saavedra JM (2012) Six commercially available angiotensin II AT1 receptor antibodies are non-specific. Cell Mol Neurobiol 32:1353–1365. https://doi.org/10.1007/s10571-012-9862-y

Bodei S, Arrighi N, Spano P, Sigala S (2009) Should we be cautious on the use of commercially available antibodies to dopamine receptors? Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 379:413–415. https://doi.org/10.1007/s00210-008-0384-6

Cécyre B, Thomas S, Ptito M, Casanova C, Bouchard JF (2014) Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 387:175–184. https://doi.org/10.1007/s00210-013-0930-8

Chao Y, Zhu L, Qu X, Zhang J, Zhang J, Kong X, Gu Y, Pu J, Wu W, Ye P, Luo J, Yang H, Chen S (2017) Inhibition of angiotension II type 1 receptor reduced human endothelial inflammation induced by low shear stress. Exp Cell Res 360:94–104. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.08.030

Ferrão FM, Cardoso LHD, Drummond HA, Li XC, Zhuo JL, Gomes DS, Lara LS, Vieyra A, Lowe J (2017) Luminal ANG II is internalized as a complex with AT1R/AT2R heterodimers to target endoplasmic reticulum in LLC-PK1cells. Am J Physiol Ren Physiol 313:F440–F449. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00261.2016

Filice M, Amelio D, Garofalo F, David S, Fucarino A, Jensen FB, Imbrogno S, Cerra MC (2017) Angiotensin II dependent cardiac remodeling in the eel Anguilla anguilla involves the NOS/NO system. Nitric Oxide Biol Chem 65:50–59. https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.02.007

Hafko R, Villapol S, Nostramo R, Symes A, Sabban EL, Inagami T, Saavedra JM (2013) Commercially available angiotensin II At2 receptor antibodies are nonspecific. PLoS One 8:e69234. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069234

Herrera M, Sparks MA, Alfonso-Pecchio AR, Harrison-Bernard LM, Coffman TM (2013) Lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type 1 receptor protein. Hypertens 1979(61):253–258. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.203679

Ishikane S, Hosoda H, Nojiri T, Tokudome T, Mizutani T, Miura K, Akitake Y, Kimura T, Imamichi Y, Kawabe S, Toyohira Y, Yanagihara N, Takahashi-Yanaga F, Miyazato M, Miyamoto K, Kangawa K (2018) Angiotensin II promotes pulmonary metastasis of melanoma through the activation of adhesion molecules in vascular endothelial cells. Biochem Pharmacol 154:136–147. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.012

Lecat S, Belemnaba L, Galzi J-L, Bucher B (2015) Neuropeptide Y receptor mediates activation of ERK1/2 via transactivation of the IGF receptor. Cell Signal 27:1297–1304. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.03.016

Liu C-H, Gong Z, Liang Z-L, Liu ZX, Yang F, Sun YJ, Ma ML, Wang YJ, Ji CR, Wang YH, Wang MJ, Cui FA, Lin A, Zheng WS, He DF, Qu CX, Xiao P, Liu CY, Thomsen ARB, Joseph Cahill T, Kahsai AW, Yi F, Xiao KH, Xue T, Zhou Z, Yu X, Sun JP (2017) Arrestin-biased AT1R agonism induces acute catecholamine secretion through TRPC3 coupling. Nat Commun 8:14335. https://doi.org/10.1038/ncomms14335

Maussang D, Mujić-Delić A, Descamps FJ, Stortelers C, Vanlandschoot P, Stigter-van Walsum M, Vischer HF, van Roy M, Vosjan M, Gonzalez-Pajuelo M, van Dongen GAMS, Merchiers P, van Rompaey P, Smit MJ (2013) Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo. J Biol Chem 288:29562–29572. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.498436

Michel MC, Wieland T, Tsujimoto G (2009) How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 379:385–388. https://doi.org/10.1007/s00210-009-0395-y

Oestreicher EM, Guo C, Seely EW, Kikuchi T, Martinez-Vasquez D, Jonasson L, Yao T, Burr D, Mayoral S, Roubsanthisuk W, Ricchiuti V, Adler GK (2006) Estradiol increases proteinuria and angiotensin II type 1 receptor in kidneys of rats receiving L-NAME and angiotensin II. Kidney Int 70:1759–1768. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001897

Rasmussen SGF, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, DeVree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, Kobilka BK (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the β2 adrenoceptor. Nature 469:175–181. https://doi.org/10.1038/nature09648

Ribeiro VS, Cabral EV, Vieira LD, Aires RS, Farias JS, Muzi-Filho H, Vieyra A, Paixão AD (2018) Perinatal α-tocopherol overload programs alterations in kidney development and renal angiotensin II signaling pathways at birth and at juvenile age: mechanisms underlying the development of elevated blood pressure. Biochim Biophys Acta 1864:2458–2471. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.04.007

Rizzetti DA, da Silva TM, Escobar AG, Piagette J, Peçanha FM, Vassallo DV, Alonso MJ, Salaices M, Wiggers GA (2018) Mercury-induced vascular dysfunction is mediated by angiotensin II AT-1 receptor upregulation. Environ Res 162:287–296. https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.026

Sinphitukkul K, Manotham K, Eiam-Ong S, Eiam-Ong S (2018) Nongenomic action of aldosterone on colocalization of angiotensin II type 1 and type 2 receptors in rat kidney. J Histotechnol 41:58–65. https://doi.org/10.1080/01478885.2018.1438756

Yim HE, Yoo KH, Bae IS, Hong YS (2017) Early treatment with enalapril and later renal injury in programmed obese adult rats. J Cell Physiol 232:447–455. https://doi.org/10.1002/jcp.25444

Young BM, Nguyen E, Chedrawe MAJ, Rainey JK, Dupré DJ (2017) Differential contribution of transmembrane domains IV, V, VI, and VII to human angiotensin II type 1 receptor homomer formation. J Biol Chem 292:3341–3350. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.750380

Yu W, Hill WG (2013) Lack of specificity shown by P2Y6 receptor antibodies. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 386:885–891. https://doi.org/10.1007/s00210-013-0894-8

Zhao Y, Zhu Q, Sun S, Qiu Y, Li J, Liu W, Yuan G, Ma H (2018) Renal transplantation increases angiotensin II receptor-mediated vascular contractility associated with changes of epigenetic mechanisms. Int J Mol Med 41:2375–2388. https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3435

2) Perspectives

Nos résultats montrent que, dans nos conditions, le nouvel anticorps monoclonal sc-57038 ne reconnaît pas AT_1 de manière spécifique. En effet, en Western blot nous avons obtenu des bandes dans les lysats transfectés avec AT_1 (EGFP-AT1) mais aussi dans ceux ne l'exprimant pas (HEK). De plus, en immunofluorescence, l'anticorps n'a pas su reconnaître le récepteur transfecté. Nous avons obtenu des résultats identiques avec l'anticorps polyclonal sc-1173. Cela est en accord avec la littérature qui l'a déjà décrit comme non-spécifique (Benicky *et al*. 2012 ; Herrera *et al*. 2013).

Nous décrivons ici, pour la première fois, l'anticorps sc-57038 comme non spécifique. Cet anticorps a déjà été utilisé dans 10 publications dont 3 en 2017 (Filice *et al*. 2017 ; Yim *et al*. 2017 ; Ferrão *et al*. 2017), les résultats de ces publications doivent donc être interprétés avec précaution.

De trop nombreuses études continuent à utiliser des anticorps sans pour autant vérifier leurs spécificités. Certaines proposent une validation, cependant celle-ci est rarement satisfaisante. En effet la plupart met en évidence une disparition de marquage lors d'une incubation avec un peptide bloquant correspondant à l'épitope reconnu par l'anticorps (Oestreicher *et al*. 2006 ; Hallersund *et al*. 2011 ; Ricchiuti *et al*. 2011). Cela ne prouve pas la spécificité de l'anticorps, rendant cette démonstration non valable.

Au vu de tous ces éléments, il est donc nécessaire de développer de nouveaux outils afin de permettre l'identification des RCPG. Parmi les nouveaux outils proposés, les nanobodies (ou single-domain antibody) suscitent un grand intérêt dans la littérature. Au début des années 90, les travaux de Hamers-Casterman mettent en évidence, dans du sérum de chameau, une nouvelle classe d'anticorps (Hamers-Casterman *et al*. 1993). Ces anticorps sont dépourvus de chaines légères et sont uniquement composés d'une chaine lourde. Ils se fixent aux antigènes grâce à un domaine variable de la chaine lourde (VHH) d'environ 12 à 15 kDa (Mujić-Delić *et al*. 2014). C'est à partir de ces VHH qu'ont été développés les nanobodies (Figure 23).

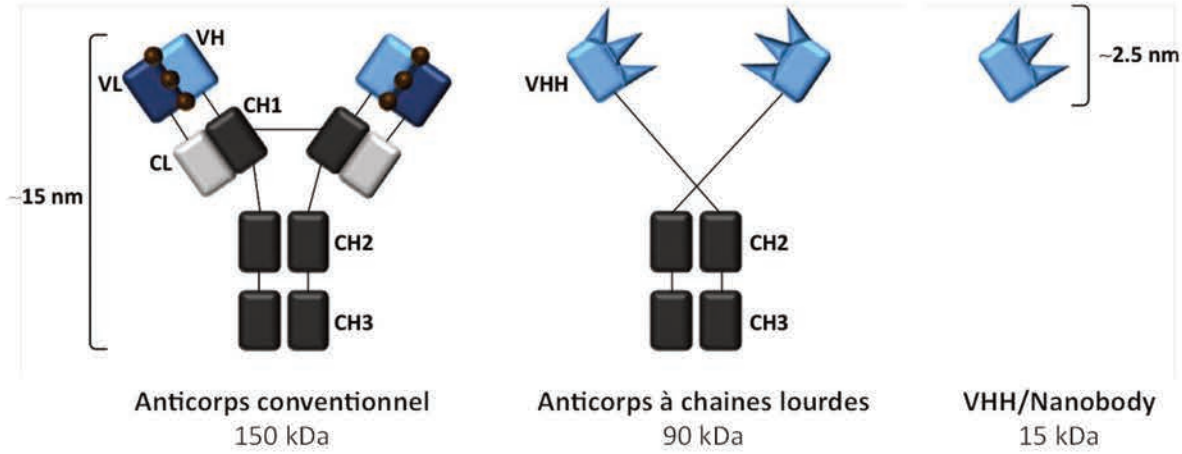


Figure 23 : Structures des anticorps conventionnels, à chaines lourdes et des nanobodies

(CL : région constante des chaînes légères : CH1-3 : domaines constants des chaînes lourdes ; VL : région variable des chaînes légères ; VH : domaine variable des chaînes lourdes ; VHH : domaine variable unique des chaînes lourdes. Modifié d'après Mujić-Delić *et al.* 2014)

Cette nouvelle classe d'anticorps présente de nombreux avantages. Petite taille, hydrophobie, coût de production inférieur à un anticorps classique. En effet ils ne nécessitent pas de modifications post-traductionnelles et peuvent donc être produits dans des bactéries, des levures ou encore des plantes. Les nanobodies ont été testés pour du diagnostic et de la thérapeutique où leur utilisation semble prometteuse. Plusieurs équipes ont notamment développé des nanobodies ciblant les récepteurs HER (*human epidermal growth factor*) afin de permettre leur visualisation par imagerie (Vaneycken *et al.* 2011 ; Xavier *et al.* 2013). Ces récepteurs sont en effet connus pour être surexprimés dans différents types de cancers notamment dans les cancers du sein (Hicks et Kulkarni 2008).

A l'heure actuelle, aucun nanobody n'a été développé pour les récepteurs AT_1 et AT_2. De ce fait et au vu de nos résultats, **nous avons choisi de ne pas utiliser d'anticorps anti-AT_1 pour le reste de notre étude.**

II. Régulations des récepteurs à l'Angiotensine II par *S*-nitrosation

1) Contexte et objectifs

Nous avons vu précédemment l'importance du NO et du SRA dans la régulation de la circulation cérébrale. Bien que largement étudiés séparément, peu d'études se sont intéressées à l'interaction entre NO et SRA. Comme précédemment mentionné, seules deux études ont décrit la *S*-nitrosation des récepteurs de l'Ang II (Leclerc *et al*. 2006; Jang *et al*. 2015). L'étude de Leclerc a montré que la *S*-nitrosation d'AT_1 diminue l'affinité de l'Ang II pour le récepteur. Tandis que l'étude de Jang a montré que la nitrosation d'AT_2 augmente son expression à la membrane et ainsi son interaction avec l'Ang II.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact de la *S*-nitrosation d'AT_1 et AT_2 dans un modèle d'ACM (isolées, perfusées, pressurisées) de rats Wistar normotendus. Pour ce faire, nous avons utilisé un protocole décrit par Alencar permettant d'induire la nitrosation de vaisseaux isolés (Alencar *et al*. 2003b). Le protocole (schématisé ci-dessous, Figure 24) consiste à prétraiter les artères pendant 30 min avec un donneur de NO (GSNO ou SNP). Cela permet à la fois d'induire une nitrosylation (vasodilatation des artères) et une nitrosation. Les ACM sont ensuite rincées pendant 1 h afin de revenir au diamètre de base (disparition de la nitrosylation) tout en maintenant la *S*-nitrosation (Alencar *et al*. 2003b).

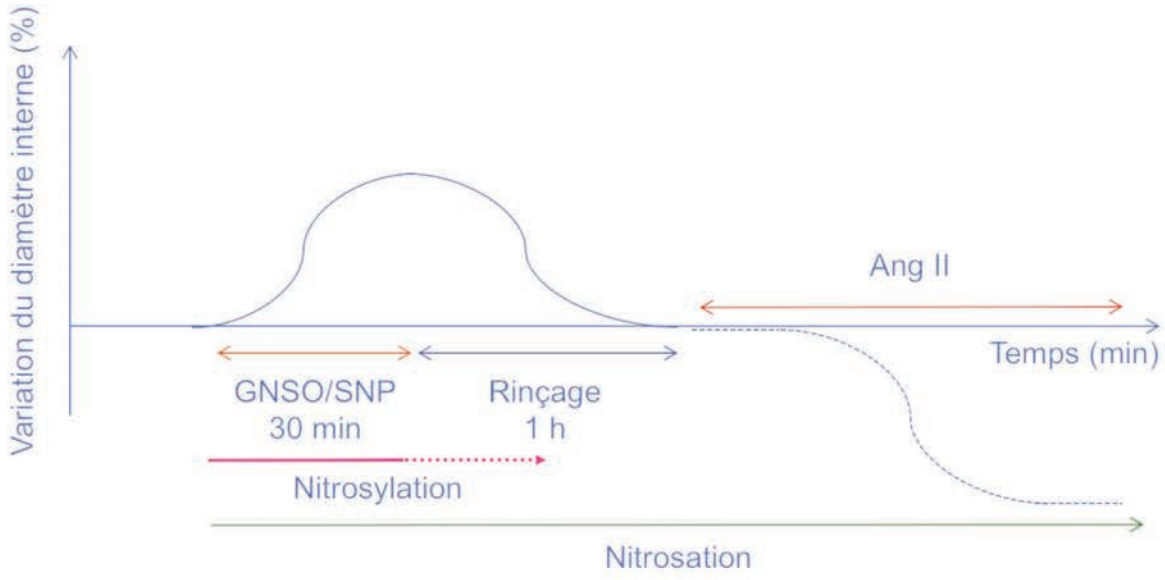


Figure 24 : Schéma du protocole utilisé pour induire la nitrosation des artères cérébrales moyennes

(Ang II : angiotensine II ; GSNO : *S*-nitrosoglutathion ; SNP : nitroprussiate de sodium)

Suite à cette incubation nous avons évalué la réponse à l'Ang II en réalisant des courbes concentration réponses (CCR). Nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus avec d'autres vasoconstricteurs partageant (phénylephrine, Phe et un analogue du thromboxane A2, U46619) ou non (sérotonine, 5HT) la voie de signalisation d'AT_1 (Figure 25).

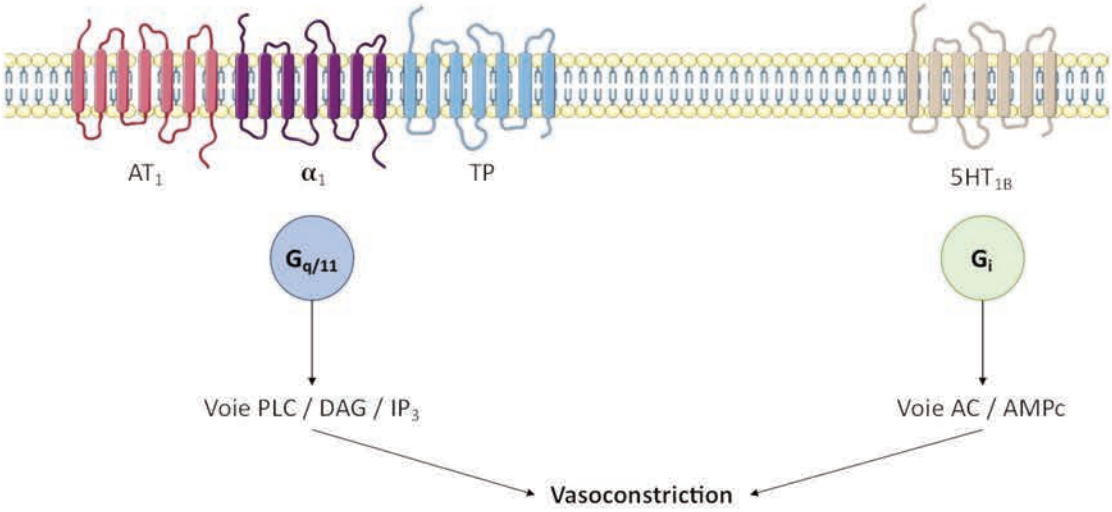


Figure 25 : Voies de signalisation activées par les récepteurs AT_1, α_1, TP et $5HT_{1B}$ permettant la vasoconstriction

(α_1 : récepteur adrénergique α_1 ; AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; AT_1 : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; DAG : diacylglycérol ; IP_3 : inositol trisphosphate ; PLC : phospholipase C ; TP : récepteur TP du thromboxane A2 ; $5HT_{1B}$: récepteur sérotoninergique 1B)

Nous avons également évalué l'impact de la *S*-nitrosation d'AT_1 sur une de ses autres fonctions, le TM. Il est évalué en mesurant le diamètre interne (DI) des artères à différentes valeurs de pression (de 20 à 200 mmHg). Ces valeurs sont ensuite comparées à celles obtenues lorsque l'artère est désactivée avec de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA). L'EDTA permet de chélater le calcium du milieu, ainsi l'artère perd ses propriétés contractiles et son diamètre évolue passivement avec l'augmentation de pression. Pour chaque niveau de pression, le TM est alors calculé à partir de la formule suivante : $TM = (DI - DI_{EDTA}) \times 100 / DI_{EDTA}$.

Puis, à l'aide de différents outils pharmacologiques (inhibiteurs de la eNOS, de la GCs, ascorbate, etc.) nous avons étudié le mécanisme d'action du NO issu du GSNO ou du SNP, en évaluant si son action se faisait par nitrosylation (*via* la voie GCs/GMPc) ou par nitrosation.

Enfin dans un modèle hétérologue (EGFP-AT1, *cf* article 2) nous avons étudié l'impact du NO sur l'expression à la membrane d'AT_1 et son internalisation.

2) Étude expérimentale, article 3 : *S*-nitrosation regulates angiotensin II-dependent and -independent AT_1 responses in the cerebral circulation

S-NITROSATION REGULATES ANGIOTENSIN II DEPENDENT AND INDEPENDENT AT_1 RECEPTOR RESPONSES IN THE CEREBRAL CIRCULATION

Marie Lynda BOURESSAM[1] ; Sandra LECAT[2] ; Alexandre RAOUL[1]; Caroline PERRIN-SARRADO[1]; Isabelle LARTAUD[1] ; François DUPUIS[1]

[1]: Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

[2]: BSC UMR7242 "GPCRs, pain and inflammation" team, CNRS, Université de Strasbourg Labex Medalis, 67412 Illkirch, France

Article soumis le 26/04/2018 au *British Journal of Pharmacology*

ABSTRACT

Background and Purpose. Angiotensin II (AngII) and nitric oxide (NO) regulate cerebral circulation. AngII AT_1 receptors exert ligand-dependent and -independent (myogenic tone, MT) cerebral vessels vasoconstriction. NO induces post-translational modifications of proteins such as *S*-nitrosation (redox modification of cysteine residues). In cultured cells, *S*-nitrosation decreases AngII affinity for AT_1. The present work evaluated the functional consequences of *S*-nitrosation on both AngII-dependent and AngII-independent cerebrovascular responses.

Experimental Approach. *S*-nitrosation was induced in isolated rat middle cerebral arteries by pretreatment with the NO donors *S*-nitrosoglutathione (GSNO) or sodium nitroprusside (SNP). Agonist-dependent activation of AT_1 was evaluated by concentration response curves to AngII. Ligand-independent activation of AT_1 was evaluated by calculating MT (active vs. passive diameter) at pressures ranging from 20 to 200 mmHg in the presence or not of a selective AT_1 inverse agonist.

Key Results. GSNO or SNP completely abolished the AngII-dependent AT_1 vasoconstriction of cerebral arteries. GSNO had no impact on other vasoconstrictors sharing (phenylephrine, U46619) or not (serotonin) the same signaling pathway. MT was reduced by GSNO and addition of losartan did not further decrease MT, suggesting that GSNO blocks AT_1-dependent MT. Those effects are not mediated by *S*-nitrosylation of sGC since its inhibitor did not restore AngII-response, but by *S*-nitrosation as ascorbate (which reduces *S*-nitrosated compounds) restored AngII-response.

Conclusion. In rat middle cerebral arteries, NO-induced *S*-nitrosation affects specifically AT_1 receptor, and reduces both AngII-dependent and AngII-independent activations.

Key words: AT_1 receptor – Renin Angiotensin System – *S*-nitrosation – middle cerebral artery - rat

INTRODUCTION

The renin angiotensin and nitric oxide (NO) systems are both important contributors to the regulation of the cerebral circulation. The renin angiotensin system is involved in cerebral blood flow autoregulation in cerebrovascular structure and function (Dupuis *et al*. 2005). Clinical studies (Diener, 2009) and preclinical models (Omura-Matsuoka *et al*. 2009) show that blockers targeting angiotensin II (AngII) type 1 AT_1 receptors have protective effects against stroke. The AT_1 receptor has two functions: an AngII-mediated vasoconstriction, and recently demonstrated, an involvement in myogenic tone (MT, *i.e*. contractile response of arteries consecutive to an increase of arterial pressure (Schleifenbaum *et al.* 2014) which occurs independently of its interaction with AngII and that is inhibited by inverse agonists of AT_1 receptor.

The other important factor in cerebral circulation regulation, NO, is a gaseous radical well-known for its vascular dilatory effect through nitrosylation (coordination of NO to the ferrous heme prosthetic group) of soluble guanylate cyclase and cGMP production (Rapoport *et al.* 1983). Besides, NO also induces the *S*-nitrosation of proteins (Stamler *et al*. 1992).

S-nitrosation is a redox based modification of proteins resulting from the covalent bound between NO and the sulfhydryl function of cysteine residues. Endogenous NO production, as well as exogenous delivery of NO from NO-donors, protect the brain against cerebral ischemia in preclinical models (Huang *et al*. 1996; Khan *et al*. 2006), especially through *S*-nitrosation of target proteins (Khan and Singh, 2016). This post-translational *S*-nitrosation is involved in the regulation of the activity of many proteins (see the SNObase database (Zhang *et al*. 2012) for an exhaustive review). In 2006, Leclerc *et al.* highlighted an interaction between the renin angiotensin system and NO through *S*-nitrosation. They showed that short exposure of cells over-expressing AT_1 receptors to NO donors led to *S*-nitrosation of the AT_1 receptor on cysteine 289 that decreases its affinity to AngII (Leclerc *et al*. 2006).

Based on the above evidences, we hypothesized that *S*-nitrosation might be a crucial regulator of both AT_1 functions: AngII-dependent vasoconstriction and AngII-independent MT and tested this hypothesis with the application of an NO donor, *S*-nitrosoglutathione (GSNO) on rat middle cerebral arteries (Alencar *et al*. 2003).

First, concentration response curves (CCR) to AngII were built using isolated and perfused rat middle cerebral arteries and compared to other vasoconstrictors. Specificity toward AT_1

receptor was tested using several vasoconstrictors sharing or not AT_1 receptor signaling pathway. Phenylephrine (Phe) and the thromboxane A2 agonist U46619 were chosen since both mediate vasoconstriction through receptors activating heterotrimeric $G_{q/11}$, like AT_1 receptors (Schleifenbaum *et al*. 2014). Serotonin (5-HT) served as a positive control as it mainly involves 5-HT_{1B} receptor (Watts *et al*. 2012) which is coupled to G_i/G_o (Lin *et al*. 2002). Second, we evaluated GSNO impact on AT_1-dependent MT in arteries using the AT_1 inverse agonist losartan.

Third, as GSNO can release both NO and glutathione, we verified that the observed effect was linked to an exogenous NO release. Moreover, the role of endogenous NO production was assessed. As NO acts through two distinct mechanisms: nitrosylation and nitrosation both of these pathways were investigated in order to determine GSNO's way of action.

Finally, as receptor internalization is important in receptor resensitization and activation of downstream effectors (Hunyady *et al*. 2000), we evaluated whether GSNO could modify basal or activated AT_1 receptor cell surface localization in a model of heterologous expression in HEK293 transfected cells.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement and animals

The experiments were conducted on 4-5-month-old male normotensive outbred Wistar (Rj/Han: Wi, Janvier, Le Genest-Saint-Isles, France). They ate standard rat chow (A04, Safe, Villemoison-Epinay sur Orge, France) and drank water (Aqua-clear®, Culligan, Northbrook, USA) *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals in the respect of the 3 Rs' requirements for Animal Welfare. The project untitled "Nitro-Vivo" was positively evaluated by the regional ethical committee for animal experiments and approved by the French Ministry of Research (n°APAFIS#1614-2015090216575422v2).

Vasoactive experiments

Preparation of middle cerebral arteries

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbitone (100 $mg.kg^{-1}$, i.p.), heparinized (1000 $IU.kg^{-1}$, i.v.) and then sacrificed by decapitation. The brain was placed in a physiological salt solution (PSS) at 4°C (NaCl 119, $NaHCO_3$ 24, KCl 4.7, $MgSO_4$ 1.17, KH_2PO_4 1.18, $CaCl_2$ 1.6 and glucose 5.10^{-3} mol/L).

The first branch-free segment of the middle cerebral arteries (MCA) immediately proximal to the circle of Willis was dissected out and mounted on two glass micropipettes (diameter, 125–150 µm) in a small vessel arteriograph (model CH/1/AU/SH, Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA) and secured with silk thread (diameter, 20 µm, 2-0, 48mm, 2540, Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). The vessel was then pressurized (intraluminal pressure of 80 mmHg) and perfused (intraluminal flow rate of 100 $\mu L.min^{-1}$) with PSS at 37°C. Arteries were placed in an organ bath with PSS at 37°C gassed with 5% CO_2/95% O_2 (extraluminal flow rate of 10 $mL.min^{-1}$) for measurement of isotonic vasoconstriction and assessment of viability.

Following initial pressurization, arteries were allowed to recover their basal myogenic tone for 60 min. Baseline internal diameter (ID) was measured using a video dimension analyzer (V94, Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA); signals were digitized and stored with WinDataq DI 720 data acquisition software (Dataq Instruments, Akron, OH, USA).

Viability of the MCA was then assessed with potassium chloride (KCl, 4.10^{-2} mol/L) added to the extraluminal bath. The contractile response rapidly reached a steady state and was measured after 5-minute exposure. Responses were expressed as % change in ID from baseline ID (arteries showing less than 20% of contraction were excluded). Perfusion with KCl was followed by a 15-minute washout period so that ID returns to baseline.

Pretreatment with GSNO

After assessment of viability, MCA were exposed for 30 min to GSNO (2.10^{-6} mol/L) which increased ID. GSNO was then removed and the vessels submitted to a 1-hour washout period (PSS changed every 20 min, adapted from (Alencar *et al*. 2003) that allowed MCA ID to return to baseline (data not shown). According to Alencar *et al. S*-nitrosation of cysteine residues is maintained after the washout (Alencar *et al*. 2003).

AngII-dependent response and G_{q11}, G_i/G_o pathways

Concentration response curves (CRC) to AngII (5 min per concentrations, from 10^{-12} to 10^{-6} mol/L) were compared following PSS or GSNO pretreatment. Phe (10^{-12} to 10^{-4} mol/L), U46619 (10^{-12} to 10^{-5} mol/L) and 5HT (10^{-12} to 10^{-5} mol/L) CRC were performed in the same conditions. Then, for the following series of experiments and in order to shorten the duration of the protocols, MCA were successively exposed to 2 equiactives concentrations of AngII (10^{-10} and 10^{-9} mol/L) and 5HT (3.10^{-9} and 10^{-8} mol/L, concentrations determined from the previous concentration responses curves). Similar results were obtained regardless of the order of perfusion of AngII or 5HT (data not shown). Given the lack of available selective AT_1 agonist, the specific impact of GSNO on AT_1 vasoactive response was assessed using AngII in the presence of the AT_2 antagonist PD123319 (10-6 mol/L) (Näveri *et al*. 1994).

AT_1-dependant myogenic tone experiment

Myogenic tone was evaluated comparing the evolution of ID at pressures ranging from 20 to 200 mmHg under active or passive (20 mmol/L EDTA) conditions in order to build MT-pressure curves (Foulquier *et al*. 2014). MCA were exposed or not to the AT_1 inverse agonist losartan (10^{-5} mol/L) to confirm the involvement of AT_1 in myogenic tone (Schleifenbaum *et al*. 2014). MCA were pretreated with GSNO before exposure or not to losartan. The area under

the curve (AUC, arbitrary unit) of MT in function of pressure was built for each MCA using the following formula: $MT = (ID - ID_{EDTA}) \times 100 / ID_{EDTA}$.

Nitric oxide involvement in AT_1 attenuated response

In order to rule out any antioxidant effect of GSNO (*via* glutathione, GSH, release), MCA were exposed to GSH (30 min, 2.10^{-6} mol/L) instead of GSNO. To confirm the involvement of NO, MCA were exposed to another NO donor (sodium nitroprusside, SNP, 2.10^{-6} mol/L) in the same conditions. Control MCA followed the same protocol with PSS instead of NO donors. Implication of basal level of NO was assessed using N^{ω}-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) an endothelial NO-synthase inhibitor. The concentration of L-NAME was fixed at 10^{-4} mol/L (Briones *et al*. 1999).

Role of S-nitrosation

As most effects of NO are mediated by sGC nitrosylation, its implication was assessed using sGC inhibitor 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ). The concentration of ODQ was fixed at 10^{-5} mol/L (Yu *et al*. 2002). A series a MCA underwent dimethylsulfoxide (DSMO, *i.e.* ODQ solvent) treatment as control (final concentration 0,001%).

To confirm the involvement of *S*-nitrosation in the effect of GSNO, MCA were exposed to sodium ascorbate (20 min, 5.10^{-6} mol/L, based on Figueiredo-Freitas *et al*. 2015) immediately after GSNO pretreatment to specifically reduce S-NO link. This was followed by 40 min PSS before exposure to AngII and 5HT.

Internalization experiments

HEK 293 (Human Embryonic Kidney) cells were cultured to ~80% confluence in T-75-cm^2 flasks in MEM with Earle's salt supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) and re-plated twice a week.

The expression vector pIRES (Clontech) encoding for the fluorescent EGFP-AT1R human receptor was a gift from Prof Haiech and Prof Kilhoffer (University of Strasbourg) and PCBIS UMS3286 CNRS-University of Strasbourg. The vector was constructed using a ligation-independent cloning strategy. Briefly, the receptor is expressed with, at its N-terminus, the fluorophore preceded by a signal peptide for translocation of the fusion protein to the

membrane of the endoplasmic reticulum (Vollmer *et al*. 1999). The construct was verified by DNA sequencing before transfection.

For stable transfection of the EGFP-AT_1 receptor, cells were plated one day before on 10-cm dishes and transfected with 18 µg of plasmids using the calcium phosphate precipitation method (described in Vollmer *et al*. 1999). Selection with antibiotic started two days later with 600 µg/ml G418 (Invitrogen). Clones were collected after 2 weeks of selection.

Internalization were carried out according to Gicquiaux *et al*. (2002) Briefly, cells expressing stably EGFP-AT_1 receptors were suspended in HEPES-BSA buffer at a concentration of 10^6 cells/ml and the suspension was separated into tubes of 1 mL. Cells were either untreated (control) or treated with AngII (10^{-9} M) or GSNO (2.10^{-6} M) for 0, 5, 15, and 30 min at 37°C. A series of cells were pretreated for 30 min with GSNO at 37°C before activation with AngII (same times and concentrations). At the end of the incubations, cells were fixed with PBS containing 1% paraformaldehyde and 0.1% sodium azide then pelleted by centrifugation (at 4°C and suspended in PBS 0.2% BSA on ice to block nonspecific antibody labeling). Immunolabeling of EGFP-AT_1 receptors expressed at the cell surface was done on intact cells using a monoclonal mouse anti-GFP (1/100 dilution) for 30 min at room temperature and secondary labeling done using a R-phycoerythrin-conjugated AffiniPure F(ab')2 fragment goat anti-mouse IgG (1/100 dilution). Phycoerythrin (PE) staining was quantified by flow cytometric analysis (20,000 cells per sample) on a cytometer (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Using FACStar data software, mean PE fluorescence intensity was calculated after subtraction of the mean PE fluorescence of nonspecific staining by the two antibodies measured on non-transfected HEK cells. Results are expressed in percent of variation of mean PE fluorescence between activated *vs* EGFP-AT_1 cells not exposed to agonists (100%).

Statistical analysis

Vasoactive responses of the MCA were expressed as % changes in ID from the value measured during the washout preceding administration of the drug. Concentration-response curve to vasoactive agents were built for each MCA and half maximal effective concentration (EC_{50}) was calculated using Hill's logistic equation:

$$\%ID\ change = E_{min} + (E_{max}-E_{min})/(1+10^{(logEC50-log(concentration)xHillslope)})$$

where E_{min} and E_{max} are minimal and maximal response reached in each concentration-response curve. The value of Hill slope for all experiments was 1.0±0.1. Then -logEC_{50} values (pD_2 values) were calculated.

For functional studies after pretreatments (PSS, GSH, SNP GSNO ± ascorbate, L-NAME or ODQ) For AT_1-dependent myogenic tone, ID (active or passive) of MT or AUC were compared using one-way ANOVA (treatment) followed by a Bonferroni post-test ($p < 0.05$).
For internalization studies differences in the responses to GSNO, AngII ± GSNO were determined by two-way ANOVAs (time, treatment) followed by a Bonferroni post-test ($p < 0.05$).

Substances used

All reagents were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA), U46619 from Enzo life Sciences (Farmingdale, NY, USA), ODQ from Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA), sodium pentobarbital from Sanofi-Aventis (Libourne, France), anti-GFP and anti-PE antibodies from Thermofisher (Waltham, MA, USA). GSNO was prepared extemporaneously as previously described (Parent et al. 2013). All manipulations and assays involving GSH, ascorbate and GSNO were performed under conditions of subdued light, in order to minimize light-induced degradation.

RESULTS

NO acts specifically on AT_1 receptor signaling rather than on other G_{q11} or G_i/G_o signaling pathways

The data obtained on AngII-mediated vasoconstriction are in accordance with the literature (Vincent *et al*. 2005; De Silva *et al*. 2009). GSNO pretreatment specifically reduced the AngII-mediated vasoconstriction of the MCA (Fig. 1). This was not linked to an increase in EC_{50} as GSNO completely abolished the response to AngII even at high concentrations. GSNO did not change the responses to other vasoconstrictors sharing the same G_{q11} pathway (U46619, Phe) or other pathways (5HT) (Fig 1). Moreover, the abolition of AngII vasoconstriction obtained in the presence of the AT_2-antagonist PD123,319 confirmed a decrease of AT_1-mediated vasoconstriction rather than an increase of AT_2-mediated vasodilation (Fig 2).

GSNO abolishes AT_1-mediated agonist-independent myogenic tone

As previously observed by others (Schleifenbaum *et al*. 2014), losartan, an inverse agonist of the AT_1 receptor, shifted the MT-pressure curve towards lower values (Fig. 3A) and significantly reduced the area under curve of the MT-pressure relationships *versus* controls (Fig. 3B). This confirms the implication of AT_1 receptor on myogenic tone. GSNO significantly reduced MT to a lower extent than that obtained with losartan alone (Fig 3A and 3B). The reduction of the area under curve induced by GSNO+losartan was equivalent to that obtained by GSNO alone (Fig 3A and 3B) suggesting that GSNO decreased AT_1-dependant myogenic tone.

GSNO abolishes AT_1 functions through NO release

We ruled out any antioxidant properties of GSNO (*via* GSH release) as exposure to GSH did not change vasoconstriction induced by AngII (Fig. 4A). Involvement of NO was confirmed as SNP (another NO donor) induced similar results to those produced by GSNO (Fig 4B). Involvement of endogenous NO was excluded as treatment with L-NAME (endothelial NO-synthase inhibitor) did not restore vasoconstriction to AngII following GSNO pretreatment (Fig 4C).

NO effects are mediated by a S-nitrosation mechanism

As most effects of NO are mediated by sGC nitrosylation, its implication was assessed using ODQ, a sGC inhibitor. ODQ did not prevent the loss of AngII vasoconstriction following GSNO pretreatment thus excluding involvement of *S*-nitrosylation (Fig 5A). ODQ specifically decreased the response to 5HT. However, this response was restored at higher concentration (10^{-6} mol/L) (Fig. I). No effect of DMSO (*i.e*. ODQ solvent) was observed on both AngII and 5HT responses.

The response of MCA to AngII was restored when ascorbate (used to reduce S-NO link) was added during the washout after GSNO exposure (Fig. 5B) indicating that *S*-nitrosation is involved in the reduction of the AngII response following GSNO exposure. No changes were observed for 5HT.

AT_1 receptor cell surface localization is not modified by NO

Due to the lack of specific antibodies directed against AT_1R (our unpublished data, Benicky *et al*. 2012) precluding experiments on isolated MCA, the impact of GSNO on cell surface localization of AT_1 receptor was assessed in an heterologous expression system: EGFP-tagged AT_1 receptors expressed in HEK293 cells. Using fluorescence cell sorting analysis, the cell population was controlled to have a homogenous expression of the receptors as detected by a single Gaussian peak of GFP fluorescence as compared with non-transfected HEK cells (Fig. 6A green line versus black line respectively). When exposed to GSNO alone (2.10^{-6} mol/L) at 37°C, no variation of cell surface receptors was observed as detected by monoclonal anti-GFP antibody labeling followed by secondary anti-mouse antibody coupled to phycoerythrine (PE, Fig. 6B orange line and 6C). Treatment of EGFP-AT_1 transfected cells with 10^{-9} mol/L of AngII induced a rapid decrease in the amount of receptors detected at the cell surface of intact cells (measurement of PE fluorescence intensities of the cell population, Fig. 6B) while the total amount of receptors remained constant (measurement of GFP fluorescence intensities of the cell population, Fig 6A). The decrease of cell surface receptors upon activation is due to internalization of the receptor. Activated receptors are internalized with a maximal amplitude of 55-60% that is reached almost after 5 minutes of activation (Fig 6B, blue line and Fig. 6C). When cells were treated with GSNO followed by incubation with AngII, the same decrease of PE fluorescence was observed as compared with AngII alone (Fig 6B red line versus blue line, respectively) indicating that GSNO did not alter AT_1 internalization amplitudes (55 vs 53 %, ns)

(Fig. 6B and 6C). Similar results were obtained with cells exposed to AngII for 5, 15 or 30 min indicating that AT_1 internalization kinetics are unaltered as well by GSNO pre-treatment (Fig. 6C).

DISCUSSION

Pretreatment of vessels with GSNO induces *S*-nitrosation of vascular proteins (Alencar *et al*. 2003). In the present work, we demonstrate that GSNO pretreatment of cerebral arteries specifically abolishes both ligand-dependent (AngII) and –independent (MT) AT_1 functions.

We decipher the mechanisms involved using pharmacological tools. First, we argue that GSNO effect is linked to NO (as SNP, another NO donor, produces similar results) rather than to its antioxidant properties (as GSH does not modify the vasoconstrictive responses of MCA). Then, we ruled out any involvement of endogenous NO production using the eNOS inhibitor L-NAME. The abolition of AngII-induced vasoconstriction of MCA was obtained using 2.10^{-6} mol/L of GSNO, a concentration very close to its vasodilating EC_{50} ($2.8\pm0.4\ 10^{-6}$ mol/L, Fig. II.). Vasodilation involves the activation of the soluble guanylyl cyclase (sGC)/GMPc pathway through sGC nitrosylation. In our experiments, the one-hour washout enables diameters to return to baseline, suggesting that nitrosylation-dependent activation of sGC disappears and could therefore not account for the reduced AngII constrictive response (Fig. III). This was further confirmed by the use of the sGC inhibitor, ODQ, which does not prevent the abolition of AngII responses, thus suggesting the involvement of other mechanisms. Alencar *et al*. previously showed, using a similar protocol (Alencar *et al*. 2003), that *S*-nitrosation of proteins remains despite a 1-hour washout. We confirmed that GSNO effect is linked to *S*-nitrosation (Stamler *et al*. 1992), as sodium ascorbate treatment, known to specifically reduce S-NO link, prevents the abolition of AngII vasoconstriction.

The abolition of AngII response following GSNO pretreatment is consecutive to a decreased AT_1-constriction rather than to an increased AT_2-related dilatation, as evidenced in presence of AT_2 antagonist. This reduced vasoconstriction is not consecutive to a GSNO-induced alteration of the contractile apparatus, as 5HT-induced vasoconstriction remained unaffected. While the $5\text{-}HT_{1B}$ receptor involved in cerebrovascular constriction (Watts *et al*. 2012) is coupled to a G_i/G_o G-protein (Lin *et al*. 2002), the AT_1 receptor, as well as the thromboxane A2 and the alpha1-adrenergic receptors are coupled to the G_{q11} G-protein (Schleifenbaum *et al*. 2014). As GSNO specifically abolished AngII- but not U46619- nor Phe-induced

vasoconstriction, this highlights an alteration upstream the G protein G_{q11} and specifically on the AT_1R signaling pathway.

One hypothesis relies on changes in the amount of AT_1 receptors at the cell surface due to variation in expression, exocytosis or internalization upon GSNO treatment. It seems unlikely that 30 min exposure to GSNO might affect AT_1 transcription or gene expression as these require a much longer treatment (18-24h; that could not be detected within the time schedule of our experiments) or higher concentrations (100-fold more) (Ichiki *et al*. 1994; Cahill *et al*. 1995)

Our results using EGFP-AT_1 transfected cells show that AngII induces AT_1 receptor internalization whereas GSNO alone has no effect. Pretreatment of the cells with GSNO did not affect the amplitude or kinetics of activated AT_1R internalization. Whether GSNO pretreatment could affect proteins such as ATRAP (Tanaka *et al*. 2005) or ARAP1 (Guo *et al*. 2003) which specifically promote internalization or membrane expression of AT_1 respectively, or more general actors of receptor's endocytosis such as beta-arrestins, clathrin and/or dynamin (Gáborik *et al*. 2001) that were shown to be regulated by *S*-nitrosation (Daaka 2012), is thus unlikely.

Several studies have previously demonstrated that *S*-nitrosation can lead to uncoupling of G proteins from their receptors, thus decreasing their activity (Hess *et al*. 1994; Miyamoto *et al*. 1997). Activity of G protein-coupled receptors could be either upregulated (cholinergic receptor M2/M4) or downregulated (purinergic receptor $P2Y_{12}$, lysophosphatidic acid receptor LPA_1 or cannabinoid receptor CB_1) by NO donors such as GSNO or CysNO (Kokkola *et al*. 2005).

Several of our results point towards a probable *S*-nitrosation of the AT_1 receptor itself that would affect its conformational dynamics inhibiting its stabilization in the active state.

First a decrease in AngII affinity for AT_1 receptor was observed on transfected HEK cells overexpressing AT_1 receptor in relation to a probable *S*-nitrosation on its Cys289 (Leclerc *et al*. 2006). A difficulty to isomerize into an active form that has a better affinity for agonist can also lead to a decrease of apparent affinity of a receptor, a phenomenon that has been previously described for a mutant of the tachykinin NK2 receptor (Lecat *et al*. 2002). This would explain why, in our study, both ligand-dependent and independent functions are impaired.

Effectively, we report that GSNO also abolished the AngII-independent response of the AT_1 receptor, *i.e.* its involvement in the setting of the cerebrovascular myogenic tone. The molecular mechanism of AT_1 receptor activation upon mechanical stress has been proposed to be mediated by a change in the conformation of the receptor in which the transmembrane domain 7 of the receptor shifts into the agonist-binding pocket and triggers activation independently of agonist (Yasuda *et al*. 2008). This is why losartan, an inverse agonist that stabilizes the receptor in its inactive form, was shown to block AT_1 receptor's involvement in the setting of the cerebrovascular myogenic tone. We observed that pretreatment with GSNO induced a stronger decrease in MT than treatment with losartan alone. When losartan was added to GSNO pretreatment, no further decrease was observed. This cannot be explained by a complete blockade of MT by GSNO (MT remaining relatively high - 29% at 80 mmHg - after GSNO pretreatment) and thus suggests that AT_1-mediated MT was already abolished by GSNO. Thus the GSNO effect attenuating AT_1-mediated MT points towards the hypothesis that the AT_1 receptor itself is altered in its conformational dynamics. The stronger decrease in MT compared to losartan alone is most likely related to the impact of GSNO on other mechanosensors, such as other G protein-coupled receptors (Kauffenstein *et al*. 2012).

Finally, the fact that GSNO alters AT_1-induced vasoconstriction without affecting AT_1 receptor internalization could also be explained by an alteration in the receptor conformational dynamics: indeed, molecular dynamics simulation of the basal and the active states of AT_1R leads to the proposal that activation of the G_{q11} pathway is associated with a specific conformational transition stabilized by the agonist but that the activation of the β-arrestin pathway leading to internalization would be linked to the basal state of the receptor (Cabana *et al*. 2015). Further studies are required to demonstrate whether *S*-nitrosation of the receptor indeed alters its conformational dynamics.

In conclusion, we demonstrate a new and unexplored regulation pathway of the cerebrovascular renin angiotensin system: at the cerebrovascular level, GSNO pretreatment induces *S*-nitrosation which is associated with a decrease in AT_1 agonist-dependent or -independent vasoconstriction. Taken together, these results suggest that the redox regulation *via S*-nitrosation of the renin angiotensin system components might become an important therapeutic target. Others of our data indicate that GSNO decreases AngII-mediated vasoconstriction in arteries from spontaneous hypertensive rats (-3±1 *vs* -12±2 %, n = 3-4 MCA per condition). Therefore, besides its neuroprotective properties (Khan *et al*. 2005), GSNO, if

administered after stroke, a situation in which AT_1-dependent vasoconstriction is exacerbated (Stenman and Edvinsson 2004) and NO availability is reduced (Chrissobolis *et al*. 2011), could be beneficial by reducing AT_1 signaling. We recently demonstrated that the microparticles loaded with GSNO protected the brain from the consequences of ischemia (Parent *et al*. 2015). Further experiments are needed to link this cerebroprotection to the *S*-nitrosation in AT_1 signaling pathway.

INNOVATION

Angiotensin II (AngII) is a key regulator of the cerebral circulation. The fine tuning of its AT_1 receptor (constrictor) is of critical importance in many pathophysiological processes, such as stroke. The present study is the first to identify *S*-nitrosation (the covalent bound between NO and cysteine residues) as a mechanism involved in the control of the AT_1-dependent cerebrovascular functions. *S*-nitrosation leads to reduced AngII vasoconstriction and myogenic tone and might thus represent a new therapeutic target in cerebrovascular diseases, in which excessive vasoconstriction may lead to deleterious consequences.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MLB, CPS, IL and FD conceived the *ex vivo* experiment. MB and SL conceived the *in vitro* experiment. MLB carried out all the experiment, SL and AR respectively conducted internalization and myogenic tone experiment. All the authors equally contributed to the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was funded by the French Ministry of Education, Research and Technology (Paris, France, EA3452). The authors thank José Metzger for help with the vasoactivity experiments, Caroline GAUCHER and Isabelle FRIES for help with preliminary internalization experiments and Prof Jacques HAIECH, Prof Marie-Claude KILHOFFER (University of Strasbourg) and PCBIS UMS3286 CNRS-University of Strasbourg for the vector encoding fluorescent AT_1 receptors.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

ABBREVIATION

5HT: serotonin

AngII: angiotensin II

AT_1: angiotensin II type 1 receptor

AT_2: angiotensin II type 2 receptor

AUC: area under the curve

BSA: Bovine serum albumin

DMSO: dimethyl sulfoxide

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

GFP: Green fluorescent protein

GSH: glutathione

GSNO: *S*-nitrosoglutathione

HEK: human embryonic kidney

ID: internal diameter

L-NAME: N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester

MCA: middle cerebral artery

MT: myogenic tone

NO: nitric oxide

ODQ: 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

PBS: Phosphate buffered saline

PD123,319: AT_2 antagonist

PE: Phycoerythrin

Phe: Phenylephrine

PSS: physiological salt solution

SNP: sodium nitroprusside

sGC: soluble guanylyl cyclase

U46619: thromboxane A2 agonist

REFERENCES

Alencar, J.L., Lobysheva, I., Chalupsky, K., Geffard, M., Nepveu, F., Stoclet, J.-C., et al. (2003). S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. J. Pharmacol. Exp. Ther. 307: 152–159.

Benicky, J., Hafko, R., Sanchez-Lemus, E., Aguilera, G., and Saavedra, J.M. (2012). Six commercially available angiotensin II AT1 receptor antibodies are non-specific. Cell. Mol. Neurobiol. 32: 1353–1365.

Briones, A.M., Alonso, M.J., Marín, J., and Salaices, M. (1999). Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. Br. J. Pharmacol. 126: 111–120.

Cabana, J., Holleran, B., Leduc, R., Escher, E., Guillemette, G., and Lavigne, P. (2015). Identification of Distinct Conformations of the Angiotensin-II Type 1 Receptor Associated with the Gq/11 Protein Pathway and the β-Arrestin Pathway Using Molecular Dynamics Simulations. J. Biol. Chem. 290: 15835–15854.

Cahill, P.A., Redmond, E.M., Foster, C., and Sitzmann, J.V. (1995). Nitric oxide regulates angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells. Eur. J. Pharmacol. 288: 219–229.

Chrissobolis, S., Miller, A.A., Drummond, G.R., Kemp-Harper, B.K., and Sobey, C.G. (2011). Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. Front. Biosci. Landmark Ed. 16: 1733–1745

Daaka, Y. (2012). S-Nitrosylation-Regulated GPCR Signaling. Biochim. Biophys. Acta 1820: 743–751.

De Silva, T.M., Broughton, B.R.S., Drummond, G.R., Sobey, C.G., and Miller, A.A. (2009). Gender influences cerebral vascular responses to angiotensin II through Nox2-derived reactive oxygen species. Stroke 40: 1091–1097.

Diener, H.-C. (2009). Preventing stroke: the PRoFESS, ONTARGET, and TRANSCEND trial programs. J. Hypertens. Suppl. Off. J. Int. Soc. Hypertens. 27: S31-36.

Dupuis, F., Atkinson, J., Limiñana, P., and Chillon, J.-M. (2005). Captopril improves cerebrovascular structure and function in old hypertensive rats. Br. J. Pharmacol. 144: 349–356.

Figueiredo-Freitas, C., Dulce, R.A., Foster, M.W., Liang, J., Yamashita, A.M.S., Lima-Rosa, F.L., et al. (2015). S-Nitrosylation of Sarcomeric Proteins Depresses Myofilament Ca2+)Sensitivity in Intact Cardiomyocytes. Antioxid. Redox Signal. 23: 1017–1034.

Foulquier, S., Lartaud, I., and Dupuis, F. (2014). Impact of Short-Term Treatment with Telmisartan on Cerebral Arterial Remodeling in SHR. PLoS ONE 9:.

Gáborik, Z., Szaszák, M., Szidonya, L., Balla, B., Paku, S., Catt, K.J., et al. (2001). Beta- arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. Mol. Pharmacol. 59: 239–247.

Gicquiaux, H., Lecat, S., Gaire, M., Dieterlen, A., Mély, Y., Takeda, K., et al. (2002). Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide Y Y(1) receptor. J. Biol. Chem. 277: 6645–6655.

Guo, D.-F., Chenier, I., Tardif, V., Orlov, S.N., and Inagami, T. (2003). Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 310: 1254–1265.

Hess, D.T., Lin, L.H., Freeman, J.A., and Norden, J.J. (1994). Modification of cysteine residues within G(o) and other neuronal proteins by exposure to nitric oxide. Neuropharmacology 33: 1283–1292.

Huang, Z., Huang, P.L., Ma, J., Meng, W., Ayata, C., Fishman, M.C., et al. (1996). Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. 16: 981–987.

Hunyady, L., Catt, K.J., Clark, A.J., and Gáborik, Z. (2000). Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. Regul. Pept. 91: 29–44.

Ichiki, T., Herold, C.L., Kambayashi, Y., Bardhan, S., and Inagami, T. (1994). Cloning of the cDNA and the genomic DNA of the mouse angiotensin II type 2 receptor. Biochim. Biophys. Acta 1189: 247–250.

Kauffenstein, G., Laher, I., Matrougui, K., Guérineau, N.C., and Henrion, D. (2012). Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. Cardiovasc. Res. 95: 223–232.

Khan, M., Jatana, M., Elango, C., Paintlia, A.S., Singh, A.K., and Singh, I. (2006). Cerebrovascular protection by various nitric oxide donors in rats after experimental stroke. Nitric Oxide Biol. Chem. 15: 114–124.

Khan, M., Sekhon, B., Giri, S., Jatana, M., Gilg, A.G., Ayasolla, K., et al. (2005). S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. 25: 177–192.

Khan, M., and Singh, I. (2016). Inhibition of the AMPK/nNOS pathway for neuroprotection in stroke. Neural Regen. Res. 11: 398–399.

Kokkola, T., Savinainen, J.R., Mönkkönen, K.S., Retamal, M.D., and Laitinen, J.T. (2005). S-Nitrosothiols modulate G protein-coupled receptor signaling in a reversible and highly receptor-specific manner. BMC Cell Biol. 6: 21.

Lecat, S., Bucher, B., Mely, Y., and Galzi, J.-L. (2002). Mutations in the extracellular amino-terminal domain of the NK2 neurokinin receptor abolish cAMP signaling but preserve intracellular calcium responses. J. Biol. Chem. 277: 42034–42048.

Leclerc, P.C., Lanctot, P.M., Auger-Messier, M., Escher, E., Leduc, R., and Guillemette, G. (2006). S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. Br. J. Pharmacol. 148: 306–313.

Lin, S.L., Setya, S., Johnson-Farley, N.N., and Cowen, D.S. (2002). Differential coupling of 5-HT(1) receptors to G proteins of the G(i) family. Br. J. Pharmacol. 136: 1072–1078.

Miyamoto, A., Laufs, U., Pardo, C., and Liao, J.K. (1997). Modulation of bradykinin receptor ligand binding affinity and its coupled G-proteins by nitric oxide. J. Biol. Chem. 272: 19601–19608.

Moulin T, Decavel P (2004) [Circumstances of the diagnosis of carotid or vertebrobasilar arteriopathy]. Rev Prat 54:1062–1072

Näveri, L., Strömberg, C., and Saavedra, J.M. (1994). Angiotensin II AT1 receptor mediated contraction of the perfused rat cerebral artery. Neuroreport 5: 2278–2280.

Omura-Matsuoka, E., Yagita, Y., Sasaki, T., Terasaki, Y., Oyama, N., Sugiyama, Y., et al. (2009). Postischemic administration of angiotensin II type 1 receptor blocker reduces cerebral infarction size in hypertensive rats. Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens. 32: 548–553.

Parent, M., Boudier, A., Perrin, J., Vigneron, C., Maincent, P., Violle, N., et al. (2015). In Situ Microparticles Loaded with S-Nitrosoglutathione Protect from Stroke. PLOS ONE 10: e0144659.

Parent, M., Dahboul, F., Schneider, R., Clarot, I., Maincent, P., Leroy, P., et al. (2013). A Complete Physicochemical Identity Card of S-nitrosoglutathione. Curr. Pharm. Anal. 9: 31– 42.

Rapoport, R.M., Draznin, M.B., and Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. Nature 306: 174–176.

Schleifenbaum, J., Kassmann, M., Szijártó, I.A., Hercule, H.C., Tano, J.-Y., Weinert, S., et al. (2014). Stretch-activation of angiotensin II type 1a receptors contributes to the myogenic response of mouse mesenteric and renal arteries. Circ. Res. 115: 263–272.

Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., et al. (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 444–448.

Stenman, E., and Edvinsson, L. (2004). Cerebral ischemia enhances vascular angiotensin AT1 receptor-mediated contraction in rats. Stroke 35: 970–974.

Tanaka, Y., Tamura, K., Koide, Y., Sakai, M., Tsurumi, Y., Noda, Y., et al. (2005). The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. FEBS Lett. 579: 1579–1586.

Vincent, J.-M., Kwan, Y.W., Chan, S.L., Perrin-Sarrado, C., Atkinson, J., and Chillon, J.-M. (2005). Constrictor and dilator effects of angiotensin II on cerebral arterioles. Stroke 36: 2691–2695.

Vollmer, J.Y., Alix, P., Chollet, A., Takeda, K., and Galzi, J.L. (1999). Subcellular compartmentalization of activation and desensitization of responses mediated by NK2 neurokinin receptors. J. Biol. Chem. 274: 37915–37922.

Watts, S.W., Morrison, S.F., Davis, R.P., and Barman, S.M. (2012). Serotonin and blood pressure regulation. Pharmacol. Rev. 64: 359–388.

Yasuda, N., Miura, S., Akazawa, H., Tanaka, T., Qin, Y., Kiya, Y., et al. (2008). Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. EMBO Rep. 9: 179–186.

Yu, M., Sun, C.-W., Maier, K.G., Harder, D.R., and Roman, R.J. (2002). Mechanism of cGMP contribution to the vasodilator response to NO in rat middle cerebral arteries. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 282: H1724-1731.

Zhang, X., Huang, B., Zhang, L., Zhang, Y., Zhao, Y., Guo, X., et al. (2012). SNObase, a database for S-nitrosation modification. Protein Cell 3: 929–933.

FIGURES

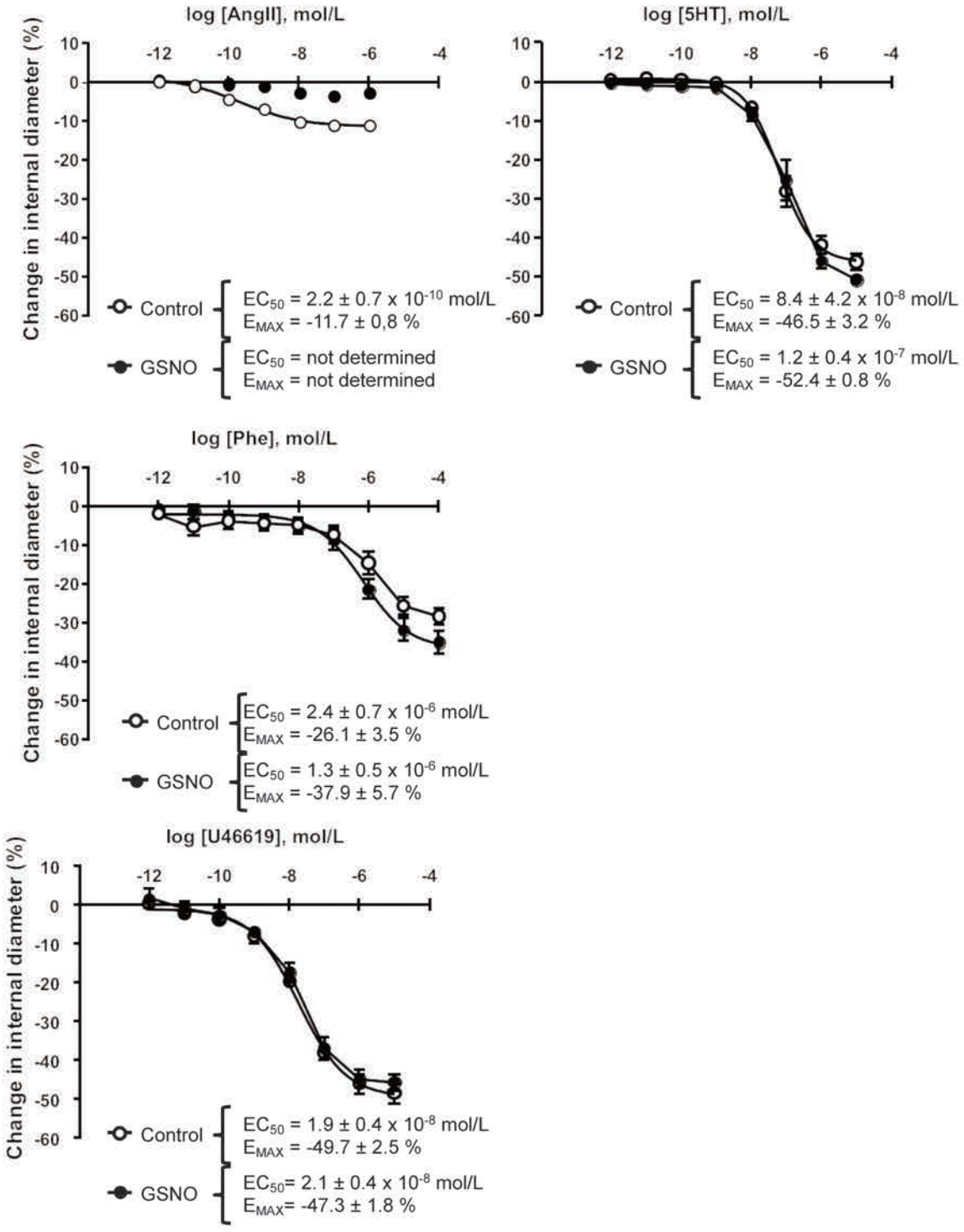


Fig. 1. GSNO effect lies specifically on AT_1 receptor signaling rather than on other G_{q11} or G_i/G_o signaling pathway

Contractile responses of isolated and perfused rat middle cerebral arteries to different vasoconstrictor agonists were measured. Concentration-response curves, half maximal

effective concentration (EC_{50}) and maximal effect (E_{max}) values in response to (A) angiotensin II (AngII), alpha1-adrenergic agonist phenylephrine (PE), thromboxane A2 agonist (U46619) and (B) serotonin (5HT), after exposure to *S*-nitrosoglutathione.

Fitting to Hill's logistic equation was used. Values for EC_{50} (mol/L) and E_{max} (%) are expressed as means ± SEM. n = 5-7 middle cerebral arteries per curve.

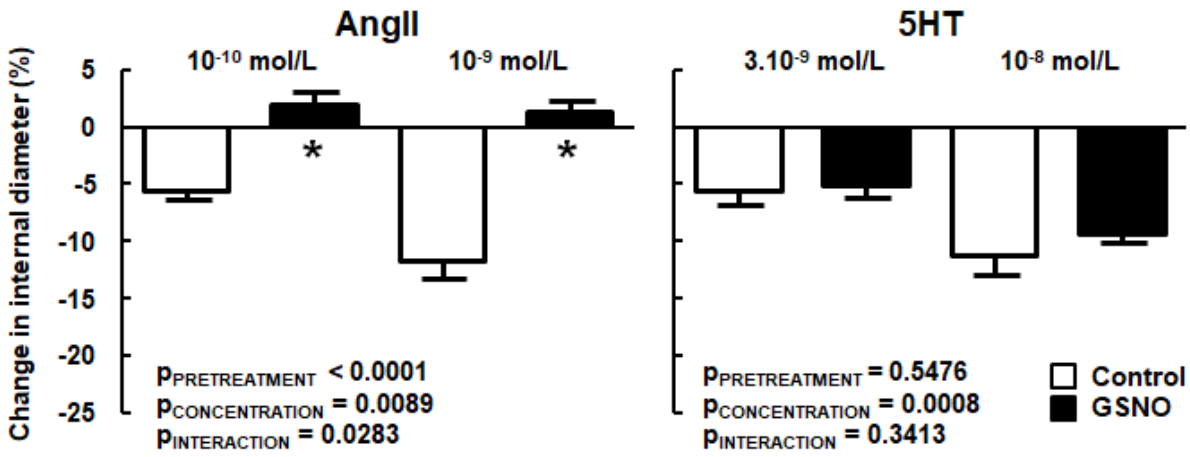


Fig. 2. GSNO specifically abolishes AT_1-induced vasoconstriction

Specific AT_1 induced vasoconstriction was assessed in response to Angiotensin II (AngII) in the presence of PD123319 (a selective AT_2 antagonist, 10^{-6} mol/L), and compared to serotonin (5HT). Changes in internal diameter (%) are expressed as means ± SEM. Two-way ANOVA (pretreatment, concentration) were used to calculate p values; *: $p<0.05$ *vs* control (Bonferroni post-test). n = 6-8 middle cerebral arteries per condition

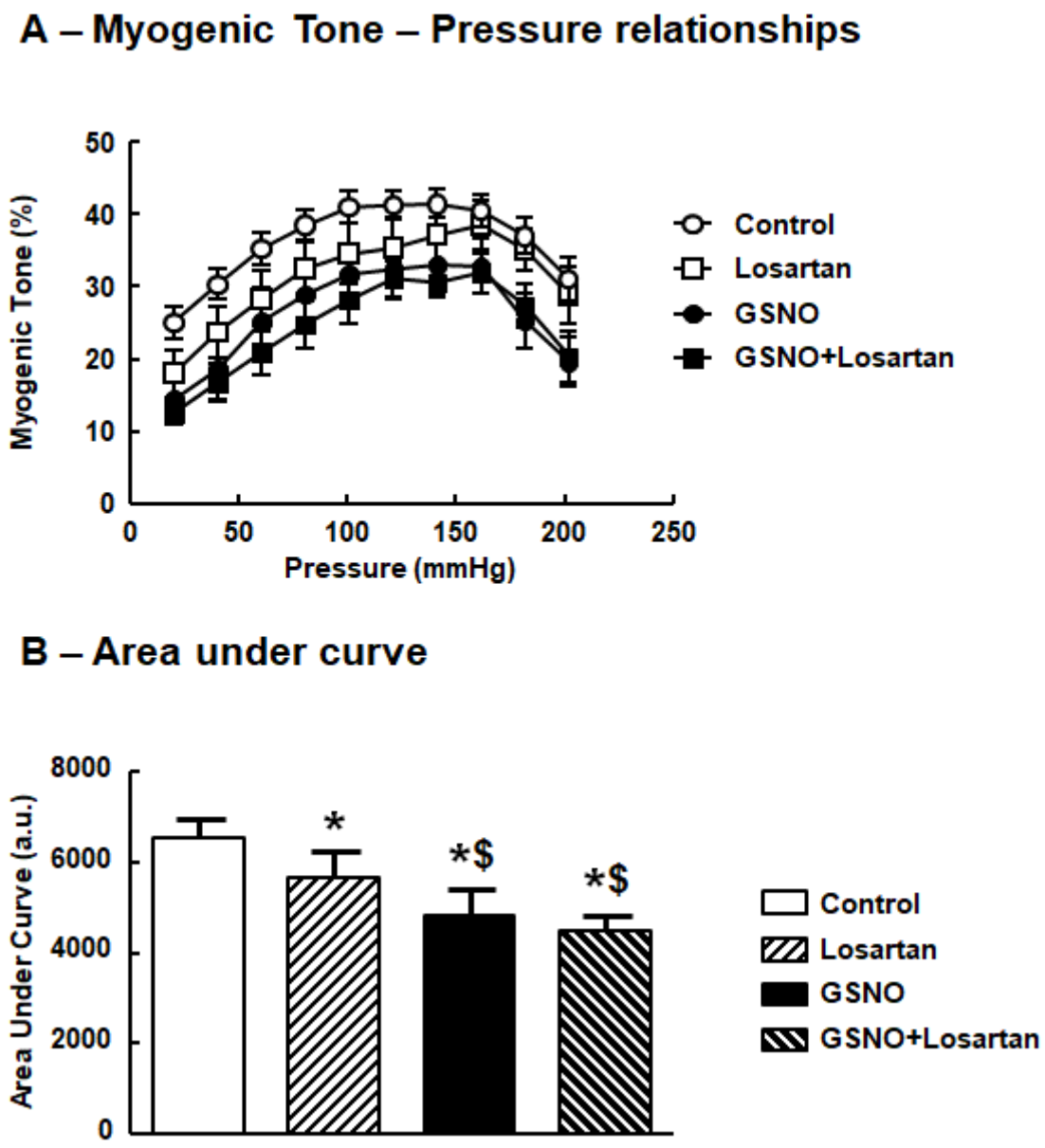


Fig. 3. GSNO decreases AT_1-dependant myogenic tone

Impact of an exposure to *S*-nitrosoglutathione (GSNO), losartan or GSNO+losartan on myogenic tone (A) and area under the curve of myogenic tone (B) of middle cerebral arteries isolated from Wistar rats. Values are expressed as means ± SEM. One-way ANOVA (treatment) was used to calculate p values; *: $p<0.05$ *vs* control; $: $p<0.05$ *vs* losartan *: $p<0.05$ *vs* control (Bonferroni post-test). n = 8-19 middle cerebral arteries per condition.

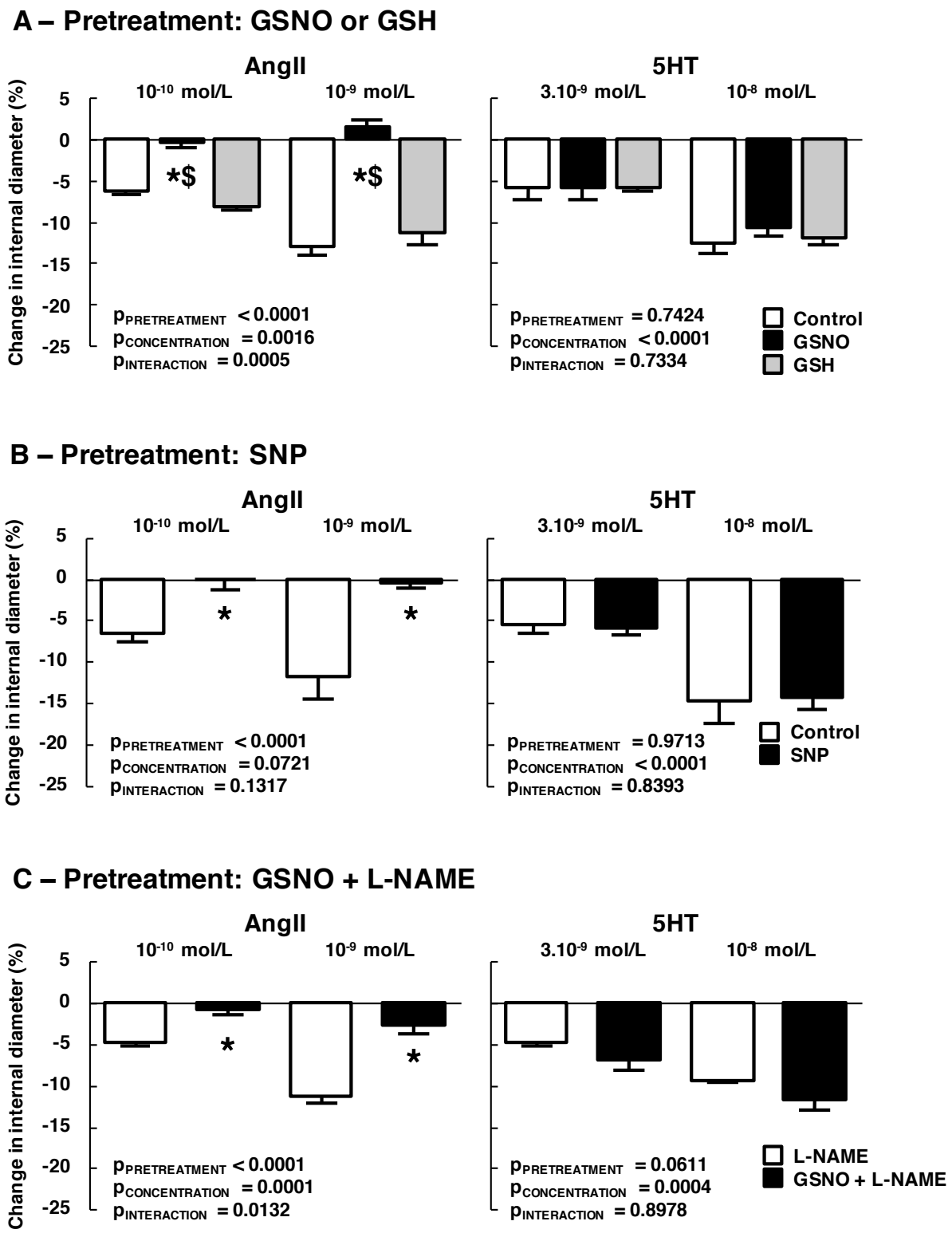


Fig. 4. Exogenous NO brought by either GSNO or SNP is responsible for the loss of AngII-response rather than GSH or endogenous NO

In each panel, serotonin (5HT) served as positive control. (A) Middle cerebral arteries (MCA) were pretreated or not with *S*-nitrosoglutathione (GSNO, 2.10^{-6} mol/L, 30 min) or glutathione

(GSH, 2.10^{-6} mol/L) followed by a 1-hour washout. (B) MCA were pretreated or not with sodium nitroprusside (SNP, 2.10^{-6} mol/L, 30 min) followed by a 1-hour washout. (C) MCA were pretreated or not with GSNO followed in presence by a 1-hour washout in presence of N_{ω}-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} mol/L) throughout the experiment. Changes in internal diameter (%) are expressed as means ± SEM. Two-way ANOVA (pretreatment, concentration) were used to calculate p values; *: $p<0.05$ *vs* unexposed; $: $p<0.05$ *vs* GSH (Bonferroni post-test). n = 5 middle cerebral arteries per condition.

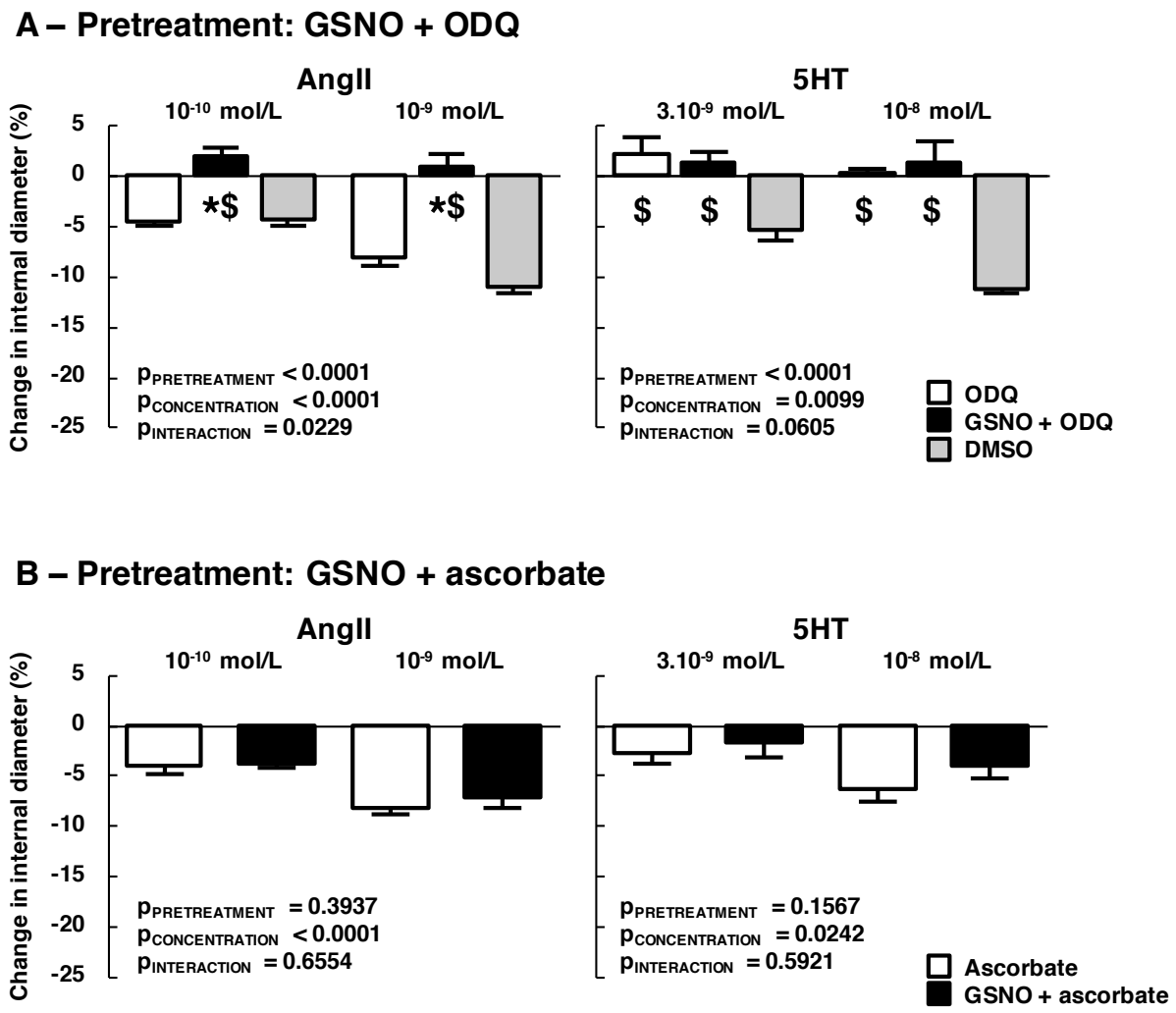


Fig. 5. The effect of GSNO is independent of sGC activity as it is mediated by *S*-nitrosation

(A) MCA were pretreated or not with GSNO followed by a 1-hour washout, then [1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10^{-5} mol/L) was added throughout the experiment. Dimethyl sulfoxide (DMSO, *i.e*. ODQ solvent, was used as control). (B) After pretreatment or not with GSNO, MCA were exposed to sodium ascorbate (5.10^{-6} mol/L, 20 min) to specifically reduce the *S*-NO bounds, followed by a 40 min washout. As ascorbate alters the vasoactive responses to AngII and 5HT, control MCA underwent the same ascorbate washout after PSS (instead of GSNO) exposure. Changes in internal diameter (%) are expressed as means ± SEM. Two-way ANOVA (pretreatment, concentration) were used to calculate p values; *: $p<0.05$ *vs* unexposed; $: $p<0.05$ *vs* DMSO (Bonferroni post-test). n = 3 to 5 middle cerebral arteries per condition.

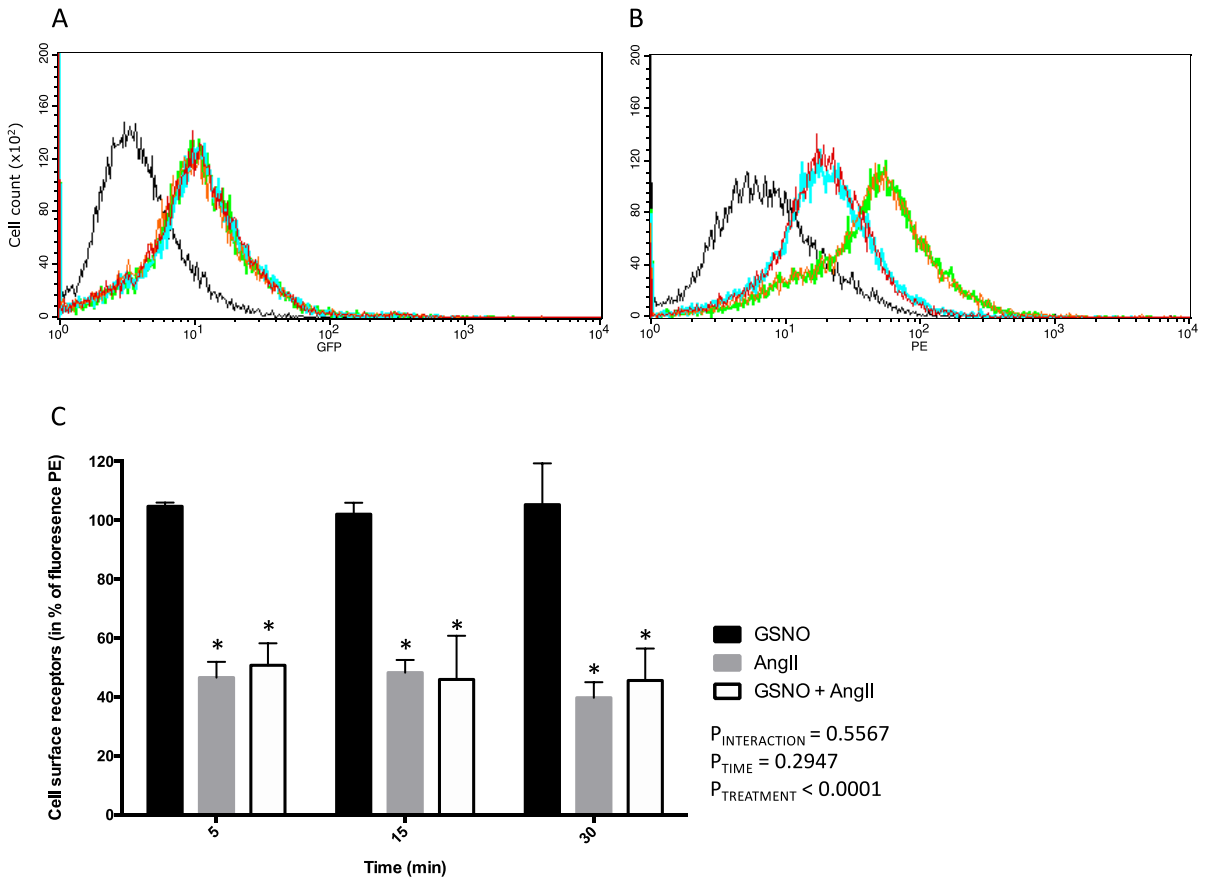


Fig. 6. GSNO does not modify AT_1-internalization kinetics or amplitudes

Cell Surface EGFP-AT_1 receptors were evaluated by fluorescence-activated cell sorting using anti-GFP antibodies and secondary phycoerythrin-labeled antibodies (PE). (A) Cellular GFP or (B) cellular PE fluorescence intensities of non-transfected HEK cells (black line) and EGFP-AT_1 cells (green line) or EGFP-AT_1 cells activated with either AngII (30 min,10^{-9} M - blue line), GSNO (30 min,2.10^{-6} M - orange line) or GSNO (30 min, 2.10^{-6} M) together with AngII (30 min,10^{-9} M - red line). (C) variation of EGFP-AT_1 cell surface receptors normalized *vs* non activated EGFP-AT_1 cells. Variation of cell surface receptors are expressed as means ± SEM of the mean fluorescence of PE. Two-way ANOVA (time, treatment) were used to calculate p values; *: $p<0.05$ *vs* GSNO (Bonferroni post-test). n = 2 separate determinations, 4 points per conditions.

SUPPLEMENTAL FIGURES

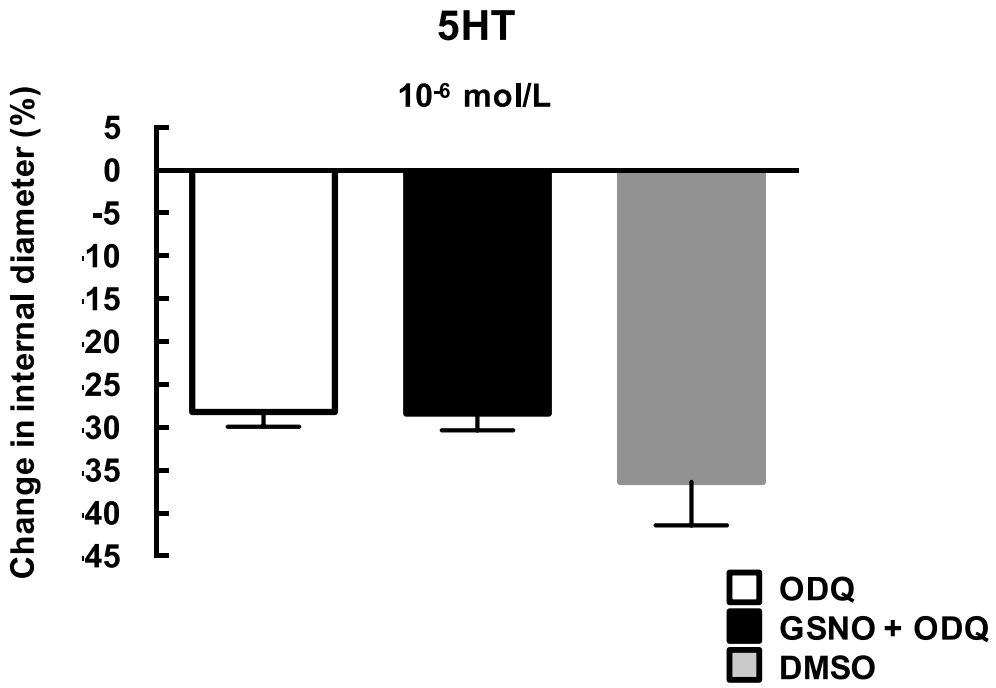


Fig. I. Effect of ODQ and DMSO on serotonin vasoconstriction

MCA were pretreated or not with GSNO and 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10^{-5} mol/L) was added throughout the experiments. Dimethyl sulfoxide (DMSO, *i.e*. ODQ solvent, was used as control). Changes in internal diameter (%) are expressed as means ± SEM. Two-way ANOVA (pretreatment, concentration) were used to calculate p values; *: $p<0.05$ *vs* unexposed; $: $p<0.05$ *vs* DMSO (Bonferroni post-test). n = 3 to 5 middle cerebral arteries per condition.

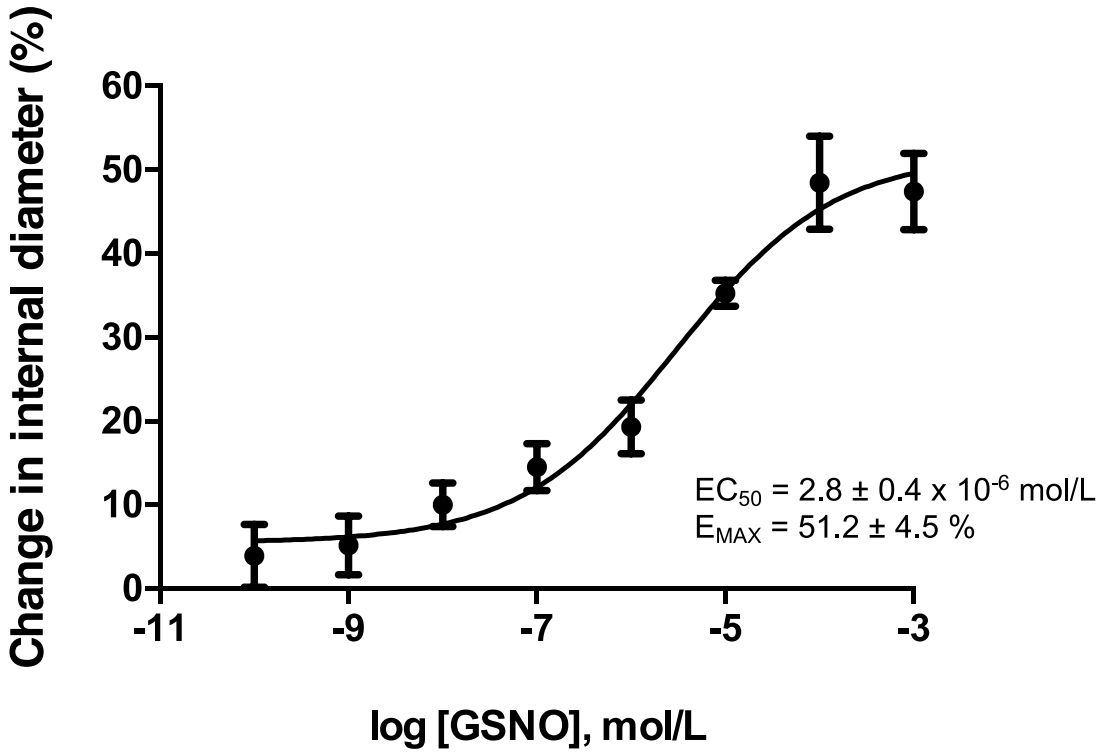


Fig. II. Concentration response curves to *S*-nitrosoglutathione

Concentration-response curves, half maximal effective concentration (EC_{50}) and maximal effect (E_{max}) in response to *S*-nitrosoglutathione (GSNO) of middle cerebral arteries isolated from Wistar rats.

Fitting to Hill's logistic equation was used. Values for EC_{50} (mol/L) and E_{max} (%) are expressed as means ± SEM. n = 6 middle cerebral arteries.

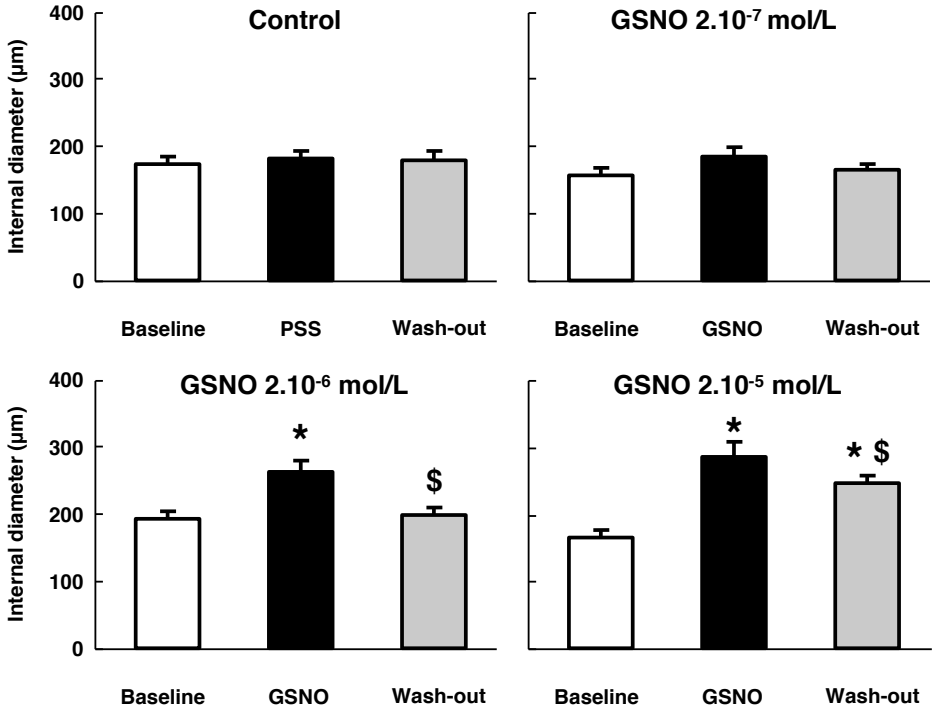


Fig. III. Impact of *S*-nitrosoglutathione (GSNO) pretreatment on internal diameter

Internal diameters of rat middle cerebral arteries were measured before (baseline, open bars), after 30 min of exposure to GSNO (2.10^{-7} mol/L, 2.10^{-6} mol/L or 2.10^{-5} mol/L) or physiological salt solution (PSS (for controls, full bars) and following the on-hour wash-out (grey bars). *: $p<0.05$ *vs* baseline; $: $p<0.05$ *vs* GSNO (paired Student's t-test). Values are expressed as means ± SEM. n = 4-9 middle cerebral arteries per condition.

3) Perspectives

Nos résultats montrent que le GSNO bloque à la fois la réponse Ang II-dépendante (vasoconstriction) et Ang II-indépendante (TM). Pour la vasoconstriction, le GSNO et le SNP semblent agir spécifiquement sur AT_1 car d'autres vasoconstricteurs partageant (Phe, U46619) ou non (5HT) sa voie de signalisation ne sont pas affectés. Pour le TM, nos résultats concordent avec ceux de la littérature car l'inhibition d'AT_1 par le losartan diminue le TM. Le GSNO entraine une diminution plus grande du TM comparée au losartan seul. Cependant l'addition de losartan au GSNO ne fait pas plus varier le TM suggérant que la partie AT_1 était déjà bloquée. La diminution du TM est plus grande avec GSNO qu'avec losartan seul. Nous ne pouvons pas exclure que le GSNO module, par nitrosation, la réponse d'autres RCPG impliqués dans le TM.

Nous avons ensuite montré que l'effet du GSNO était bien dû à une libération de NO. L'utilisation de GSH n'a pas modifié la réponse à l'Ang II, excluant ainsi une action antioxydante du GSNO. De plus nous avons obtenu des résultats similaires avec un autre donneur de NO, le SNP. Enfin nous avons exclu l'implication du NO endogène car l'utilisation de L-NAME (inhibiteur de la eNOS) n'a pas prévenu l'effet du GSNO.

De plus, comme le NO peut médier son effet soit pas nitrosylation soit par nitrosation, nous avons étudié ces deux voies. L'inhibition de la GCs n'a pas prévenu l'effet de GSNO. Cependant l'utilisation d'ascorbate (qui réduit les liaisons S-NO) a permis de restaurer la vasoconstriction à l'Ang II. Ainsi, l'ensemble de ces résultats pointe donc vers une nitrosation du récepteur AT_1.

Enfin, nous avons étudié l'internalisation d'AT_1. Nos résultats montrent que le GSNO ne modifie pas l'expression d'AT_1 à la surface des cellules et n'empêche pas son internalisation. Ces résultats montrent donc que la voie G_q d'AT_1 est impactée par la nitrosation mais pas la signalisation dépendante de la β-arrestine. Cela pourrait s'expliquer par une modification conformationnelle du récepteur. En effet, il a été proposé par Cabana que l'activation de la voie $G_{q/11}$ entrainait un réarrangement du récepteur et en particulier du 7ème DTM. Cependant l'activation de la voie β-arrestine semble liée à la conformation basale du récepteur (Cabana *et al*. 2015). Il a été montré par Leclerc que la cystéine 289 située sur le 7ème DTM pouvait être

nitrosée et qu'elle diminue l'affinité de l'Ang II pour le récepteur (Leclerc *et al*. 2006). De ce fait une modification de cette cystéine pourrait empêcher le récepteur de passer dans sa conformation active pour la voie $G_{q/11}$, expliquant ainsi l'abolition de la vasoconstriction.

L'ensemble de nos résultats suggère que l'exposition d'ACM à un donneur de NO entraine une *S*-nitrosation du récepteur AT_1. Il faudrait cependant confirmer nos résultats en identifiant la (ou les) cystéine(s) nitrosée(s).

Nous avons fait plusieurs essais afin d'identifier les cystéines nitrosées dans des modèles de CML vasculaires de rat et de microvaisseaux cérébraux. Nous ne disposons pas d'assez de tissus pour réaliser les essais directement sur les ACM. Nous avions montré par une technique de biotine switch (*i.e.* méthode permettant la détection de protéines nitrosées) qu'après exposition au GNSO, AT_1 est retrouvé parmi les protéines nitrosées. Cependant cette technique nécessite l'utilisation d'anticorps anti-AT_1, nous avons donc écarté ces résultats pour passer à une technique de spectrométrie de masse. Cette technique ne nous a pas permis d'identifier AT_1 par manque de sensibilité. En effet AT_1 est peu exprimé par rapport aux protéines membranaires comme l'actine. Son signal est donc perdu dans le bruit de fond. Nous avions essayé d'extraire les protéines membranaires, cependant même après ce protocole, l'actine restait la protéine majoritaire.

Pour identifier les protéines nitrosées, nous pourrions utiliser le modèle d'expression hétérologue EGFP-AT_1. Il serait envisageable de réaliser une immunoprécipitation avec un anticorps anti-GFP, afin de concentrer les récepteurs. Puis de le visualiser en spectrométrie de masse.
Une autre perspective serait d'utiliser un modèle génétiquement modifié dans lequel les cystéines des récepteurs AT_1 et AT_2 seraient substituées par des acides aminés dépourvus de fonction thiol comme les sérines ou les alanines. Cela nous permettrait de prévenir la nitrosation de ces deux récepteurs et d'étudier ensuite les conséquences d'une exposition à un donneur de NO.

Enfin, notre étude s'est intéressée principalement aux conséquences de la nitrosation sur les fonctions vasomotrices des récepteurs de l'Ang II. Il serait intéressant d'aller étudier l'impact du NO sur les autres fonctions des récepteurs : prolifération, angiogenèse, apoptose…

Au vu de nos résultats nous avons décidé de poursuivre notre étude en explorant trois autres pistes. Tout d'abord nous avons étudié l'impact du GSNO spécifiquement sur des protéines impliquées dans la voie de signalisation d'AT_1. Nous nous sommes ensuite intéressés à la vasodilatation AT_2-dépendante. Enfin nous avons évalué l'impact de la nitrosation dans un modèle de rats hypertendus.

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés ci-après.

III. Impact de la *S*-nitrosation sur les effecteurs de la voie de signalisation d'AT_1

1) Introduction

Nous avons précédemment montré que l'exposition d'ACM à un donneur de NO diminue les réponses médiées par AT_1, la vasoconstriction et le TM. Nos résultats suggèrent que l'altération se fait directement au niveau du récepteur et non au niveau de sa voie de signalisation. En effet la vasoconstriction d'autres récepteurs couplés à $G_{q/11}$ (thromboxane A2, phénylephrine) n'est pas diminuée par le GSNO.

Afin de confirmer cette hypothèse nous avons voulu étudier l'impact de la nitrosation sur la voie de signalisation d'AT_1. Certaines protéines de cette voie, notamment RhoA, voient leurs activités diminuées par la nitrosation (Zuckerbraun *et al*. 2007 ; Lin *et al*. 2018).

Nous nous sommes intéressés à deux protéines situées en amont (PLCγ1) et en aval (MYPT) de RhoA, dont l'activation se fait par une phosphorylation (*cf* Figure 13, p65).

2) Démarche expérimentale

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr N. Mercier de l'UMR INSERM 1116 (Nancy, France).

Comme précédemment mentionné, le peu de matériel disponible sur les ACM ne nous a pas permis de conduire l'étude directement sur les artères. Nous avons utilisé un modèle de CML vasculaires aortiques primaires de rat. Ce modèle est classiquement utilisé pour étudier la phosphorylation des protéines impliquées dans les voies de signalisation d'AT_1 (Bregeon *et al*. 2009 ; Guilluy *et al*. 2010 ; Kirabo *et al*. 2011).

Le protocole que nous avons utilisé est basé sur celui décrit dans l'étude de Guilluy (Guilluy *et al*. 2010). Les CML ont été extraites à partir d'aortes de rats Wistar (normotendus) par digestion enzymatique et cultivées dans un milieu DMEM/F12 (Gibco-31330) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 5% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Les cellules ont été exposées au GSNO (1h, 37°C, 10^{-3} mol/L) en présence ou non de losartan (10^{-6} mol/L). Après un rinçage les cellules ont ensuite été exposées à de l'Ang II (1h, 37°C, 10^{-7} mol/L), là encore en présence ou non de losartan (10^{-6} mol/L). L'ensemble des expérimentations ont été conduites sur des cellules à passages précoces (entre p2 et p4).

La stimulation des CML avec de l'Ang II induit une phosphorylation de PLCγ1 et MYPT. L'utilisation de losartan (antagoniste d'AT_1) doit donc inhiber l'activation de ces protéines et ainsi diminuer leurs phosphorylations. Nos résultats obtenus sur les ACM montre que le GSNO agit spécifiquement sur AT_1 et n'a pas d'impact sur d'autres récepteurs partageant la même voie de signalisation. Ainsi, notre hypothèse était que le prétraitement des cellules avec du GSNO inhiberait l'activité d'AT_1 empêchant ainsi la phosphorylation de PLCγ1 et MYPT (Figure 26, p147).

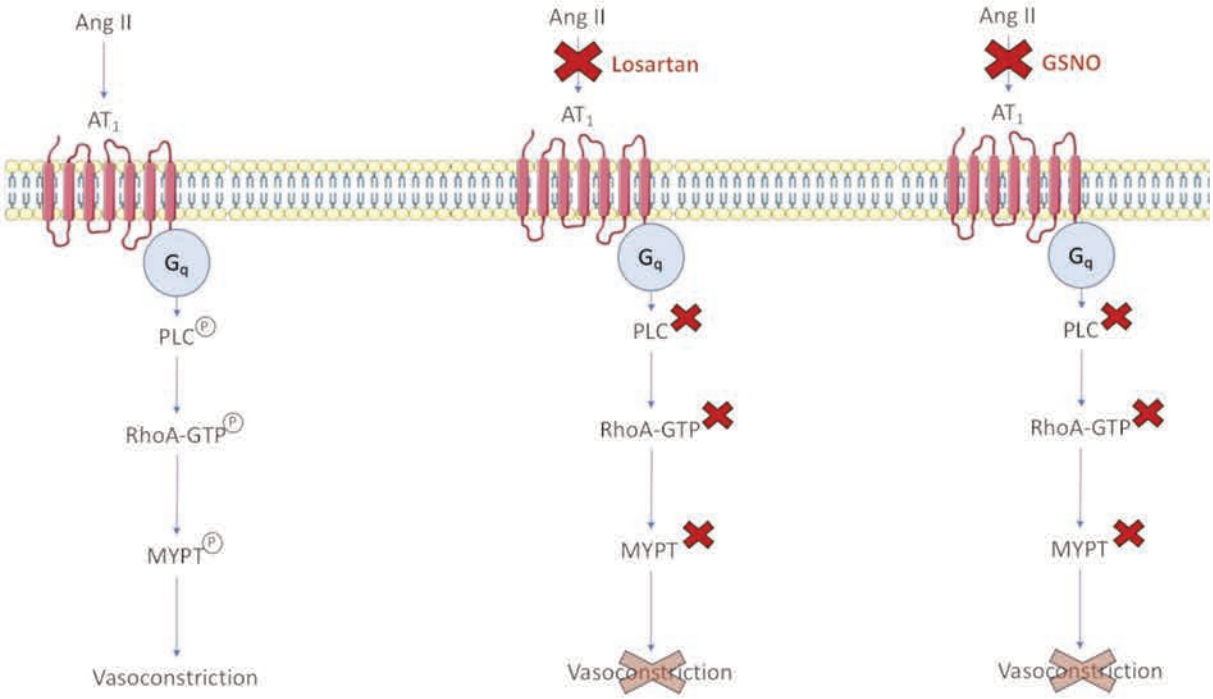


Figure 26 : Variations attendues des phosphorylation de PLCγ1 et MYPT suite au prétraitement avec du losartan ou du GSNO (Ang II : angiotensine II ; AT_1 : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; GSNO : *S*-nitrosoglutathion ; G_q : protéine G_q ; GTP : guanosine triphosphate ; MYPT : sous unité régulatrice de la phosphatase des chaînes légères de la myosine ; PLC : phospholipase C ; RhoA : Ras homolog gene family member A)

Les lysats cellulaires obtenus (par lyse chimique, en présence d'antiphosphatases et d'antiprotéases) ont été analysés en Western blot pour observer les variations de phosphorylation de PLCγ1 et MYPT. Pour les premiers essais, nous avons fait migrer 20 et 50 µg de protéines sur des gels de polyacrylamide (7,5% TGX Stain Free ; 1,5 mm ; Biorad), avant de réaliser un transfert (2,5A ; 25V ; 10min ; Trans-Blot Turbo Transfer System, Biorad) sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (Mini PVDF Transfer Packs, Biorad). Les membranes ont été exposées à un anticorps anti-phospho-PLCγ1 (dilué au 1/500^e dans du TBST 5% BSA) ou anti-phospho-MYPT (dilué au 1/100^e dans du TBST 5% BSA), toute la nuit à 4°C. Après la révélation, les membranes ont été désorbées puis exposées aux anticorps anti-PLCγ1 (dilué au 1/1000^e dans du TBST 5% BSA), anti-MYPT (dilué au 1/200^e dans du TBST 5% BSA) et anti-actine (dilué au 1/1000^e dans du TBST 5% lait) toute la nuit à 4°C.

La visualisation s'est faite par chimiluminescence (Clarity Western ECL Blotting Substrates, Biorad) à l'aide du logiciel ImageQuant™ (ImageQuant™, LAS 4000, GE Healthcare). Les résultats ont ensuite été quantifiés à l'aide du logiciel MultiGauge (MultiGauge, Fujifilm).

Nos résultats nous ont permis de visualiser les 5 protéines (p-PLCγ1, PLCγ1, p-MYPT, MYPT et l'actine) à partir de nos échantillons. Cependant après quantification, nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation nette de la phosphorylation de PLCγ1 et MYPT suite au traitement par Ang II (Figure 27). L'addition de GSNO et/ou losartan n'a pas permis non plus d'observer de modifications des réponses de phosphorylation. Au vu de ces résultats non satisfaisants, nous avons choisi de modifier notre protocole.

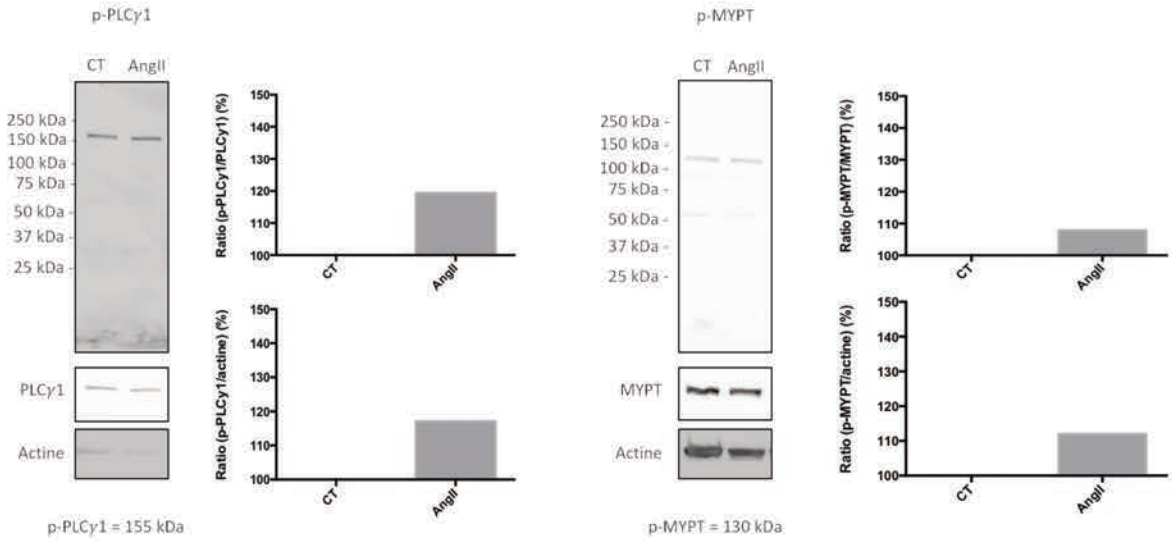


Figure 27 : Visualisation par western blot de la phosphorylation de PLCγ1 et MYPT après traitement par angiotensine II (AngII : angiotensine II ; CT : contrôle ; MYPT : myosin phosphatase target subunit ; PLCγ1 : phospholipase Cγ1)

Dans un second essai, les cellules ont été traitées avec de l'Ang II (10^{-7} mol/L) pendant différents temps : 0, 1, 3, 5, 15, 30 et 60 min. Après plusieurs essais (n=3), nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une augmentation de la phosphorylation avec le temps (Figure 28). Nous avons essayé d'augmenter la concentration d'Ang II à 10^{-6} mol/L. Aucun résultat satisfaisant n'a été obtenu.

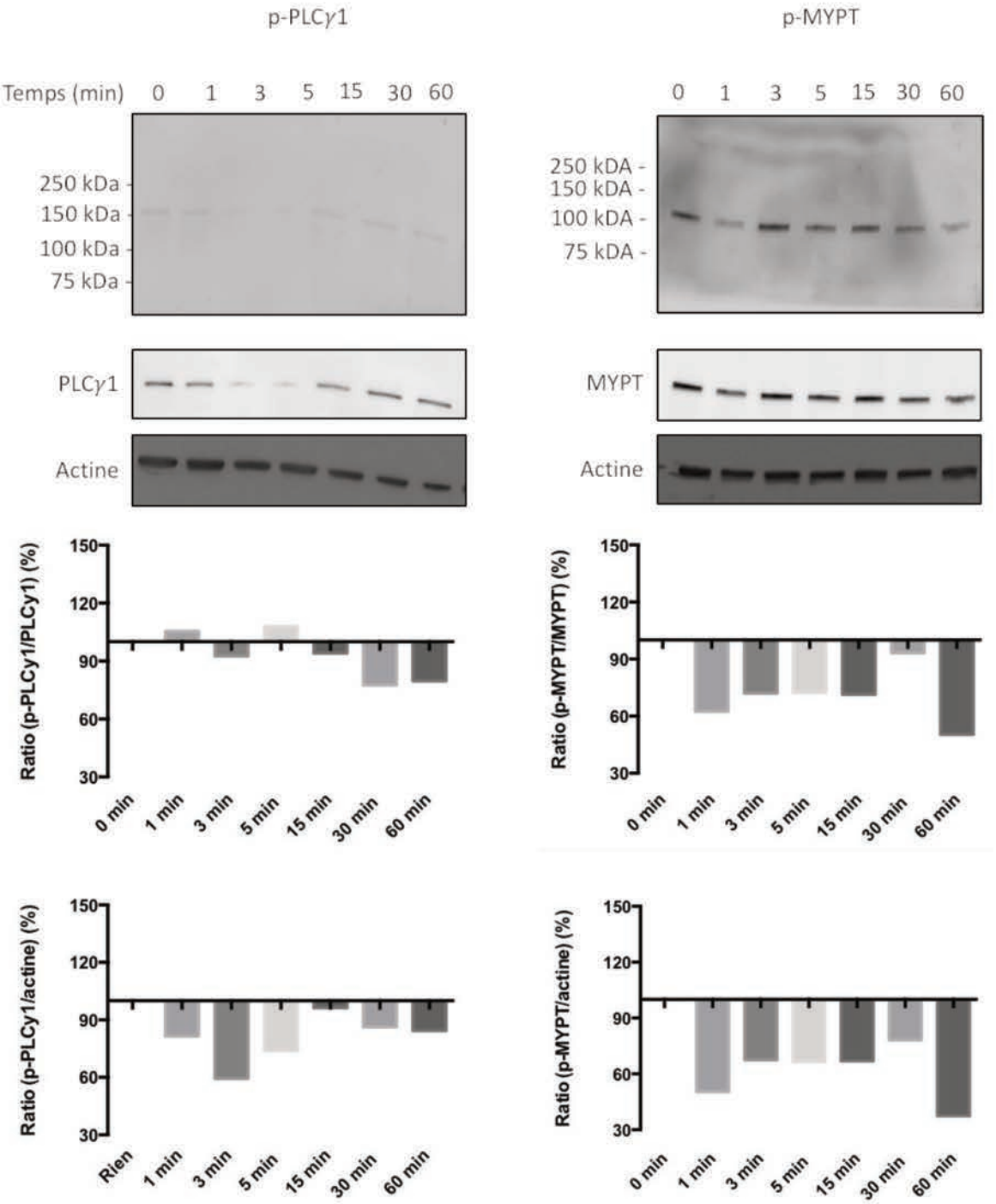


Figure 28 : Visualisation par western blot de la phosphorylation de PLCγ1 et MYPT après traitement à l'angiotensine II pendant différents temps

(MYPT : myosin phosphatase target subunit ; PLCγ1 : phospholipase Cγ1)

Suite à ces difficultés, nous avons choisi de changer de modèle et d'étudier la phosphorylation directement sur des artères cérébrales sur lesquelles les modifications de réponses induites par l'Ang II et/ou la nitrosation sont observables (*cf* article 3).

Afin d'étudier la phosphorylation directement sur les artères cérébrales, et afin d'augmenter la quantité de tissus, nous avons prélevé les artères cérébrales moyennes, postérieures et antérieures (n=6 artères/essai). Elles ont été traitées, immédiatement après prélèvement, dans les mêmes conditions que les artères utilisées pour la vasoréactivité (Ang II 10^{-9} mol/L) puis lysées. La migration des échantillons et le transfert se sont faits dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Dans ces échantillons nous n'avons pas réussi à visualiser les formes phosphorylées de PLCγ1 et MYPT.

3) Limites et perspectives

Bien que plusieurs études aient décrit les protocoles permettant la visualisation de la phosphorylation de protéines (Bregeon *et al*. 2009; Guilluy *et al*. 2010; Oh *et al*. 2012), nous n'avons pas été en mesure de reproduire ces résultats. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela.

Il est possible que nous n'arrivions pas à mettre en évidence une augmentation de la phosphorylation car la concentration d'Ang II utilisée est trop importante (10^{-7} mol/L vs 10^{-10} et 10^{-9} mol/L en vasoréactivité). Cette hypothèse est cependant peu probable. En effet nous avons traité les cellules avec une concentration d'Ang II de 0,1 µM qui est celle classiquement utilisée dans la littérature sur des cultures cellulaires (Guilluy *et al*. 2008; Bregeon *et al*. 2009; Guilluy *et al*. 2010).

La seconde hypothèse concerne la durée de traitement des cellules. En effet, sur ce point la littérature est plus disparate. Certaines études privilégient des temps de traitement courts (Ohtsu *et a*l. 2005; Oh *et al*. 2012, 2013). Ohtsu a notamment montré une diminution de la phosphorylation de MYPT après 20 min de traitement (Ohtsu *et al*. 2005). D'autres études ne vont pas dans le même sens en visualisant un maintien de la phosphorylation de MYPT même après 60 min de traitement (Guilluy *et al*. 2010; Kirabo *et al*. 2011; Carbone *et al*. 2015). Paradoxalement l'étude de Guilluy de 2008 montre un pic de phosphorylation de MYPT après 5 et 120 minutres de traitement (Guilluy *et al*. 2008).

Lors de nos premiers essais nous avions traité les cellules pendant 1 h avec de l'Ang II. La phosphorylation étant un phénomène réversible il est fort probable que nous n'ayons pas vu une augmentation de la phosphorylation pour cette raison. Cependant lors de notre deuxième essai, en testant plusieurs temps de traitement nous ne sommes toujours pas parvenu à mettre en évidence une variation.

Pour notre étude, nous avons ciblé deux protéines, l'une en amont de la voie de signalisation d'AT_1 (PLCγ1) et l'autre en aval (MYPT). Bien que l'étude de MYPT soit décrit dans la littérature, à l'inverse peu d'études se sont intéressées à la visualisation de PLCγ1 par Western blot, ce

qui suggère qu'il est complexe de visualiser des variations de sa phosphorylation (Harp *et al*. 1997 ; Haendeler *et al*. 2003).

En conclusion, il nous faudra donc déterminer les conditions optimales de traitement nécessaires pour visualiser des variations d'activation de PLCγ1 et MYPT après stimulation par l'Ang II avant de pouvoir évaluer l'impact de la nitrosation sur leur activation.

Une fois que nous aurons validé ce protocole, il nous sera possible d'étudier des protéines spécifiquement activées par AT_1, notamment Arhgef1 (Guilluy *et al*. 2010) (*cf* paragraphe Voies de signalisation p64).

IV. Impact de la *S*-nitrosation sur la vasodilatation AT_2-dépendante

1) Contexte et objectif

Les résultats présentés ci-dessus montrent que l'activité d'AT_1 peut être modulée par le NO, et que cela semble se faire par nitrosation. De plus, nous avons vu précédemment qu'AT_2 peut être nitrosé et que cela régule son adressage à la membrane et son interaction avec l'Ang II (Jang *et al*. 2015).

Dans ce contexte, nous avons voulu étudier l'impact de la *S*-nitrosation sur la vasodilatation médiée par AT_2. Pour ce faire nous avons utilisé un agoniste spécifique d'AT_2, le C21 (*cf* p73). L'acétylcholine (Ach) a été utilisée comme contrôle.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sont présentés ci-après.

2) Draft article 4, *S*-nitrosation decreases AT_2 mediated vasodilation of middle cerebral arteries in rats.

DRAFT ARTICLE 4

S-NITROSATION DECREASES AT_2 MEDIATED VASODILATION OF MIDDLE CEREBRAL ARTERIES IN RATS

Marie Lynda BOURESSAM[1] ; Caroline PERRIN-SARRADO[1] ; Sébastien FOULQUIER[2] ; Thomas UNGER[2] ; Isabelle LARTAUD[1] ; François DUPUIS[1]

[1] Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

[2] CARIM, School for Cardiovascular Diseases, Maastricht University, The Netherlands

Preliminary results

ABSTRACT

Background and Purpose. In cerebral vessels, angiotensin II (AngII) exerts a dual action. Angiotensin type 1 receptors (AT_1) induce vasoconstriction while angiotensin type 2 receptors (AT_2) induce vasodilation. *S*-nitrosation, a direct modification of cysteine residues by NO, was shown to modify the activity of both AT_1 and AT_2. We demonstrated that exposure of cerebral arteries to NO donors abolished AT_1-mediated responses. We hypothesized that *S*-nitrosation could modify as well AT_2-mediated vasodilation.

Methods. Concentration-response curves (internal diameter, ID (%) *vs* concentration) to Compound 21 (C21), a highly selective AT_2R agonist, and to acetylcholine (Ach), have been performed on isolated, perfused and pre-contracted middle cerebral arteries (MCA), from male normotensive Wistar rats. MCA have been submitted or not to a GSNO pre-treatment (30 min, 10^{-6} M) followed by a 1-hour washout which restored ID while maintaining *S*-nitrosation. AT_2 and Ach vasodilatations were studied with equiactives concentrations.

Results. Both C21 and Ach induced dose-dependent vasodilation on pre-contracted MCA. GSNO pretreatment decreases the AT_2-mediated vasodilation and shift Ach response to a vasoconstriction.

Conclusion. Further studies will reveal whether the observed effect is due to a *S*-nitrosation of AT_2 itself or to common signaling components shared with muscarinic receptors.

Key words: AT_2 receptor – *S*-nitrosation – Muscarinic receptor – Rat middle cerebral artery – Nitric oxide

INTRODUCTION

The renin angiotensin and nitric oxide (NO) systems are important contributors to the regulation of the cerebral circulation. In cerebral vessels, the stimulation of the angiotensin type 1 receptor (AT_1) by angiotensin II (AngII) induces vasoconstriction, while that of the AT_2 leads to vasodilation (Vincent et al. 2005). This subtle balance between AT_1 and AT_2 functions plays a major role in the regulation of the cerebral circulation (Budzyn et al. 2010; Dupuis et al. 2010).

The AT_1/AT_2 functional equilibrium appears to be finely tuned as changes in the cerebrovascular responses to AngII may be observed without any relation to changes in mRNA or protein expression of the AngII receptors (Stenman and Edvinsson 2004; Foulquier et al. 2011). For example, stroke increases the AT_1 mediated vasoconstrictor response to AngII in middle cerebral arteries (MCA), with potential deleterious consequences such as reduced perfusion in the marginal zone and impaired collateral blood flow, despite a reduction in AT_1 mRNA expression (Stenman and Edvinsson 2004).The decreased AT_2 vasodilation of cerebral arterioles induced by high salt intake was not correlated with decreased mRNA or protein expression of AT_2 (Foulquier et al. 2011).

This suggests that the functional balance between AT_1 and AT_2 is not solely controlled by their protein and/or mRNA expression but that post-translational modifications may also be key regulators.

S-nitrosation(the covalent bound between NO and cysteine residues) of proteins is a post-translational modification involved in the regulation of the activity of many proteins (see the SNObase database for an exhaustive review, Zhang et al. 2012). For example, the responses of membrane receptors may be up- or downregulated by *S*-nitrosation: the glutamate receptor 6 (GluR6) of the hippocampal CA1 region is activation by *S*-nitrosation (Di et al. 2012) whereas, in rat pulmonary artery, *S*-nitrosation of the α_1-adrenergic receptor has been shown to reduce the α_1-vasoconstrictor effect (Nozik-Grayck et al. 2006).

Concerning AT_1, Leclerc et al. showed that short exposure to NO donors of cells over-expressing AT_1 receptor led to *S*-nitrosation of the AT_1 protein and decreased its affinity for AngII (Leclerc et al, 2006). Moreover, our previous data indicates that *S*-nitrosation specifically abolishes AT_1-mediated vasoconstriction on MCA (Bouressam et al., unpublished). To the best of our knowledge, only one paper reports the *S*-nitrosation of AT_2, which contributes to the receptor translocation to the plasma membrane (Jang et al. 2015). This suggest that *S*-nitrosation might increase AT_2 activity in response to AngII.

We thus investigates whether *S*-nitrosation has a relevant impact of the specific AT_2-mediated vasodilation under physiological conditions using MCA isolated from male Wistar rats. MCA were pretreated with S-nitrosoglutathione (GSNO, a NO-donor used to induce *S*-nitrosation as described by (Alencar et al. 2003) followed by 1-hour washout before exposure to a specific AT_2 agonist (Compound 21, C21) and acetylcholine (Ach) used as control.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement and animals

The experiments were conducted on 4-5-month-old male Wistar rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isles, France). They ate standard rat chow (A04, Safe, Villemoison-Epinay sur Orge, France) and drank water (Aqua-clear®, Culligan, Northbrook, USA) *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals in the respect of the 3 Rs' requirements for Animal Welfare. The project untitled "Nitro-Vivo" was positively evaluated by the regional ethical committee for animal experiments and approved by the French Ministry of Research (n°APAFIS#1614-2015090216575422v2).

Vasoactive experiments

Preparation of middle cerebral arteries

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbitone (100 $mg.kg^{-1}$, i.p.), heparinized (1000 $IU.kg^{-1}$, i.v.) and then sacrificed by decapitation. The brain was placed in a physiological salt solution (PSS) at 4°C (NaCl 119, $NaHCO_3$ 24, KCl 4.7, $MgSO_4$ 1.17, KH_2PO_4 1.18, $CaCl_2$ 1.6 and glucose 5.10^{-3} mol/L).

The first branch-free segment of the middle cerebral arteries (MCA) immediately proximal to the circle of Willis was dissected out and mounted on two glass micropipettes (diameter, 125–150 µm) in a small vessel arteriograph (model CH/1/AU/SH, Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA) and secured with silk thread (diameter, 20 µm, 2-0, 48mm, 2540, Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). The vessel was then pressurized (intraluminal pressure of 80 mmHg) and perfused (intraluminal flow rate of 100 $\mu L.min^{-1}$) with PSS at 37°C. Arteries were placed in an organ bath with PSS at 37°C gassed with 5% CO_2/95% O_2 (extraluminal flow rate of 10 $mL.min^{-1}$) for measurement of isotonic vasoconstriction and assessment of viability.

Following initial pressurization, arteries were allowed to recover their basal myogenic tone for 60 min. Baseline internal diameter (ID) was measured using a video dimension analyzer (V94, Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA); signals were digitized and stored with WinDataq DI 720 data acquisition software (Dataq Instruments, Akron, OH, USA). Viability of the MCA was then assessed with potassium chloride (KCl, 4.10^{-2} mol/L) added to the extraluminal bath. The contractile response rapidly reached a steady state and was measured

after 5 minutes of exposure. Responses were expressed as % change in ID from baseline ID (arteries showing less than 20% of contraction were excluded). Perfusion with KCl was followed by a 15-minute washout allowing ID to return to baseline.

Pretreatment with GSNO

After assessment of viability, MCA were exposed for 30 min to GSNO (2.10^{-6} mol/L) which increased ID. GSNO was then removed and the vessels submitted to a 1-hour washout-out period (PSS changed every 20 min adapted from (Alencar et al. 2003). According to Alencar et al. *S*-nitrosation of cysteine residues is maintained after the washout (Alencar et al. 2003).

Evaluation of AT_2-mediated vasodilation

In order to determine the equiactive concentrations of the various reagents used in the following experiments, concentration-response curves (ID (%) *vs* concentration) were realized using successive concentrations (5 minutes per concentration) from 10^{-13} to 10^{-6} M for C21, and 10^{-12} to 10^{-5} M for Ach. Specificity of C21 toward AT_2 was assessed by performing concentration-response curves in presence of AT_2 antagonist PD123319 (10^{-6} mol/L). Then, for the following series of experiments and in order to shorten the duration of the protocols, MCA were successively exposed to 2 equiactives concentration of C21 (10^{-10} and 10^{-9} mol/L) and Ach (10^{-8} and 10^{-7} mol/L). To visualize vasodilation MCA have been pre-contracted with KCl 4.10^{-2} mol/L.

Substances used

All reagents were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, USA), sodium pentobarbital from Sanofi-Aventis (Libourne, France) C21 was a kind gift from Vicore Pharma AB (Gottenburg, Sweden). GSNO was prepared extemporaneously as previously described (Parent et al. 2013). All manipulations and assays involving GSNO were performed under conditions of subdued light, in order to minimize light-induced degradation.

Statistical analysis

Vasoactive responses of the MCA were expressed as % changes in ID from the value measured during the washout preceding administration of the drug. Concentration-response curve to

vasoactive agents were built for each MCA and half maximal effective concentration (EC_{50}) was calculated using Hill's logistic equation:

$$\%ID\ change = E_{min} + (E_{max}-E_{min})/(1+10^{(logEC50-log(concentration)xHillslope)})$$

where E_{min} and E_{max} are minimal and maximal response reached in each concentration-response curve. The value of Hill slope for all experiments was 1.0±0.1. Then -logEC_{50} values (pD_2 values) were calculated.

For functional studies after pretreatments (PSS, GSNO) differences in the responses to C21 or Ach (mean ± sem) were determined by two-way ANOVAs (concentration, pretreatment) followed by a Bonferroni post-test ($p < 0.05$)

RESULTS

GSNO abolishes AT_2-mediated vasodilation and shifts Ach vasodilation to vasoconstriction

On pre-contracted middle cerebral arteries, both C21 and Ach induced vasodilation (E_{MAX} around 10% for both vasodilators). C21-mediated vasodilation was abolished in presence of AT_2 antagonist PD123319. The determination of the equiactive concentrations of C21 and Ach are based on concentration-response curves conducted in MCA (Fig. 1).

Figure 2 shows that the concentrations used for C21 and Ach induced equiactive dilatory responses of precontracted MCA unexposed to GSNO. Pre-exposure to GSNO abolished the response of MCA to C21 and switched the response to Ach into vasoconstriction.

DISCUSSION

The present results indicates that GSNO abolished AT_2-mediated vasodilation. Our previous data indicated that AT_1-induced vasoconstriction is also abolished by GSNO, however other vasoconstrictors sharing (phenylephrine, thromboxane A2 analog) or not (serotonin) its signalization pathway are not affected (Bouressam et al. unpublished).

In contrast to the inhibition of AT_1-mediated vasoconstriction, the decrease in AT_2-induced dilation is not specific as the vasodilator effect of Ach is also blocked by GSNO pretreatment. GSNO might induce the *S*-nitrosation of both AT_2 and Ach receptors. As Ach and AT_2 share the same transduction pathway to induce dilation (through activation of the endothelial NO synthase), GSNO might affects the activity of the downstream proteins rather than a specific effect on the AT_2. This does not exclude the possible *S*-nitrosation of other proteins recently identified to interfere with the AT_2 function, such as the Vasoconstriction-Inhibiting Factor (VIF), a potent endogenous cofactor of AT_2 (Salem et al. 2015).

The reversal of Ach response into vasoconstriction could be explained by a differential effect on the muscarinic receptor subtypes. The activity of the endothelial M_3 receptor subtype, involved in the dilatory response of cerebral vessels to Ach (Dauphin and Hamel 1990), may be blocked by GSNO pretreatment (either directly or by an indirect effect on the transduction pathway, as mentioned above), while that of the M_1 receptor (involved in the contractile response of cerebral arteries, (Dauphin et al. 1991) would remain unaffected, such as the serotonin, phenylephrine and thromboxane A2 analogue contractile responses (Bouressam et al. unpublished).

Further studies are required to decipher the underling mechanisms.

ABBREVIATION

Ach: Acetylcholine

AngII: Angiotensin II

AT_1: Angiotensin II type 1 receptor

AT_2: Angiotensin II type 2 receptor

C21: Compound 21

GSNO: *S*-nitrosoglutathione

ID: Internal diameter

MCA: Middle cerebral arteries

NO: Nitric oxide

PSS: Physiological saline solution

REFERENCES

Alencar JL, Lobysheva I, Chalupsky K, Geffard M, Nepveu F, Stoclet JC, Muller B. S- nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003;307:152-159

Budzyn K, Sobey CG, Drummond GR. Reduced cerebrovascular remodeling and functional impairment in spontaneously hypertensive rats following combined treatment with suboptimal doses of telmisartan and ramipril: is less really more? *J. Hypertens.* 2010;28:1384-1389

Dauphin F, Hamel E. Muscarinic receptor subtype mediating vasodilation feline middle cerebral artery exhibits M3 pharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 1990;178:203- 213

Dauphin F, Ting V, Payette P, Dennis M, Hamel E. Vasocontractile muscarinic M1 receptors in cat cerebral arteries: pharmacological identification and detection of mRNA. *Eur. J. Pharmacol.* 1991;207:319-327

Di JH, Li C, Yu HM, Zheng JN, Zhang GY. nNOS downregulation attenuates neuronal apoptosis by inhibiting nNOS-GluR6 interaction and GluR6 nitrosylation in cerebral ischemic reperfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;420:594-599

Dupuis F, Vincent JM, Liminana P, Chillon JM, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J. Effects of suboptimal doses of the AT1 receptor blocker, telmisartan, with the angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cerebral arterioles in spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens.* 2010;28:1566-1573

Foulquier S, Dupuis F, Perrin-Sarrado C, Maguin Gate K, Merhi-Soussi F, Liminana P, Kwan YW, Capdeville-Atkinson C, Lartaud I, Atkinson J. High salt intake abolishes AT(2)-mediated vasodilation of pial arterioles in rats. *J. Hypertens.* 2011;29:1392- 1399

Jang JH, Chun JN, Godo S, Wu G, Shimokawa H, Jin CZ, Jeon JH, Kim SJ, Jin ZH, Zhang YH. ROS and endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-dependent trafficking of angiotensin II type 2 receptor begets neuronal NOS in cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol*. 2015;110:21

Leclerc PC, Lanctot PM, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. S- nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *Br. J. Pharmacol.* 2006;148:306-313

Nozik-Grayck E, Whalen EJ, Stamler JS, McMahon TJ, Chitano P, Piantadosi CA. S-nitrosoglutathione inhibits alpha1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006;290:L136-143

Vincent JM, Kwan YW, Chan SL, Perrin-Sarrado C, Atkinson J, Chillon JM. Constrictor and dilator effects of angiotensin II on cerebral arterioles. *Stroke*. 2005;36:2691-2695

Salem S, Jankowski V, Asare Y, Liehn E, Welker P, Raya-Bermudez A, Pineda- Martos C, Rodriguez M, Munoz-Castaneda JR, Bruck H, Marx N, Machado FB, Staudt M, Heinze G, Zidek W, Jankowski J. Identification of the Vasoconstriction- Inhibiting Factor (VIF), a Potent Endogenous Cofactor of Angiotensin II Acting on the Angiotensin II Type 2 Receptor. *Circulation*. 2015;131:1426-1434

Stenman E, Edvinsson L. Cerebral ischemia enhances vascular angiotensin AT1 receptor-mediated contraction in rats. *Stroke*. 2004;35:970-974

Zhang X, Huang B, Zhang L, Zhang Y, Zhao Y, Guo X, Qiao X, Chen C. SNObase, a database for S-nitrosation modification. *Protein Cell*. 2012;3:929-933

FIGURES

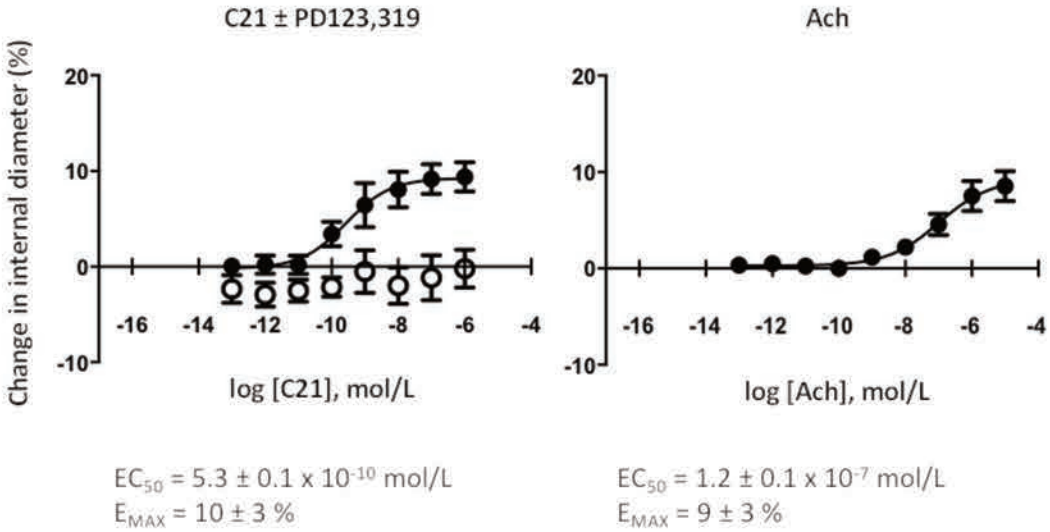


Fig. 1 Concentration-response curves in response to C21 and Ach

Concentration-response curves, half maximal effective concentration (EC_{50}) and maximal effect (E_{max}) values in response to C21 (in presence - *full symbol* - or not - *open symbol* - of PD123319 10^{-6} mol/L) and Ach. Arteries were precontracted (potassium 40 mmol/L), fitting to Hill's logistic equation was used. Values are expressed as means ± SEM. n = 6 middle cerebral arteries per curve.

Ach: acetylcholine ; C21 : selective AT_2 agonist ; PD123319 : AT_2 antagonist

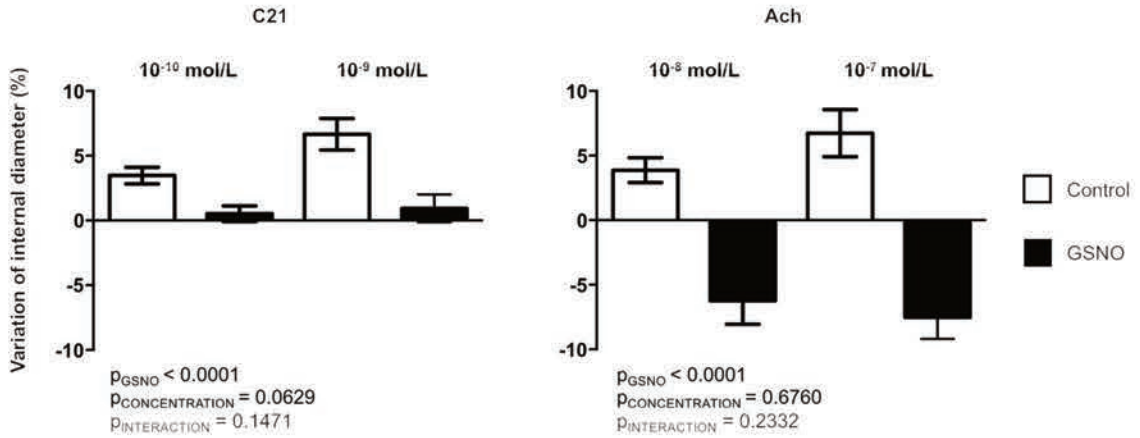


Fig. 2 GSNO abolishes AT_2 mediated vasodilation and shifts Ach vasodilation to vasoconstriction

Vessels were unexposed (open bars) or exposed (full bars) to *S*-nitrosoglutathione (2.10^{-6} mol/L, 30 min followed by 1 hour wash-out). Specific AT2-mediated vasodilation was assessed in precontracted arteries (potassium 40 mmol/L) in response to C21 and compared to Ach. Changes in internal diameter (%) are expressed as means ± SEM. Two-way ANOVA (GSNO, concentration) were used to calculate p values (Bonferroni post-test). n = 6 middle cerebral arteries per condition.

Ach: acetylcholine ; C21 : selective AT_2 agonist ; GSNO : *S*-nitrosoglutathione

3) Limites et perspectives

Nos résultats montrent que l'exposition à un donneur de NO abolie également vasodilatation AT_2-dépendante.

De plus, contrairement à AT_1, l'effet ne semble pas spécifique au récepteur car la vasodilatation médiée par l'acétylcholine (qui partage la même voie de signalisation qu'AT_2) est aussi abolie. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, il est possible que le NO nitrose à la fois AT_2 et les récepteurs de l'acétylcholine, entrainant ainsi une abolition de leurs réponses. Il est aussi possible que le NO nitrose des protéines de la voie de signalisation commune aux deux récepteurs. En effet, il a été montré que l'activité de la eNOS et la GCs pouvait être diminuée par *S*-nitrosation (Ravi *et al*. 2004 ; Mayer *et al*. 2009). Cela expliquerait la perte de vasodilatation pour les deux récepteurs (Figure 29).

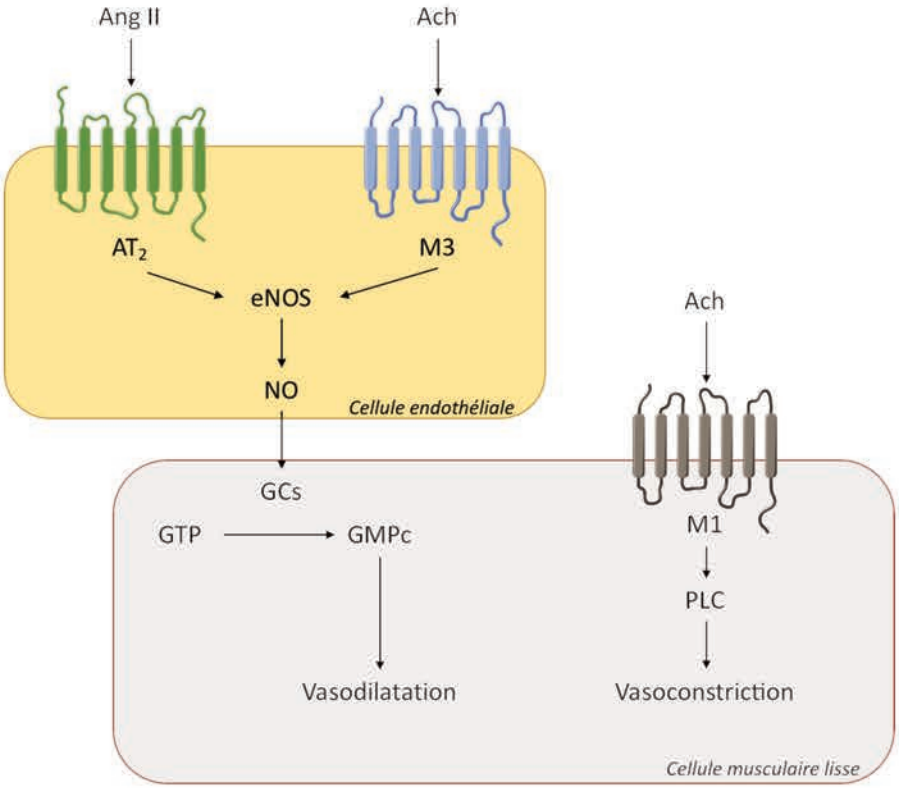


Figure 29 : Représentation des actions vasomotrices médiées par les récepteurs AT_2, M1 et M3

(Ach : acétylcholine ; Ang II : angiotensine II ; AT_2 : récepteur de type 2 de l'angiotensine II ; eNOS : NO synthase endothéliale ; NO : monoxyde d'azote ; GCs : guanylate cyclase soluble ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; GTP : guanosine triphosphate ; M1,M3 : récepteur muscarinique de type 1 et de type 3 ; PLC : phospholipase C)

Concernant l'Ach, au niveau des artères cérébrales, celle-ci se fixe à la fois sur les récepteurs muscariniques M_3, qui induisent une vasodilatation (Dauphin et Hamel 1990), mais aussi sur les récepteur M_1 responsables d'une vasoconstriction (Dauphin *et al*. 1991) (Figure 29). Ainsi, si le GSNO bloque la vasodilatation, la stimulation à l'Ach induit alors une vasoconstriction. Une des perspectives pourrait être d'étudier spécifiquement la réponse endothéliale, en utilisant des agonistes des récepteurs M_1. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier par quel(s) mécanisme(s) se fait l'action du NO pour abolir la vasodilatation (nitrosylation, nitrosation), en utilisant une approche pharmacologique similaire à celle décrite dans l'Article 3. Il serait cependant nécessaire d'adapter nos protocoles car l'utilisation d'antagonistes de la GCs ou de la eNOS pourrait avoir un effet direct sur la vasodilatation médiée par le C21.

Enfin, nous pourrions évaluer comme varie l'internalisation du récepteur suite à l'exposition à un donneur de NO.

V. Impact de la S-nitrosation sur la réponse fonctionnelle à l'angiotensine II dans un modèle physiopathologique d'hypertension artérielle

1) Contexte et objectifs

Nos résultats montrent que, dans un modèle physiologique, la nitrosation abolit les réponses médiées par AT_1 (vasoconstriction et TM) et AT_2 (vasodilatation). Pour la poursuite de ce travail, nous souhaitions vérifier si les résultats que nous avons obtenus pouvaient être reproduits dans un modèle physiopathologique.

Notre choix s'est porté sur une souche de rats hypertendus, car l'hypertension artérielle est largement reconnue comme un facteur favorisant la survenue des AVC.

Notre démarche expérimentale était la même que celle présentée précédemment. Les ACM de rats hypertendus (et de leurs contrôles normotendus) ont été exposées à un donneur de NO pendant 30 min. Après une heure de rinçage nous avons évalué l'impact sur la vasoconstriction à l'Ang II et à la 5HT.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sont présentés ci-après.

2) Draft Article 5, *S*-nitrosation decreases angiotensin II dependent vasoconstriction of middle cerebral arteries during hypertension

DRAFT ARTICLE 5

S-NITROSATION DECREASES ANGIOTENSIN II DEPENDENT VASOCONSTRICTION OF MIDDLE CEREBRAL ARTERIES DURING HYPERTENSION

Marie Lynda BOURESSAM ; Isabelle LARTAUD ; François DUPUIS

Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

Preliminary results

ABSTRACT

Background and Purpose. Renin angiotensin system and nitric oxide (NO) are major actors regulating the cerebral circulation. NO regulates angiotensin II (AngII) receptors through *S*-nitrosation (redox modification of cysteine residues). We previously demonstrated that *S*-nitrosation abolished AT_1-mediated vasoconstriction and myogenic tone. We evaluated herein the impact of AngII receptor nitrosation in a pathological model of hypertension, the spontaneously hypertensive rats.

Methods. Middle cerebral arteries (MCA) from male adult spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive controls (WKY) were immersed in a physiologic saline solution (PSS), perfused (100 µl/min) and pressurized (80 mmHg for WKY and 110 for SHR) in a small vessel arteriograph for 1 hour (baseline internal diameter, ID). MCA were submitted or not to pre-treatment with a NO-donor, *S*-nitrosoglutathione (GSNO, 30 min, 10^{-6} mol/L) followed by a 1-hour washout which restores ID while maintaining *S*-nitrosation. AngII and serotonin (5HT) were then administered. The impact of hypertension was assessed by comparing WKY and SHR with a 2-way ANOVA (strain, GSNO).

Results. Hypertension tended to increase the response of MCA to AngII (p_{strain}=0.0697). In WKY and SHR, *ex vivo* pretreatment with GSNO decreased the responses to AngII (p_{GSNO}=0.0013). Responses to 5-HT were similar in all groups.

Conclusion. In SHR and WKY middle cerebral arteries, *S*-nitrosation decreases AT_1 receptor mediated vasoconstriction. Further studies are needed to explore the underlying mechanisms.

Key words: AT_1 receptor – *S*-nitrosation – Spontaneous hypertensive rat - middle cerebral artery – Nitric oxide

INTRODUCTION

Many factors regulate the cerebral circulation among which the renin angiotensin system and nitric oxide (NO) are important contributors. The cerebrovascular angiotensin II (AngII) type 1 receptor (AT_1) plays a major role (Budzyn et al. 2010 ; Dupuis et al. 2010) as it is involved in both vasoconstriction (Vincent et al. 2005) and myogenic tone (Schleifenbaum et al. 2014). Pathological conditions, such as cerebral ischemia, increase the AT_1 mediated vasoconstrictor response to AngII, with potential deleterious consequences, such as reduced perfusion in the marginal zone and impaired collateral blood flow (Stenman and Edvinsson 2004). This increased AT_1 mediated vasoconstriction appears despite a reduction in AT_1 mRNA expression (Stenman and Edvinsson 2004). High sodium intake have also been reported to change cerebrovascular responses to AngII in the absence of any change in mRNA or protein expression (Foulquier et al. 2011), suggesting the involvement of post-translational modifications to regulate AngII receptors activity.

Among the numerous post-translational pathways involved into the regulation of protein functions, we hypothesized that *S*-nitrosation of the AT_1 receptor could be an important contributor. *S*-nitrosation (the covalent bound between NO and cysteine residues) of proteins is involved in the regulation of vascular tone (Stamler et al. 1992). Leclerc *et al*. reported that short exposure of cells over-expressing AT_1 receptors to NO donors led to *S*-nitrosation of the AT_1 receptor and decreases its affinity for AngII (Leclerc et al. 2006). Our previous data (Bouressam et al. unpublished) indicate that exposure to a NO donor regulates cerebrovascular angiotensin receptors. Indeed we identified that *S*-nitrosation abolishes both AT_1-mediated vasoconstriction and AT_1-myogenic tone in a physiological model.

Herein we evaluated whether a pretreatment with NO-donor aiming to induce *S*-nitrosation of AT_1 receptor has a relevant impact on its cerebrovascular function in pathophysiological conditions predisposing to stroke, such as hypertension (Sacco et al. 1997 ; Johansson 1999 ; O'Donnell et al. 2010). Middle cerebral arteries (MCA) isolated from spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive control Wistar Kyoto rats (WKY) were exposed *ex vivo* to a NO-donor, *S*-nitrosoglutathione (GSNO) before assessing AngII and serotonin (5-HT) mediated vasoconstrictions.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement and animals

The experiments were conducted on 4-5-month-old male Spontaneously Hypertensive rats (SHR) and their normotensive counterparts Wistar Kyoto (WKY) rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isles, France). They ate standard rat chow (A04, Safe, Villemoison-Epinay sur Orge, France) and drank water (Aqua-clear®, Culligan, Northbrook, USA) *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals in the respect of the 3 Rs' requirements for Animal Welfare. The project untitled "Nitro-Vivo" was positively evaluated by the regional ethical committee for animal experiments and approved by the French Ministry of Research (n°APAFIS#1614-2015090216575422v2).

Vasoactive experiments

Preparation of middle cerebral arteries

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbitone (100 $mg.kg^{-1}$, i.p.), heparinized (1000 $IU.kg^{-1}$, i.v.) and then sacrificed by decapitation. The brain was placed in a physiological salt solution (PSS) at 4°C (NaCl 119, $NaHCO_3$ 24, KCl 4.7, $MgSO_4$ 1.17, KH_2PO_4 1.18, $CaCl_2$ 1.6 and glucose 5.10^{-3} mol/L).

The first branch-free segment of the middle cerebral arteries (MCA) immediately proximal to the circle of Willis was dissected out and mounted on two glass micropipettes (diameter, 125–150 µm) in a small vessel arteriograph (model CH/1/AU/SH, Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA) and secured with silk thread (diameter, 20 µm, 2-0, 48mm, 2540, Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). The vessel was then pressurized (intraluminal pressure of 80 mmHg for WKY ; 110 mmHg for SHR) and perfused (intraluminal flow rate of 100 $\mu L.min^{-1}$) with PSS at 37°C. Arteries were placed in an organ bath with PSS at 37°C gassed with 5% CO_2/95% O_2 (extraluminal flow rate of 10 $mL.min^{-1}$) for measurement of isotonic vasoconstriction and assessment of viability.

Following initial pressurization, arteries were allowed to recover their basal myogenic tone for 60 min. Baseline internal diameter (ID) was measured using a video dimension analyzer (V94, Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA); signals were digitized and stored with

WinDataq DI 720 data acquisition software (Dataq Instruments, Akron, OH, USA). Viability of the MCA was then assessed with potassium chloride (KCl, 4.10^{-2} mol/L) added to the extraluminal bath. The contractile response rapidly reached a steady state and was measured after 5 minutes of exposure. Responses were expressed as % change in ID from baseline ID (arteries showing less than 20% of contraction were excluded). Perfusion with KCl was followed by a 15-minute washout allowing ID to return to baseline.

Pretreatment with GSNO

After assessment of viability, MCA were exposed for 30 min to GSNO (2.10^{-6} mol/L) which increased ID. GSNO was then removed and the vessels submitted to a 1-hour washout period (PSS changed every 20 min, adapted from Alencar) that allowed MCA ID to return to baseline (data not shown). According to Alencar, *S*-nitrosation of cysteine residues is maintained after the washout (Alencar et al. 2003b).

Evaluation of AngII and 5HT responses

Vessels were exposed for 5 min to AngII (10^{-10} and 10^{-9} mol/L), then to 5-HT (3.10^{-9}, 10^{-8} mol/L). Control MCA followed the same protocol but GSNO was replaced with PSS. These concentrations were determined by performing concentration response curves (data not shown ; Bouressam et al. unpublished).

Substances used

All reagents were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis USA), sodium pentobarbital from Sanofi-Aventis (Libourne, France). GSNO was prepared extemporaneously as previously described (Parent et al. 2013). All manipulations and assays involving GSNO were performed under conditions of subdued light, in order to minimize light-induced degradation.

Statistical analysis

Responses of the MCA to AngII and 5-HT were expressed as % change in ID from the value measured during the wash-out preceding drug administration. Differences in the WKY and SHR series were analyzed by a two-way ANOVA (strain, exposure to GSNO) followed by a Bonferroni post-test ($p<0.05$).

RESULTS

At 10^{-9} mol/L, AngII tends to increase vasoconstriction in SHR compared to WKY rats. Those results are in accordance with the literature (Endo et al. 1998; Touyz et al. 1999; Loiola et al. 2011). In both SHR and WKY, exposure to GSNO significantly decreases AngII-mediated vasoconstriction of MCA (Fig. 1, panel A), while no differences was observed for 5-HT-mediated vasoconstriction (Fig. 1, panel B).

DISCUSSION

These preliminary data indicates that in a pathophysiological model of hypertension, GSNO decreases AngII-mediated vasoconstriction. Those results are in accordance with those we obtained in a physiological model (Bouressam et al. unpublished).

Additional experiments are required to determine whether GSNO acts through *S*-nitrosation or nitrosylation. Moreover it would be interesting to evaluate whether GSNO specifically targets AT_1 receptors or acts on other receptors mediating vasoconstriction (*i.e.* α_1 adrenergic receptors, thromboxane A2 receptors…). Our previous data on Wistar rats indicate that *S*-nitrosation specifically abolishes Ang-II mediated vasoconstriction, while it has no effect on vasoconstrictors sharing (phenylephrine, thromboxane A2 analog) or not (5HT) its signalization pathway. The mechanisms involved should be evaluated in SHR using a similar approach than that used in our previous study on Wistar rats (GSH, SNP, L-NAME, ODQ, ascorbate, …).

Furthermore it would be interesting to assess AT_2 function in SHR. Indeed it has been described that hypertension shifts AT_2-mediated vasodilation to vasoconstriction in mesenteric arteries (You et al. 2005). Thus it would be relevant (i) to determine whether such phenomenon occurs on MCA, (ii) to evaluate the impact of NO on AT_2 responses.

Finally, it would be interesting to evaluate the effect of nitrosation on AT_1-mediated myogenic tone (*i.e*. contractile response of arteries consecutive to an increase of arterial pressure) in SHR. Indeed it has been recently demonstrated that AT_1 participates in myogenic tone, independently of its interaction with Ang II. Moreover myogenic tone is increased in SHR's MCA compared to WKY (Foulquier et al. 2014).

Specific abolition of AT_1-mediated vasoconstriction by *S*-nitrosation of the AT_1 receptor during hypertension could be interesting. Indeed treatment of hypertension involves angiotensin-converting enzyme inhibitors (and at a lesser extent angiotensin receptor blockers) which blocks AT_1-mediated vasoconstriction.

ACKNOWLEGMENTS

The authors thank Aurélie Bourcier and Mathilde Humbert for help with the vasoreactivity experiments.

ABBREVIATION

AngII: angiotensin II

AT_1: angiotensin II type 1 receptor

GSNO: *S*-nitrosoglutathione

5-HT: 5-hydroxytryptamine, serotonin

ID: internal diameter

MCA: middle cerebral arteries

NO: nitric oxide

PSS: physiological saline solution

SHR: spontaneous hypertensive rat

WKY: Wistar Kyoto rat

REFERENCES

Alencar JL, Lobysheva I, Chalupsky K, Geffard M, Nepveu F, Stoclet JC, Muller B. S- nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003;307:152-159

Budzyn K, Sobey CG, Drummond GR. Reduced cerebrovascular remodeling and functional impairment in spontaneously hypertensive rats following combined treatment with suboptimal doses of telmisartan and ramipril: is less really more? *J. Hypertens*. 2010;28:1384-1389

Dupuis F, Vincent JM, Liminana P, Chillon JM, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J. Effects of suboptimal doses of the AT1 receptor blocker, telmisartan, with the angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cerebral arterioles in spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens*. 2010;28:1566-1573

Endo Y, Arima S, Yaoita H, Tsunoda K, Omata K, Ito S. Vasodilation mediated by angiotensin II type 2 receptor is impaired in afferent arterioles of young spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.* 1998;35:421-427.

Foulquier S, Dupuis F, Perrin-Sarrado C, Maguin Gate K, Merhi-Soussi F, Liminana P, Kwan YW, Capdeville-Atkinson C, Lartaud I, Atkinson J. High salt intake abolishes AT(2)-mediated vasodilation of pial arterioles in rats. *J. Hypertens.* 2011;29:1392-1399

Johansson BB. Hypertension mechanisms causing stroke. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1999;26:563-565

Leclerc PC, Lanctot PM, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *Br. J. Pharmacol.* 2006;148:306-313

Loiola RA, Fernandes L, Eichler R, Passaglia Rde C, Fortes ZB, de Carvalho MH. Vascular mechanisms involved in angiotensin II-induced venoconstriction in hypertensive rats. *Peptides*. 2011;32:2116-2121

O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ, Mondo C, Damasceno A, Lopez-Jaramillo P, Hankey GJ, Dans AL, Yusoff K, Truelsen T, Diener HC, Sacco RL, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Weimar C, Wang X, Yusuf S; INTERSTROKE investigators. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*. 2010;376:112-123

Parent M, Dahboul F, Schneider R, Clarot I, Maincent P, Leroy P, Boudier A. A complete physicochemical identity card of S-nitrosoglutathione. *Curr Pharm Anal*. 2013;9:31-42

Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M, Easton JD, Feinberg WM, Goldstein LB, Gorelick PB, Howard G, Kittner SJ, Manolio TA, Whisnant JP, Wolf PA. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke*. 1997;28:1507-1517

Schleifenbaum J, Kassmann M, Szijártó IA, Hercule HC, Tano JY, Weinert S, Heidenreich M, Pathan AR, Anistan YM, Alenina N, Rusch NJ, Bader M, Jentsch TJ, Gollasch M. Stretch-activation of angiotensin II type 1a receptors contributes to the myogenic response of mouse mesenteric and renal arteries. *Circ. Res.* 2014;115:263-272

Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci*. U. S. A. 1992;89:444-448

Stenman E, Edvinsson L. Cerebral ischemia enhances vascular angiotensin AT1 receptor-mediated contraction in rats. *Stroke*. 2004;35:970-974

Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS, Schiffrin EL. Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension*. 1999;32:366-372

Vincent JM, Kwan YW, Chan SL, Perrin-Sarrado C, Atkinson J, Chillon JM. Constrictor and dilator effects of angiotensin II on cerebral arterioles. *Stroke*. 2005;36:2691-2695

You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2005;111:1006-1011

FIGURE

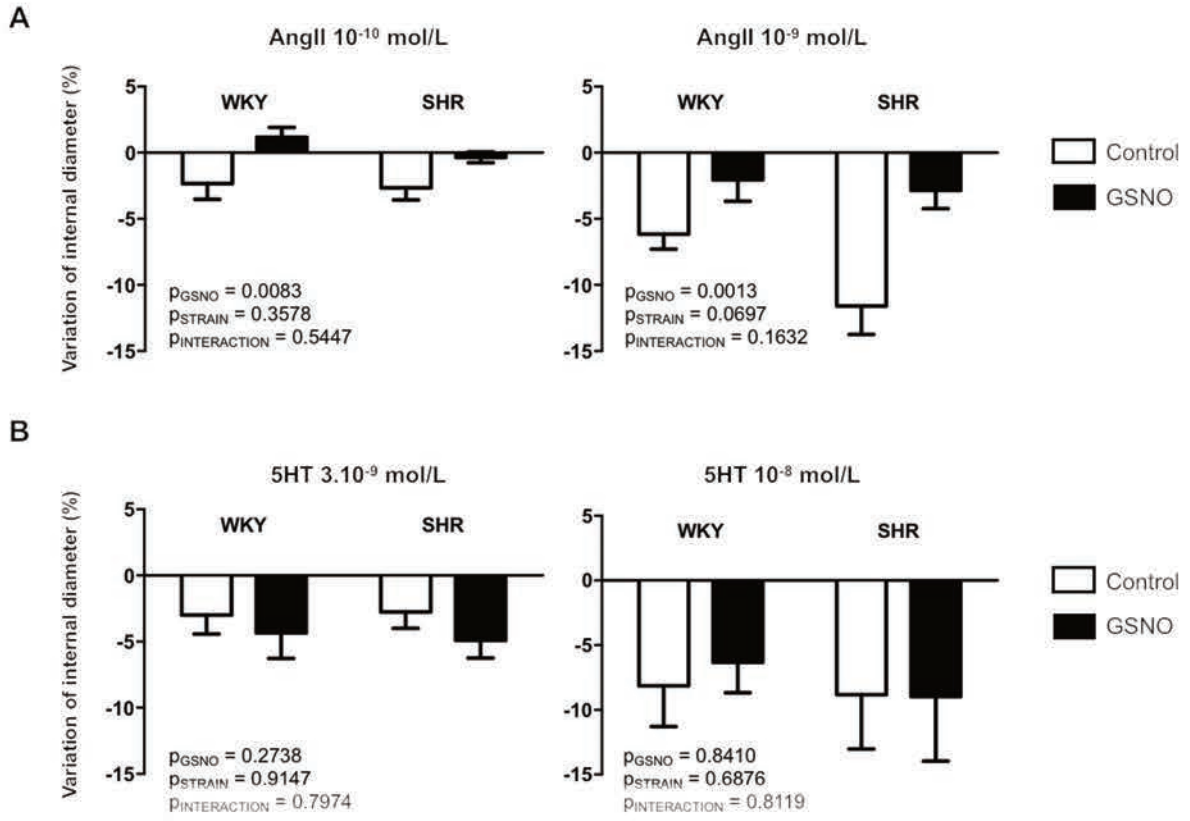


Figure 1: *Ex vivo* exposure to *S*-nitrosoglutathione decrease AngII-mediated vasoconstriction

Vasoconstriction of middle cerebral arteries from Wistar Kyoto (WKY) rats or Spontaneously Hypertensive rats (SHR) in response to (panel A) angiotensin II and (panel B) serotonin. Vessels were unexposed (open bar) or exposed (full bars) to *S*-nitrosoglutathione (2.10^{-6} mol/L), 30 min followed by 1-hour wash out.

Changes in internal diameter (%) are expressed as means ± SEM. Two-way ANOVA (GSNO, strain) were used to calculate p values; * : $p<0.05$ vs unexposed (Bonferroni post-test). n=3-6 middle cerebral arteries per condition.

AngII: angiotensin II ; GSNO: *S*-nitrosoglutathione ; 5HT: serotonin

3) Perspectives

Ces résultats préliminaires vont dans le même sens que ceux obtenus chez les rats normotendus. En effet l'exposition à du GSNO abolit la vasoconstriction médiée par l'Ang II. Par ailleurs, chez les rats SHR, la vasoconstriction médiée par l'Ang II semble augmenter. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature ayant déjà décrit ce phénomène (Endo *et al*. 1998 ; Touyz *et al*. 1999 ; Loiola *et al*. 2011). Afin de compléter notre étude plusieurs perspectives sont envisageables.

Tout d'abord il serait intéressant de réaliser des CCR complètes à l'AngII afin de vérifier si GSNO abolit toujours la réponse pour des concentrations élevées. De plus il faudrait étudier la vasoconstriction médiée par d'autres récepteurs couplés à $G_{q/11}$ afin de vérifier si, chez les SHR, l'abolition induite par le NO est spécifique à AT_1. Par ailleurs il serait intéressant d'étudier spécifiquement la réponse médiée par AT_2. En effet il a été montré, dans des artères mésentériques, que la vasodilatation AT_2-dépendante se transforme en vasoconstriction au cours de l'hypertension (You *et al*. 2005). Il nous faudrait donc étudier comment varie la réponse médiée par AT_2 au cours de l'hypertension dans les ACM, ainsi que l'impact du NO sur cette réponse.

Ensuite, il nous faudrait vérifier par quel mécanisme se fait l'action du NO. La signalisation du NO, et en particulier la voie NO/GCs/GMPc semble impactée au cours de l'hypertension. Des études ont montré que l'hypertension était associée à une augmentation de la nitrosation de la GCs et à son inactivation (Jacke *et al*. 2000; Crassous *et al*. 2012). De plus la vasodilatation médiée par l'Ach et le SNP est diminuée dans un modèle de souris hypertendues (Choi *et al*. 2011). Malgré une diminution de la signalisation *via* la voie NO/GCs/GMPc, dans nos conditions le GSNO abolit toujours la réponse à l'Ang II. Cela pourrait suggérer une action du NO *via* la nitrosation. Afin de vérifier cela, nous pourrions utiliser la même approche que celle décrite dans l'Article 3 en utilisant différents outils pharmacologiques (L-NAME, ODQ, ascorbate…).

De plus il serait pertinent d'étudier le TM chez les SHR. Tout d'abord pour évaluer comment varie le TM AT_1-dépendant au cours de l'hypertension, puis si le GSNO diminue la partie du

TM médiée par AT_1. Plusieurs études du groupe de Toth ont montré que le TM est augmenté dans les artères cérébrales au cours de l'hypertension (Toth *et al*. 2013a, c, b; Szarka *et al*. 2017). Des résultats similaires ont été obtenus par notre laboratoire au niveau d'ACM et d'artérioles cérébrales (*Foulquier *et al*. 2014).

Enfin il serait intéressant de corréler nos résultats sur la vasoconstriction avec des variations d'expression d'AT_1. En effet, des études ont montré, au niveau cérébral, une augmentation de l'expression d'AT_1 au cours de l'hypertension (Saavedra *et al*. 1982, 2011; Gutkind *et al*. 1988; Zhou *et al*. 2005, 2006).

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1) Principaux résultats et discussion générale

L'objectif des travaux présentés dans cette thèse était d'étudier la *S*-nitrosation des récepteurs de l'Ang II. Comme nous l'avons vu, le NO et le SRA sont largement décrits et étudiés dans la littérature, cependant en comparaison peu d'études se sont intéressées à l'interaction entre ces deux systèmes.

Le NO est majoritairement connu pour son rôle vasodilatateur et joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie vasculaire. Une diminution de sa biodisponibilité est associée à de nombreuses pathologies, c'est dans ce contexte qu'ont été développées les molécules donneuses de NO. Nous avons vu les différentes classes de donneurs de NO disponibles sur le marché ainsi que celles en développement.

Les RSNO semblent être une classe prometteuse grâce à leurs nombreux avantages : ils ont une demi-vie plus longue que les donneurs de NO actuellement utilisés, ils n'induisent pas de stress oxydant ou nitrosant et n'entraînent pas de phénomène de tolérance. Par ailleurs certains RSNO comme l'AlbSNO et le GSNO sont endogènes (Bauer et Fung 1991; Mathews et Kerr 1993; Miller *et al*. 2000).

Nous avons présenté dans la première étude publiée, l'évaluation *in vivo* et *in silico* d'un nouveau RSNO développé dans notre laboratoire, la $BUC(NO)_2$. Nos résultats mettent en avant que le choix du thiol portant la (ou les) molécule(s) de NO est primordial. En effet une simple augmentation de la charge de NO n'est pas forcement associée à une augmentation de l'effet.

Les RSNO sont sensibles à différents facteurs, notamment la température, la lumière, le pH ou encore les enzymes. Une des approches envisagée pour protéger les RSNO de la dégradation, est de les encapsuler. Notre équipe a développé plusieurs formulations permettant de protéger les RSNO et de contrôler leur libération (*Parent *et al*. 2013a, 2015; *Wu *et al*. 2015, 2016; *Shah *et al*. 2017).

En préclinique, l'utilisation de RSNO dans des modèles d'ischémie cérébrale semble prometteuse. Les travaux de Khan ont notamment montré que le GSNO, administré en intraveineuse à des doses non hypotensives, avait un rôle cérébroprotecteur après une ischémie/reperfusion (dans les 48 heures après l'AVC) (Khan *et al*. 2005, 2012). Par ailleurs, les travaux de notre laboratoire ont montré que l'administration de microparticules contenant du GSNO deux heures après l'AVC permettait de diminuer le déficit neurologique et de réduire le volume de l'œdème (*Parent *et al*. 2015).

L'équipe de Bath a piloté plusieurs études cliniques pour évaluer l'efficacité des donneurs de NO dans l'AVC mais les résultats restent conflictuels. En 1998, leur étude a montré que l'administration intraveineuse de SNP à des doses non hypotensives (dans la phase aiguë de l'AVC) inhibe l'agrégation plaquettaire et améliore le DSC (Butterworth *et al*. 1998). Par la suite ils ont étudié la réduction de la pression artérielle induite par des patchs transdermiques de trinitrine (Bath *et al*. 2001; Rashid *et al*. 2003; Willmot *et al*. 2006; Ankolekar *et al*. 2013). Les résultats de l'étude clinique ENOS (*cf* Tableau 1 p11) montrent un effet neutre des patchs de trinitrine sur les conséquences de l'AVC (Bath *et al*. 2015). Les auteurs émettent plusieurs hypothèses : (i) une baisse de la pression artérielle insuffisante (-7 mmHg *vs* groupe contrôle pour la pression artérielle systolique) ; (ii) une latence de traitement trop long (en moyenne 26 heures après la survenue de l'AVC) ; (iii) un développement d'une tolérance vis à vis de la trinitrine (Bath *et al*. 2015).

Le moment d'administration du donneur de NO semble primordial. En effet dans l'étude ENOS des bénéfices ont été observés pour les patients traités dans les 6 heures (Bath *et al*. 2015). Par ailleurs le choix du donneur de NO semble aussi important. Le développement d'un phénomène de tolérance réduit les effets sur la pression et diminue donc les chances d'avoir un effet bénéfique du traitement. Dans ce contexte les RSNO représentent une classe thérapeutique intéressante car ils n'induisent pas de phénomène de tolérance. En outre, dans des modèles précliniques, il a été montré que l'action bénéfique du GSNO ne passait pas que par son action sur la pression artérielle. En effet les travaux de Khan indiquent que le rôle cérébroprotecteur du GSNO est associé à sa capacité à nitroser des protéines (Khan *et al*. 2006, 2012).

Nous avons vu que le NO peut modifier l'activité de nombreuses protéines *via* la *S*-nitrosation (Zhang *et al*. 2012), notamment celle des RCPG (Daaka 2012). Parmi les RCPG, AT_1 et AT_2 ont été identifiés comme nitrosés (Leclerc *et al*. 2006; Jang *et al*. 2015). Nos travaux montrent que l'exposition d'ACM à un donneur de NO abolit la réponse AngII-dépendante et -indépendante.

Concernant la vasoconstriction (dépendante de l'AngII), nous avons vu que le NO altère spécifiquement la réponse d'AT_1 car d'autres vasoconstricteurs comme la Phe, le U46619 ou la 5HT ne sont pas affectés. Cela exclut une action du NO au niveau de la voie de signalisation d'AT_1. Ces résultats, spécifiques à AT_1, semblent se limiter au territoire cérébrovasculaire. En effet il a été montré que le GSNO inhibe la vasoconstriction médiée par la Phe, le U46619 et la 5HT au niveau pulmonaire et aortique (Nozik-Grayck *et al*. 2002; Alencar *et al*. 2003b, a; Nozik-Grayck *et al*. 2006; Sarr *et al*. 2007; *Perrin-Sarrado *et al*. 2017). D'ailleurs, dans ces tissus, l'abolition de la vasoconstriction Phe-dépendante pourrait être liée à une *S*-nitrosation des récepteurs α_1 (Nozik-Grayck *et al*. 2006).

Concernant la réponse Ang II-indépendante, le NO abolit la partie AT_1 dépendante du TM. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'il agisse aussi sur les autres mécanosenseurs. Il serait intéressant d'évaluer comment varie le TM médié par d'autres RCPG couplés aux protéines $G_{q/11}$ (Kauffenstein *et al*. 2012; Mederos Y Schnitzler *et al*. 2016).

Enfin, à l'aide d'outils pharmacologiques, nous avons montré que la régulation des récepteurs de l'Ang II par le NO, se faisait très certainement par *S*-nitrosation.

Différents outils sont décrits dans la littérature pour étudier les mécanismes d'actions du NO sur les vaisseaux isolés. En parallèle des études sur les ACM, notre laboratoire s'est aussi intéressé aux réponses aortiques après un prétraitement nitrosant par GSNO (revue en préparation comparant les réponses des ACM et des aortes).

D'autres études se sont intéressées à l'interaction SRA/NO et ont mis en évidence une régulation des récepteurs de l'Ang II par le NO. Une liste non exhaustive est présentée dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Principales études ayant évalué la régulation des récepteurs de l'angiotensine II par le monoxyde d'azote

Modèle	Source de NO	Concentration	Temps d'exposition	Effet	Référence
CMLV d'aortes thoracique et mésentériques	SNP, SNAP, ISDN	10 à 500 µM (SNP, SNAP) 5 et 10 mM (ISDN)	4 à 24 h	Diminution de la liaison de l'Ang II	(Cahill *et al*. 1995)
CMLV d'aorte thoracique	SNAP	100 à 300 µM	3 à 24 h	Diminution de l'expression génétique d'AT_1 Diminution de la liaison de l'Ang II	(Ichiki *et al*. 1998)
Cellules rénales cancéreuses de rat	SNP	500 µM	12 h	Diminution de l'expression génétique d'AT_2	(Bucher *et al*. 2001)
HUVEC	Force de cisaillement	N/A	1 à 24 h	Diminution de l'expression génique et protéique d'AT_1 Augmentation de l'expression protéique d'AT_2	(Ramkhelawon *et al*. 2009)
Cellules hypothalamiques	SNP	0,01 à 10 µM	24 h	Diminue de l''expression génique et protéique d'AT_1	(Sharma *et al*. 2012)

Études ayant évaluées la *S*-nitrosation d'AT_1 et d'AT_2

Modèle	Source de NO	Concentration	Temps d'exposition	Effet	Référence
Cellules HEK surexprimant AT_1	SNP	10 nM à 10 mM	5 à 30 min	Diminution de la liaison de l'Ang II, de la production d'IP_3 *S*-nitrosation d'AT_1	(Leclerc *et al*. 2006)
Cardiomyocytes	SNP	10 µM	30 min	*S*-nitrosation d'AT_2	(Jang *et al*. 2015)

(Ang II : angiotensine II ; $AT_{1,2}$: récepteur de type 1,2 de l'angiotensine II ; CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire ; HEK : human embryonic kidney ; HUVEC : human umbilical vein endothelial cell ; IP_3 : inositol trisphosphate ; ISDN : dinitrate d'isosorbide ; N/A : non applicable ; SNAP : *S*-nitroso-*N*-acétylpénicillamine ; SNP : nitroprussiate de sodium)

Certains travaux mettent en évidence une diminution de l'expression génique d'AT_1 suite à l'exposition à un donneur de NO. Cependant dans ces études le temps d'exposition et/ou la concentration en NO est souvent plus élevée que pour nos études. Dans l'étude d'Ichiki, une diminution de l'expression génique d'AT_1 a été observée dans des CML après 3 heures de traitement. Cependant les doses de SNAP utilisées étaient de 100 à 300 μM, contre 2 μM pour nos études (Ichiki *et al*. 1998). L'étude de Sharma a montré une diminution de l'expression génique d'AT_1 avec une dose de SNP proche de celle que nous avons utilisée (1 μM), cependant les cellules étaient traitées pendant 24 h, contre 30 min pour notre étude. Il serait toutefois intéressant de vérifier, au niveau des ACM, les variations d'expression génique d'AT_1 et d'AT_2 suite à l'exposition aux donneurs de NO. Nos résultats préliminaires montrent que le traitement de rats, *in vivo*, avec des microparticules contenant du GSNO (*cf* Paragraphe perspectives du projet - Évaluation de la nitrosation *in vivo*, p194) ne modifie pas l'expression génique d'AT_1 et d'AT_2.

D'autres études mettent en évidence un lien indirect entre le NO et les récepteurs de l'Ang II. En effet, les récepteurs aux œstrogènes régulent l'expression génique d'AT_1 *via* une production de NO (Nickenig *et al*. 1998, 2000).

Par ailleurs, il semble que le NO endogène puisse réguler les récepteurs de l'Ang II. Plusieurs études ont montré que l'inhibition de la production endogène de NO (*via* l'inhibition de la eNOS) augmente l'expression génique des récepteurs AT_1 (Usui *et al*. 1998; Katoh *et al*. 1998). Enfin, il a été montré, en conditions pathologiques, qu'une diminution de la biodisponibilité du NO est associée à une augmentation de l'activité du SRA.

Il est à noter que certaines de ces études ont mis en évidence une modification de l'expression protéique d'AT_1 en utilisant des anticorps (Ramkhelawon *et al*. 2009; Sharma *et al*. 2012) qui ont été décrits depuis comme non-spécifiques (Benicky *et al*. 2012; Herrera *et al*. 2013). L'aspécificité de ces anticorps représente un problème majeur auquel nous avons été confrontés. Notre étude (*cf* article 2) a confirmé l'aspécificité de l'anticorps polyclonal sc-1173, encore largement utilisé dans la littérature (Chao *et al*. 2017; Zhao *et al*. 2018; Ribeiro *et al*. 2018). De plus nous avons montré que le nouvel anticorps monoclonal sc-57038 n'est pas spécifique.

Au vu de ces résultats nous avons décidé de ne pas utiliser d'anticorps anti-AT_1 pour nos études. Nous avions montré par une technique de biotine switch (*i.e*. technique permettant l'identification des protéines nitrosées) que le GSNO permettait la nitrosation d'AT_1. Cette technique implique l'utilisation d'anticorps anti-AT_1, nous avons donc décidé de ne pas exploiter ses résultats.

2) Perspectives du projet

Identification de la nitrosation des récepteurs de l'Ang II

Le développement d'outils permettant l'identification des récepteurs de l'Ang II et l'évaluation de la nitrosation en conditions physiologiques constitue une des principales perspectives de ce projet. Plusieurs approches sont envisageables pour identifier la nitrosation des récepteurs AT_1 et AT_2.

Tout d'abord, en utilisant un modèle hétérologue d'expression d'AT_1 (EGFP-AT_1, *cf* articles 2 et 3), il nous serait possible d'exposer les cellules à un donneur de NO, puis d'isoler les récepteurs AT_1 en les immunoprécipitant à l'aide d'un anticorps anti-GFP, avant de les visualiser par spectrométrie de masse. Cette technique nous permettrait de vérifier, *in vitro*, si l'exposition à un donneur de NO entraine la nitrosation des récepteurs AT_1. Cette technique pourrait aussi être développée pour AT_2 en utilisant un plasmide EGFP-AT_2.

Une seconde approche envisageable serait d'utiliser un modèle murin transgénique exprimant le récepteur AT_1 ou AT_2 couplé à la GFP. Plusieurs équipes ont développé des modèles transgéniques exprimant un récepteur AT_1-GFP (Chen *et al*. 2012; Gonzalez *et al*. 2012) ou AT_2-GFP (de Kloet *et al*. 2016) au niveau cérébral. Ces modèles nous seraient particulièrement utiles pour visualiser les récepteurs de l'Ang II au niveau d'artères cérébrales. Dans ces modèles, nous pourrions isoler les récepteurs grâce à des anticorps anti-GFP, et évaluer la quantité de récepteurs nitrosés de manière endogène. Par ailleurs, nous pourrions aussi confirmer que l'exposition au GSNO entraine bien la nitrosation d'AT_1 et d'AT_2. La spectrométrie de masse nous permettrait de déterminer quelle(s) cystéine(s) est (sont) nitrosée(s).

Par ailleurs, les études menées par l'institut de Pharmacologie de l'université de Sherbrooke (Canada) se sont intéressées aux relations entre la structure d'AT_1 et son activité (Leclerc *et al*. 2002; Boucard *et al*. 2003; Cabana *et al*. 2013, 2015). Une collaboration avec ce laboratoire serait très intéressante pour identifier comment la liaison d'un groupement NO sur une cystéine d'AT_1 ou d'AT_2 peut modifier son activité.

Évaluation de la nitrosation in vivo

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse a été obtenu suite à une exposition directe, *ex vivo*, d'ACM à un donneur de NO. Une des perspectives du projet est d'étudier les réponses AT_1- et AT_2 dépendantes après une exposition *in vivo* à un donneur de NO.

Nous avons réalisé une étude préliminaire où des rats ont été traités *in vivo* pendant 48 h avec des microparticules contenant du GSNO. Le protocole de traitement est basé sur une précédente étude menée au laboratoire ayant montré que nos formulations permettent une libération de GSNO pendant minimum 42h (*Parent *et al*. 2015). Nous avons ensuite prélevé les ACM, et réalisé des CCR à l'Ang II. Nos résultats montrent un décalage de la courbe et une augmentation de l'EC_{50} (EC_{50} = 2.10^{-9} mol/L *vs* EC_{50} = 4.10^{-11} mol/L pour les microparticules vides). Nous n'avons pas observé de variation pour la vasoconstriction médiée par la 5HT (5HT 3.10^{-8} mol/L : GSNO, -28±3 *vs* -19±4 % pour les microparticules vides ; n=5 à 6 artère/condition). Ces résultats doivent cependant être complétés en réalisant des CCR complètes à la 5HT.

Par la suite il serait intéressant de démontrer si ce décalage de CCR à l'Ang II est associé à une nitrosation des récepteurs de l'Ang II.

Enfin, nos résultats préliminaires montrent que le diamètre de base des ACM n'est pas modifié suite au traitement avec les microparticules contenant du GSNO (157±3 *vs* 160±8 µm avec les particules vides). Il serait donc intéressant d'aller évaluer si, dans ces conditions, le GSNO a toujours un effet sur le TM AT_1-dépendant.

Évaluation de l'impact de la nitrosation dans des modèles pathologiques

Notre étude préliminaire menée chez des rats SHR montre que le GSNO diminue la réponse à l'Ang II (cf p171). Comme indiqué précédemment cette étude doit être complétée pour déterminer le mécanisme d'action du NO et évaluer son impact sur le TM.

Nos précédentes études ont montré que le GSNO avait un rôle cérébroprotecteur dans un modèle d'AVC (*Parent *et al*. 2015). Il serait donc intéressant d'étudier dans ce modèle l'impact du GSNO sur les réponses médiées par AT_1 et AT_2.

L'utilisation de microparticules chargées en GSNO dans l'AVC a notamment fait l'objet de projets déposés par notre équipe auprès de la Fondation pour la Recherche sur les AVC en 2017, ainsi qu'auprès de l'école doctorale BIOSE de l'université de Lorraine en collaboration avec le laboratoire CYCERON (UMR-S U1237, Caen).

L'objectif de ces projets est d'évaluer les effets bénéfiques du GSNO administré dans la phase post-aigue de l'AVC. Suite à une occlusion de l'ACM, la concentration en NO augmente de manière transitoire pendant 30 min (Malinski *et al*. 1993; Kader *et al*. 1993), puis diminue pendant les 7 jours qui suivent l'AVC (Malinski *et al*. 1993; Sugimura *et al*. 1998). Notre hypothèse est donc qu'une libération contrôlée de GSNO, à partir de nos formulations, pourrait prévenir la diminution délétère de NO dans les jours suivant l'AVC. Le NO libéré pourrait ainsi, grâce à la nitrosation, avoir une action protectrice contre les conséquences de l'AVC (Khan *et al*. 2006, 2012), notamment *via* une diminution de la réponse médiée par AT_1.

Impact de la S-nitrosation sur les autres fonctions des récepteurs de l'Ang II

Notre étude s'est principalement intéressée aux conséquences de la nitrosation sur les fonctions vasomotrices d'AT_1 et d'AT_2. Il serait également intéressant d'évaluer son impact sur les autres fonctions des récepteurs comme la migration ou la prolifération cellulaire.

Des études ont notamment montré que le SNAP et/ou le SNP diminuent la migration (Dubey *et al*. 1995; Maruhashi *et al*. 2014) et l'hypertrophie des CML induite par l'Ang II (Ritchie *et al*. 1998). Par ailleurs, Suzuki a montré que la transfection de CML avec un adénovirus codant pour l'eNOS entraine l'inhibition de la voie $G_{12/13}$/Rho/ROCK et la migration induite par l'Ang II (Suzuki *et al*. 2009). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de la nitrosation sur ces fonctions.

Comme présenté en introduction, le récepteur AT_1 agit *via* l'activation des protéines G mais aussi des β-arrestines. Le développement d'agonistes biaisés ciblant spécifiquement la voie β-arrestine suscite d'ailleurs un grand intérêt dans la littérature. Nos résultats montrent que le NO abolit la vasoconstriction (médiée par les protéines G) cependant l'internalisation (médiée par les β-arrestines) n'est pas impactée. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la nitrosation spécifiquement sur les effets médiés par la voie β-arrestine. En effet, nous avons vu qu'elle est impliquée, entre autres, dans la régulation de certaines kinases (Kendall *et al*. 2014).

L'ensemble de ces perspectives permettra de mieux caractériser l'importance de la *S*-nitrosation des récepteurs de l'Ang II au niveau physiologique ainsi que l'intérêt au niveau physiopathologique.

CONCLUSION

Les travaux présentés dans cette thèse se sont intéressés à l'interaction entre deux acteurs de la régulation de la circulation cérébrale, le NO et le SRA. Nos études se sont porté en particulier sur une nouvelle voie de régulation des récepteurs de l'Ang II, la *S*-nitrosation.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la problématique actuelle concernant l'aspécificité des anticorps anti-AT_1. Nous montrons ici qu'un des nouveaux anticorps monoclonal anti-AT_1 ne reconnaît pas le récepteur de manière spécifique. Nous avons donc choisi de ne pas utiliser d'anticorps ciblant AT_1 pour le reste de nos études.

Nous avons ensuite évalué l'impact de l'exposition à un donneur de NO sur les réponses vasomotrices d'ACM isolées. Nous avons montré que l'exposition à un donneur de NO abolit spécifiquement la vasoconstriction AT_1-dépendante, alors que la réponse médiée par d'autres vasoconstricteurs n'est pas impactée. De plus, le NO abolit aussi une autre fonction d'AT_1, non dépendante du ligand, le TM. À l'aide d'outils pharmacologiques nous avons démontré que l'action du NO passait par une nitrosation plutôt qu'une nitrosylation. Enfin, dans un modèle hétérologue d'expression d'AT_1, nous avons montré que le NO ne modifie pas l'internalisation du récepteur.

Par ailleurs, nos résultats préliminaires indiquent que la nitrosation abolit également la vasodilatation AT_2-dépendante, ainsi que la réponse médiée par l'Ang II dans un modèle de rats hypertendus.

Les principales perspectives de ce travail seront de développer une méthode permettant l'identification de la nitrosation des récepteurs de l'Ang II sans avoir recours aux anticorps anti-AT_1, étudier l'impact du NO *in vivo* et enfin approfondir nos études dans des modèles pathologiques d'hypertension artérielle et d'AVC.

Plusieurs études ont décrit une interaction entre le NO et le SRA. Certaines études ont décrit une diminution de l'expression génique et/ou protéique des récepteurs de l'Ang II suite à une exposition à un donneur de NO. À l'inverse, une diminution de la biodisponibilité de NO a été corrélée à une augmentation de l'activité du SRA.

Nous proposons ici la *S*-nitrosation comme l'un des mécanismes participant à l'interaction entre le NO et le SRA. Les perspectives ouvertes par ces travaux permettront de mieux caractériser la nitrosation des récepteurs de l'Ang II et son intérêt dans des modèles pathologiques.

BIBLIOGRAPHIE

Les articles du laboratoire sont précédés d'une *

Aalkjaer C, Peng HL (1997) pH and smooth muscle. Acta Physiol Scand 161:557–566. doi: 10.1046/j.1365-201X.1997.00263.x

Abadir PM, Carey RM, Siragy HM (2003) Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice. Hypertens Dallas Tex 1979 42:600–604. doi: 10.1161/01.HYP.0000090323.58122.5C

Abadir PM, Periasamy A, Carey RM, Siragy HM (2006) Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. Hypertens Dallas Tex 1979 48:316–322. doi: 10.1161/01.HYP.0000228997.88162.a8

Alencar JL, Lobysheva I, Chalupsky K, et al (2003a) S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. J Pharmacol Exp Ther 307:152–159. doi: 10.1124/jpet.103.052605

Alencar JL, Lobysheva I, Geffard M, et al (2003b) Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. Mol Pharmacol 63:1148–1158

Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA, Rittenhouse SE (1985) Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. Hypertens Dallas Tex 1979 7:447–451

Ankolekar S, Fuller M, Cross I, et al (2013) Feasibility of an ambulance-based stroke trial, and safety of glyceryl trinitrate in ultra-acute stroke: the rapid intervention with glyceryl trinitrate in Hypertensive Stroke Trial (RIGHT, ISRCTN66434824). Stroke 44:3120–3128. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001301

Aplin M, Bonde MM, Hansen JL (2009) Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. J Mol Cell Cardiol 46:15–24. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.09.123

Arima S, Endo Y, Yaoita H, et al (1997) Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. J Clin Invest 100:2816–2823. doi: 10.1172/JCI119829

Atlas SA (2007) The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. J Manag Care Pharm JMCP 13:9–20. doi: 10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9

Badejo Jr A, Greco AJ, Casey DB, et al (2009) Analysis of hemodynamic responses and the proliferative effect of the novel angiotensin peptide Angiotensin A. FASEB J 23:935.2-935.2. doi: 10.1096/fasebj.23.1_supplement.935.2

Bader M, Peters J, Baltatu O, et al (2001) Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. J Mol Med Berl Ger 79:76–102

Balakumar P, Jagadeesh G (2014) Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. J Mol Endocrinol 53:R71-92. doi: 10.1530/JME-14-0125

Barlic J, Andrews JD, Kelvin AA, et al (2000) Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCRI. Nat Immunol 1:227–233. doi: 10.1038/79767

Barnes JM, Steward LJ, Barber PC, Barnes NM (1993) Identification and characterisation of angiotensin II receptor subtypes in human brain. Eur J Pharmacol 230:251–258

Bath PM, Pathansali R, Iddenden R, Bath FJ (2001) The effect of transdermal glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor, on blood pressure and platelet function in acute stroke. Cerebrovasc Dis Basel Switz 11:265–272. doi: 10.1159/000047649

Bath PMW, Woodhouse L, Scutt P, et al (2015) Efficacy of nitric oxide, with or without continuing antihypertensive treatment, for management of high blood pressure in acute stroke (ENOS): a partial-factorial randomised controlled trial. The Lancet 385:617–628. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61121-1

Bauer JA, Fung HL (1991) Differential hemodynamic effects and tolerance properties of nitroglycerin and an S-nitrosothiol in experimental heart failure. J Pharmacol Exp Ther 256:249–254

Bayliss WM (1902) On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. J Physiol 28:220–231

Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, et al (1997) Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. Biochem J 325:449–454

Beermann S, Seifert R, Neumann D (2012) Commercially available antibodies against human and murine histamine H-receptor lack specificity. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 385:125–135. doi: 10.1007/s00210-011-0700-4

*Belcastro E, Gaucher C, Corti A, et al (2017) Regulation of protein function by S-nitrosation and S-glutathionylation: processes and targets in cardiovascular pathophysiology. Biol Chem 398:1267–1293. doi: 10.1515/hsz-2017-0150

Bellamy TC, Garthwaite J (2001) Sub-second Kinetics of the Nitric Oxide Receptor, Soluble Guanylyl Cyclase, in Intact Cerebellar Cells. J Biol Chem 276:4287–4292. doi: 10.1074/jbc.M006677200

Benicky J, Hafko R, Sanchez-Lemus E, et al (2012) Six commercially available angiotensin II AT1 receptor antibodies are non-specific. Cell Mol Neurobiol 32:1353–1365. doi: 10.1007/s10571-012-9862-y

Bennion DM, Isenberg JD, Harmel AT, et al (2017) Post-stroke angiotensin II type 2 receptor activation provides long-term neuroprotection in aged rats. PLOS ONE 12:e0180738. doi: 10.1371/journal.pone.0180738

Benovic JL, Kühn H, Weyand I, et al (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). Proc Natl Acad Sci U S A 84:8879–8882

Berk BC, Corson MA (1997) Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. Circ Res 80:607–616

Billah M (1992) Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. Biochem Biophys Res Commun 187:1426–1431. doi: 10.1016/0006-291X(92)90461-S

Blodow S, Schneider H, Storch U, et al (2014) Novel role of mechanosensitive AT1B receptors in myogenic vasoconstriction. Pflugers Arch 466:1343–1353. doi: 10.1007/s00424-013-1372-3

Bodei S, Arrighi N, Spano P, Sigala S (2009) Should we be cautious on the use of commercially available antibodies to dopamine receptors? Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 379:413–415. doi: 10.1007/s00210-008-0384-6

Boerrigter G, Lark MW, Whalen EJ, et al (2011) Cardiorenal actions of TRV120027, a novel ß-arrestin-biased ligand at the angiotensin II type I receptor, in healthy and heart failure canines: a novel therapeutic strategy for acute heart failure. Circ Heart Fail 4:770–778. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.962571

Boerrigter G, Soergel DG, Violin JD, et al (2012) TRV120027, a novel β-arrestin biased ligand at the angiotensin II type I receptor, unloads the heart and maintains renal function when added to furosemide in experimental heart failure. Circ Heart Fail 5:627–634. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.969220

Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F (1988) The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. Stroke 19:1083–1092

Bottari SP, Taylor V, King IN, et al (1991) Angiotensin II AT2 receptors do not interact with guanine nucleotide binding proteins. Eur J Pharmacol 207:157–163. doi: 10.1016/0922-4106(91)90091-U

Boucard AA, Roy M, Beaulieu M-E, et al (2003) Constitutive activation of the angiotensin II type 1 receptor alters the spatial proximity of transmembrane 7 to the ligand-binding pocket. J Biol Chem 278:36628–36636. doi: 10.1074/jbc.M305952200

Bramanti E, Angeli V, Mester Z, et al (2010) Determination of S-nitrosoglutathione in plasma: comparison of two methods. Talanta 81:1295–1299. doi: 10.1016/j.talanta.2010.02.024

Braun-Menèndez E, Fasciolo J (1939) Acción vasoconstrictora e ipertensora de la sangre venosa del riňón en isquemia incompleta aguda. 15:161–172

Bregeon J, Loirand G, Pacaud P, Rolli-Derkinderen M (2009) Angiotensin II induces RhoA activation through SHP2-dependent dephosphorylation of the RhoGAP p190A in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 297:C1062-1070. doi: 10.1152/ajpcell.00174.2009

Bril A, Félétou M (2014) La collectrine : un nouveau composant du système rénine-angiotensine ? médecine/sciences 30:136–139. doi: 10.1051/medsci/20143002007

Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Salaices M (1999) Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. Br J Pharmacol 126:111–120. doi: 10.1038/sj.bjp.0702281

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM (1996) Angiotensin-(1-7) Dilates Canine Coronary Arteries Through Kinins and Nitric Oxide. Hypertension 27:523–528. doi: 10.1161/01.HYP.27.3.523

Bruce E, Shenoy V, Francis J, et al (2012) Abstract 230: AT2 Receptor Agonist, Compound 21, Attenuates Pulmonary Hypertension and Associated Cardiac Pathophysiology via the Vasoprotective ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis. Hypertension 60:A230–A230

Bruce E, Shenoy V, Rathinasabapathy A, et al (2015) Selective activation of angiotensin AT2 receptors attenuates progression of pulmonary hypertension and inhibits cardiopulmonary fibrosis. Br J Pharmacol 172:2219–2231. doi: 10.1111/bph.13044

Bucher M, Hobbhahn J, Kurtz A (2001) Nitric oxide-dependent down-regulation of angiotensin II type 2 receptors during experimental sepsis. Crit Care Med 29:1750–1755

Budzyn K, Sobey CG, Drummond GR (2010) Reduced cerebrovascular remodeling and functional impairment in spontaneously hypertensive rats following combined treatment with suboptimal doses of telmisartan and ramipril: is less really more? J Hypertens 28:1384. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833c03fe

Burns KD, Inagami T, Harris RC (1993) Cloning of a rabbit kidney cortex AT1 angiotensin II receptor that is present in proximal tubule epithelium. Am J Physiol 264:F645-654. doi: 10.1152/ajprenal.1993.264.4.F645

Burns L, Clark KL, Bradley J, et al (1994) Molecular cloning of the canine angiotensin II receptor. An AT1-like receptor with reduced affinity for DuP753. FEBS Lett 343:146–150

Butler AR, Rhodes P (1997) Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols. Anal Biochem 249:1–9

Butterworth RJ, Cluckie A, Jackson SH, et al (1998) Pathophysiological assessment of nitric oxide (given as sodium nitroprusside) in acute ischaemic stroke. Cerebrovasc Dis Basel Switz 8:158–165. doi: 10.1159/000015842

Cabana J, Holleran B, Beaulieu M-È, et al (2013) Critical hydrogen bond formation for activation of the angiotensin II type 1 receptor. J Biol Chem 288:2593–2604. doi: 10.1074/jbc.M112.395939

Cabana J, Holleran B, Leduc R, et al (2015) Identification of Distinct Conformations of the Angiotensin-II Type 1 Receptor Associated with the Gq/11 Protein Pathway and the β-Arrestin Pathway Using Molecular Dynamics Simulations. J Biol Chem 290:15835–15854. doi: 10.1074/jbc.M114.627356

Cahill PA, Redmond EM, Foster C, Sitzmann JV (1995) Nitric oxide regulates angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells. Eur J Pharmacol 288:219–229

Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, et al (1989) Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. Am J Physiol 257:H324-329. doi: 10.1152/ajpheart.1989.257.1.H324

Carbone ML, Brégeon J, Devos N, et al (2015) Angiotensin II activates the RhoA exchange factor Arhgef1 in humans. Hypertens Dallas Tex 1979 65:1273–1278. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05065

Castoldi G, di Gioia CRT, Bombardi C, et al (2014) Prevention of diabetic nephropathy by compound 21, selective agonist of angiotensin type 2 receptors, in Zucker diabetic fatty rats. Am J Physiol Renal Physiol 307:F1123-1131. doi: 10.1152/ajprenal.00247.2014

Chao Y, Zhu L, Qu X, et al (2017) Inhibition of angiotension II type 1 receptor reduced human endothelial inflammation induced by low shear stress. Exp Cell Res 360:94–104. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.08.030

Chen D, Jancovski N, Bassi JK, et al (2012) Angiotensin type 1A receptors in C1 neurons of the rostral ventrolateral medulla modulate the pressor response to aversive stress. J Neurosci Off J Soc Neurosci 32:2051–2061. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5360-11.2012

Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D (1982) Role of Endothelial Cells in Relaxation of Isolated Arteries by Bradykinin. Proc Natl Acad Sci U S A 79:2106–2110

Chillon JM, Baumbach GL (2002) Autoregulation: arterial and intracranial pressure. Cereb Blood Flow Metab 395–412

Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, et al (1989) Identification of angiotensin II receptor subtypes. Biochem Biophys Res Commun USA 165:1: doi: 10.1016/0006-291X(89)91054-1

Choi H, Allahdadi KJ, Tostes RC, Webb RC (2011) Augmented S-nitrosylation contributes to impaired relaxation in angiotensin II hypertensive mouse aorta: role of thioredoxin reductase. J Hypertens 29:2359–2368. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834d2554

Chrissobolis S, Miller AA, Drummond GR, et al (2011) Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. Front Biosci Landmark Ed 16:1733–1745

Conchon S, Peltier N, Corvol P, Clauser E (1998) A noninternalized nondesensitized truncated AT1A receptor transduces an amplified ANG II signal. Am J Physiol 274:E336-345

Cooke JP, Andon N, Loscalzo J (1989) S-nitrosocaptopril. II. Effects on vascular reactivity. J Pharmacol Exp Ther 249:730–734

Cornish-Bowden A (1985) Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. Nucleic Acids Res 13:3021–3030

Costa MA, Lopez Verrilli MA, Gomez KA, et al (2010) Angiotensin-(1-7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 299:H1205-1211. doi: 10.1152/ajpheart.00850.2009

Costa-Neto CM, Duarte DA, Lima V, et al (2014) Non-canonical signalling and roles of the vasoactive peptides angiotensins and kinins. Clin Sci Lond Engl 1979 126:753–774. doi: 10.1042/CS20130414

Crassous P-A, Couloubaly S, Huang C, et al (2012) Soluble guanylyl cyclase is a target of angiotensin II-induced nitrosative stress in a hypertensive rat model. Am J Physiol Heart Circ Physiol 303:H597-604. doi: 10.1152/ajpheart.00138.2012

Csikós T, Balmforth AJ, Grojec M, et al (1998) Angiotensin AT2 receptor degradation is prevented by ligand occupation. Biochem Biophys Res Commun 243:142–147. doi: 10.1006/bbrc.1997.8042

Curnow KM, Pascoe L, White PC (1992) Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. Mol Endocrinol Baltim Md 6:1113–1118. doi: 10.1210/mend.6.7.1508224

Daaka Y (2012) S-Nitrosylation-Regulated GPCR Signaling. Biochim Biophys Acta 1820:743–751. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.03.007

*Dahboul F, Perrin-Sarrado C, Boudier A, et al (2014) S,S'-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other S-nitrosothiols. Eur J Pharmacol 730:171–179. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.02.034

Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, et al (2002) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. Lancet Lond Engl 359:995–1003. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08089-3

Dalkara T, Arsava EM (2012) Can restoring incomplete microcirculatory reperfusion improve stroke outcome after thrombolysis? J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab 32:2091–2099. doi: 10.1038/jcbfm.2012.139

Danishpajooh IO, Gudi T, Chen Y, et al (2001) Nitric oxide inhibits methionine synthase activity in vivo and disrupts carbon flow through the folate pathway. J Biol Chem 276:27296–27303. doi: 10.1074/jbc.M104043200

Datta B, Tufnell-Barrett T, Bleasdale RA, et al (2004) Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: a potential role in congestive heart failure. Circulation 109:1339–1342. doi: 10.1161/01.CIR.0000124450.07016.1D

Dauphin F, Hamel E (1990) Muscarinic receptor subtype mediating vasodilation feline middle cerebral artery exhibits M3 pharmacology. Eur J Pharmacol 178:203–213

Dauphin F, Ting V, Payette P, et al (1991) Vasocontractile muscarinic M1 receptors in cat cerebral arteries: pharmacological identification and detection of mRNA. Eur J Pharmacol 207:319–327

Davies PF (1995) Flow-Mediated Endothelial Mechanotransduction. Physiol Rev 75:519–560

Davis MJ, Hill MA (1999) Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. Physiol Rev 79:387–423. doi: 10.1152/physrev.1999.79.2.387

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, et al (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev 52:415–472

de Kloet AD, Wang L, Ludin JA, et al (2016) Reporter mouse strain provides a novel look at angiotensin type-2 receptor distribution in the central nervous system. Brain Struct Funct 221:891–912. doi: 10.1007/s00429-014-0943-1

De Silva TM, Broughton BRS, Drummond GR, et al (2009) Gender influences cerebral vascular responses to angiotensin II through Nox2-derived reactive oxygen species. Stroke 40:1091–1097. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.531707

Deslauriers B, Ponce C, Lombard C, et al (1999) N-glycosylation requirements for the AT1a angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane. Biochem J 339:397–405

Di J-H, Li C, Yu H-M, et al (2012) nNOS downregulation attenuates neuronal apoptosis by inhibiting nNOS-GluR6 interaction and GluR6 nitrosylation in cerebral ischemic reperfusion. Biochem Biophys Res Commun 420:594–599. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.039

Dias-Peixoto MF, Santos RAS, Gomes ERM, et al (2008) Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. Hypertens Dallas Tex 1979 52:542–548. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114280

Diener H-C (2009) Preventing stroke: the PRoFESS, ONTARGET, and TRANSCEND trial programs. J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens 27:S31-36. doi: 10.1097/01.hjh.0000357906.60778.7f

Dimitropoulou C, White RE, Fuchs L, et al (2001) Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor and Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) channels. Hypertens Dallas Tex 1979 37:301–307

Dong X, Han S, Zylka MJ, et al (2001) A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. Cell 106:619–632

Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. Lancet Lond Engl 371:1612–1623. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60694-7

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circ Res 87:E1-9

Dubey RK, Jackson EK, Lüscher TF (1995) Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors. J Clin Invest 96:141–149. doi: 10.1172/JCI118014

Dudley DT, Hubbell SE, Summerfelt RM (1991) Characterization of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells. Mol Pharmacol 40:360–367

Dulin NO, Alexander LD, Harwalkar S, et al (1998) Phospholipase A2-mediated activation of mitogen-activated protein kinase by angiotensin II. Proc Natl Acad Sci U S A 95:8098–8102

*Dupuis F, Atkinson J, Limiñana P, Chillon J-M (2005a) Comparative effects of the angiotensin II receptor blocker, telmisartan, and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cerebrovascular structure in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 23:1061–1066

*Dupuis F, Atkinson J, Limiñana P, Chillon J-M (2005b) Captopril improves cerebrovascular structure and function in old hypertensive rats. Br J Pharmacol 144:349–356. doi: 10.1038/sj.bjp.0706001

*Dupuis F, Vincent J-M, Limiñana P, et al (2010) Effects of suboptimal doses of the AT1 receptor blocker, telmisartan, with the angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cerebral arterioles in spontaneously hypertensive rat. J Hypertens 28:1566. doi: 10.1097/HJH.0b013e328339f1f3

Durand MJ, Zinkevich NS, Riedel M, et al (2016) Vascular Actions of Angiotensin 1-7 in the Human Microcirculation: Novel Role for Telomerase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 36:1254–1262. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307518

Edvinsson L, Mackenzie ET (2002) General and comparative anatomy of the cerebral circulation. Cereb Blood Flow Metab 3–29

Endo Y, Arima S, Yaoita H, et al (1998) Vasodilation mediated by angiotensin II type 2 receptor is impaired in afferent arterioles of young spontaneously hypertensive rats. J Vasc Res 35:421–427. doi: 10.1159/000025613

Etelvino GM, Peluso AAB, Santos RAS (2014) New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. Curr Hypertens Rep 16:433. doi: 10.1007/s11906-014-0433-0

Farah C, Michel LYM, Balligand J-L (2018) Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. Nat Rev Cardiol. doi: 10.1038/nrcardio.2017.224

Feelisch M, Ostrowski J, Noack E (1989) On the mechanism of NO release from sydnonimines. J Cardiovasc Pharmacol 14 Suppl 11:S13-22

Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, et al (2014) Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet 383:245–254

Felker GM, Butler J, Collins SP, et al (2015) Heart failure therapeutics on the basis of a biased ligand of the angiotensin-2 type 1 receptor. Rationale and design of the BLAST-AHF study (Biased Ligand of the Angiotensin Receptor Study in Acute Heart Failure). JACC Heart Fail 3:193–201. doi: 10.1016/j.jchf.2014.09.008

Feng J, Ito M, Ichikawa K, et al (1999) Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. J Biol Chem 274:37385–37390

Feng Y-H, Saad Y, Karnik SS (2000) Reversible inactivation of AT2 angiotensin II receptor from cysteine–disulfide bond exchange. FEBS Lett 484:133–138. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02141-4

Ferguson SS, Downey WE, Colapietro AM, et al (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. Science 271:363–366

Ferrão FM, Cardoso LHD, Drummond HA, et al (2017) Luminal ANG II is internalized as a complex with AT1R/AT2R heterodimers to target endoplasmic reticulum in LLC-PK1cells. Am J Physiol Renal Physiol 313:F440–F449. doi: 10.1152/ajprenal.00261.2016

Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP (2001) Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. Hypertens Dallas Tex 1979 38:665–668

Ferris CD, Cameron AM, Huganir RL, Snyder SH (1992) Quantal calcium release by purified reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Nature 356:350–352. doi: 10.1038/356350a0

Figueiredo-Freitas C, Dulce RA, Foster MW, et al (2015) S-Nitrosylation of Sarcomeric Proteins Depresses Myofilament Ca2+)Sensitivity in Intact Cardiomyocytes. Antioxid Redox Signal 23:1017–1034. doi: 10.1089/ars.2015.6275

Filice M, Amelio D, Garofalo F, et al (2017) Angiotensin II dependent cardiac remodeling in the eel Anguilla anguilla involves the NOS/NO system. Nitric Oxide Biol Chem 65:50–59. doi: 10.1016/j.niox.2017.02.007

Fischer-Ferraro C, Nahmod VE, Goldstein DJ, Finkielman S (1971) Angiotensin and renin in rat and dog brain. J Exp Med 133:353–361

Fitzhugh AL, Keefer LK (2000) Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the “NONOates.” Free Radic Biol Med 28:1463–1469

Fitzsimons JT (1998) Angiotensin, thirst, and sodium appetite. Physiol Rev 78:583–686. doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.583

Flögel U, Merx MW, Godecke A, et al (2001) Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. Proc Natl Acad Sci U S A 98:735–740. doi: 10.1073/pnas.011460298

Folkow B (1949) Intravascular pressure as a factor regulating the tone of the small vessels. Acta Physiol Scand 17:289–310. doi: 10.1111/j.1748-1716.1949.tb00576.x

Folkow B (1952) A study of the factors influencing the tone of denervated blood vessels perfused at various pressures. Acta Physiol Scand 27:99–117. doi: 10.1111/j.1748-1716.1953.tb00928.x

Force T, Pombo CM, Avruch JA, et al (1996) Stress-Activated Protein Kinases in Cardiovascular Disease. Circ Res 78:947–953. doi: 10.1161/01.RES.78.6.947

Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertens Dallas Tex 1979 23:1121–1131

Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J 33:829–837. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304

*Foulquier S, Dupuis F, Perrin-Sarrado C, et al (2011) High salt intake abolishes AT(2)-mediated vasodilation of pial arterioles in rats. J Hypertens 29:1392–1399. doi: 10.1097/HJH.0b013e328347050e

*Foulquier S, Dupuis F, Perrin-Sarrado C, et al (2012) Differential effects of short-term treatment with two AT1 receptor blockers on diameter of pial arterioles in SHR. PloS One 7:e42469. doi: 10.1371/journal.pone.0042469

*Foulquier S, Lartaud I, Dupuis F (2014) Impact of Short-Term Treatment with Telmisartan on Cerebral Arterial Remodeling in SHR. PLoS ONE 9:. doi: 10.1371/journal.pone.0110766

Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA (1996) Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. Hypertens Dallas Tex 1979 28:104–108

Freeman EJ, Chisolm GM, Tallant EA (1995) Role of Calcium and Protein Kinase C in the Activation of Phospholipase D by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. Arch Biochem Biophys 319:84–92. doi: 10.1006/abbi.1995.1269

Friederich JA, Butterworth JF (1995) Sodium nitroprusside: twenty years and counting. Anesth Analg 81:152–162

Fruttero R, Boschi D, Di Stilo A, Gasco A (1995) The furoxan system as a useful tool for balancing “hybrids” with mixed alpha 1-antagonist and NO-like vasodilator activities. J Med Chem 38:4944–4949

Fung HL, Bauer JA (1994) Mechanisms of nitrate tolerance. Cardiovasc Drugs Ther 8:489–499

Furchgott RF (1988) Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite : the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. Vanhoutte PM Ed Vasodilatation Vasc. Smooth Muscle Pept. Auton. Nerves Endothel. N. Y. Raven Press 401–414

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288:373–376

Gáborik Z, Szaszák M, Szidonya L, et al (2001) Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. Mol Pharmacol 59:239–247

Ganong WF (1984) The Brain Renin-Angiotensin System. Annu Rev Physiol 46:17–31. doi: 10.1146/annurev.ph.46.030184.000313

Gao J, Zucker IH, Gao L (2014) Activation of central angiotensin type 2 receptors by compound 21 improves arterial baroreflex sensitivity in rats with heart failure. Am J Hypertens 27:1248–1256. doi: 10.1093/ajh/hpu044

*Gaucher C, Boudier A, Dahboul F, et al (2013) S-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of S-nitrosothiols. Curr Pharm Des 19:458–472

Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I, Rossi R (2007) Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: a comparison among the most widely applied methodologies. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 851:124–139. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.09.031

Gohlke P, Pees C, Unger T (1998) AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. Hypertens Dallas Tex 1979 31:349–355

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW (1934) STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. J Exp Med 59:347–379

Goldstein DJ, Fischer-Ferraro C, Nahmod VE, Finkielman S (1970) Angiotensin I in renal and extra-renal tissues. Medicina (Mex) 30:81–83

Gonzalez AD, Wang G, Waters EM, et al (2012) Distribution of angiotensin type 1a receptor-containing cells in the brains of bacterial artificial chromosome transgenic mice. Neuroscience 226:489–509. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.039

Goodman Jr OB, Krupnick JG, Santini F, et al (1996) β-Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β2-adrenergic receptor. Nature 383:447–450. doi: 10.1038/383447a0

Gow AJ, Stamler JS (1998) Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. Nature 391:169–173. doi: 10.1038/34402

Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, et al (1991) Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus., Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. J Clin Investig J Clin Investig 88, 88:921, 921–933. doi: 10.1172/JCI115395, 10.1172/JCI115395

Greenacre SAB, Ischiropoulos H (2001) Tyrosine nitration: Localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. Free Radic Res 34:541–581. doi: 10.1080/10715760100300471

Griendling KK, Rittenhouse SE, Brock TA, et al (1986) Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 261:5901–5906

Griffiths MJD, Evans TW (2005) Inhaled nitric oxide therapy in adults. N Engl J Med 353:2683–2695. doi: 10.1056/NEJMra051884

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature 320:454–456. doi: 10.1038/320454a0

Guilluy C, Brégeon J, Toumaniantz G, et al (2010) The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. Nat Med 16:183–190. doi: 10.1038/nm.2079

Guilluy C, Rolli-Derkinderen M, Loufrani L, et al (2008) Ste20-related kinase SLK phosphorylates Ser188 of RhoA to induce vasodilation in response to angiotensin II Type 2 receptor activation. Circ Res 102:1265–1274. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.164764

Guo D-F, Chenier I, Tardif V, et al (2003) Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. Biochem Biophys Res Commun 310:1254–1265

Gupta A, Devi LA (2006) The use of receptor-specific antibodies to study G-protein-coupled receptors. Mt Sinai J Med N Y 73:673–681

Gutkind JS, Kurihara M, Saavedra JM (1988) Increased angiotensin II receptors in brain nuclei of DOCA-salt hypertensive rats. Am J Physiol 255:H646-650. doi: 10.1152/ajpheart.1988.255.3.H646

Guyton AC (1991) Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. Science 252:1813–1816

Habiyakare B, Alsaadon H, Mathai ML, et al (2014) Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). Int J Exp Pathol 95:290–295. doi: 10.1111/iep.12087

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990) Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. Physiol Rev 70:1067–1116. doi: 10.1152/physrev.1990.70.4.1067

Haendeler J, Yin G, Hojo Y, et al (2003) GIT1 Mediates Src-dependent Activation of Phospholipase Cγ by Angiotensin II and Epidermal Growth Factor. J Biol Chem 278:49936–49944. doi: 10.1074/jbc.M307317200

Hafko R, Villapol S, Nostramo R, et al (2013) Commercially Available Angiotensin II At2 Receptor Antibodies Are Nonspecific. PLoS ONE 8:. doi: 10.1371/journal.pone.0069234

Hallersund P, Elfvin A, Helander HF, Fändriks L (2011) The expression of renin-angiotensin system components in the human gastric mucosa. J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS 12:54–64. doi: 10.1177/1470320310379066

Hamdani N, van der Velden J (2009) Lack of specificity of antibodies directed against human beta-adrenergic receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 379:403–407. doi: 10.1007/s00210-009-0392-1

Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363:446–448. doi: 10.1038/363446a0

Hannan RE, Davis EA, Widdop RE (2003) Functional role of angiotensin II AT2 receptor in modulation of AT1 receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. Br J Pharmacol 140:987–995. doi: 10.1038/sj.bjp.0705484

Harp JB, Sayeski PP, Scanlon M, et al (1997) Role of intracellular calcium in the angiotensin II-mediated tyrosine phosphorylation and dephosphorylation of PLC-gamma 1. Biochem Biophys Res Commun 232:540–544. doi: 10.1006/bbrc.1997.6322

Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ (1996) Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. J Biol Chem 271:21985–21992

Heart Failure Society Of America (2006) Executive Summary: HFSA 2006 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. J Card Fail 12:10–38. doi: 10.1016/j.cardfail.2005.12.001

Heerding JN, Hines J, Fluharty SJ, Yee DK (2001) Identification and function of disulfide bridges in the extracellular domains of the angiotensin II type 2 receptor. Biochemistry (Mosc) 40:8369–8377

Heerding JN, Yee DK, Jacobs SL, Fluharty SJ (1997) Mutational analysis of the angiotensin II type 2 receptor: contribution of conserved extracellular amino acids. Regul Pept 72:97–103. doi: 10.1016/S0167-0115(97)01042-2

Heerding JN, Yee DK, Krichavsky MZ, Fluharty SJ (1998) Mutational analysis of the angiotensin type 2 receptor: contribution of conserved amino acids in the region of the sixth transmembrane domain. Regul Pept 74:113–119

Heikal L, Aaronson PI, Ferro A, et al (2011) S-nitrosophytochelatins: investigation of the bioactivity of an oligopeptide nitric oxide delivery system. Biomacromolecules 12:2103–2113. doi: 10.1021/bm200159h

Heikal L, Martin GP, Dailey LA (2009) Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelatins. Nitric Oxide Biol Chem 20:157–165. doi: 10.1016/j.niox.2008.11.001

Heikal L, Starr A, Martin GP, et al (2016) In vivo pharmacological activity and biodistribution of S-nitrosophytochelatins after intravenous and intranasal administration in mice. Nitric Oxide Biol Chem 59:1–9. doi: 10.1016/j.niox.2016.06.006

Hein L, Barsh GS, Pratt RE, et al (1995) Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. Nature 377:744–747. doi: 10.1038/377744a0

Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, et al (2013) Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. Br J Pharmacol 169:1417–1429. doi: 10.1111/bph.12217

Herrera M, Sparks MA, Alfonso-Pecchio AR, et al (2013) Lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type 1 receptor protein. Hypertens Dallas Tex 1979 61:253–258. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.203679

Hess DT, Lin LH, Freeman JA, Norden JJ (1994) Modification of cysteine residues within G(o) and other neuronal proteins by exposure to nitric oxide. Neuropharmacology 33:1283–1292

Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, et al (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. Nat Rev Mol Cell Biol 6:150–166. doi: 10.1038/nrm1569

Hicks DG, Kulkarni S (2008) HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. Am J Clin Pathol 129:263–273. doi: 10.1309/99AE032R9FM8WND1

Hong K, Zhao G, Hong Z, et al (2016) Mechanical activation of angiotensin II type 1 receptors causes actin remodelling and myogenic responsiveness in skeletal muscle arterioles. J Physiol 594:7027–7047. doi: 10.1113/JP272834

Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ (1998) Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. Endocr Res 24:307–314. doi: 10.3109/07435809809032610

Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, et al (1997) Angiotensin Type 2 Receptor Dephosphorylates Bcl-2 by Activating Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1 and Induces Apoptosis. J Biol Chem 272:19022–19026. doi: 10.1074/jbc.272.30.19022

Huang XC, Richards EM, Sumners C (1995) Angiotensin II type 2 receptor-mediated stimulation of protein phosphatase 2A in rat hypothalamic/brainstem neuronal cocultures. J Neurochem 65:2131–2137

Huang Z, Huang PL, Ma J, et al (1996) Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab 16:981–987. doi: 10.1097/00004647-199609000-00023

Hunyady L, Baukal AJ, Balla T, Catt KJ (1994) Independence of type I angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. J Biol Chem 269:24798–24804

Hunyady L, Bor M, Baukal AJ, et al (1995) A conserved NPLFY sequence contributes to agonist binding and signal transduction but is not an internalization signal for the type 1 angiotensin II receptor. J Biol Chem 270:16602–16609

Hunyady L, Catt KJ, Clark AJ, Gáborik Z (2000) Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. Regul Pept 91:29–44

Ichiki T, Herold CL, Kambayashi Y, et al (1994) Cloning of the cDNA and the genomic DNA of the mouse angiotensin II type 2 receptor. Biochim Biophys Acta 1189:247–250. doi: 10.1016/0005-2736(94)90072-8

Ichiki T, Usui M, Kato M, et al (1998) Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. Hypertens Dallas Tex 1979 31:342–348

Ignarro L, Byrns R, Wood K (1988) Biochemical and pharamcological properties of endothelium-deri- ved relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. Vanhoutte PM Ed Vasodilatation Vas- Cular Smooth Muscle Pept. Auton. Nerves Endothel. 427–435

Ihara M, Urata H, Kinoshita A, et al (1999) Increased chymase-dependent angiotensin II formation in human atherosclerotic aorta. Hypertens Dallas Tex 1979 33:1399–1405

Imamura T, Huang J, Dalle S, et al (2001) beta -Arrestin-mediated recruitment of the Src family kinase Yes mediates endothelin-1-stimulated glucose transport. J Biol Chem 276:43663–43667. doi: 10.1074/jbc.M105364200

Ischiropoulos H, Gow A (2005) Pathophysiological functions of nitric oxide-mediated protein modifications. Toxicology 208:299–303. doi: 10.1016/j.tox.2004.11.018

Itazaki K, Shigeri Y, Fujimoto M (1993) Molecular cloning and characterization of the angiotensin receptor subtype in porcine aortic smooth muscle. Eur J Pharmacol 245:147–156

Iwai M, Chen R, Li Z, et al (2005) Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. Circulation 112:1636–1643. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.525550

Iwai N, Inagami T (1992) Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. FEBS Lett 298:257–260

Jacke K, Witte K, Huser L, et al (2000) Contribution of the renin-angiotensin system to subsensitivity of soluble guanylyl cyclase in TGR(mREN2)27 rats. Eur J Pharmacol 403:27–35

Jacobs LS, Douglas JG (1996) Angiotensin II type 2 receptor subtype mediates phospholipase A2-dependent signaling in rabbit proximal tubular epithelial cells. Hypertens Dallas Tex 1979 28:663–668

Jang JH, Chun JN, Godo S, et al (2015) ROS and endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-dependent trafficking of angiotensin II type 2 receptor begets neuronal NOS in cardiac myocytes. Basic Res Cardiol 110:. doi: 10.1007/s00395-015-0477-6

Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, et al (2007) Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:297–302. doi: 10.1161/01.ATV.0000253889.09765.5f

Jensen BC, Swigart PM, Simpson PC (2009) Ten commercial antibodies for alpha-1-adrenergic receptor subtypes are nonspecific. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 379:409–412. doi: 10.1007/s00210-008-0368-6

Jin CZ, Jang JH, Wang Y, et al (2012) Neuronal nitric oxide synthase is up-regulated by angiotensin II and attenuates NADPH oxidase activity and facilitates relaxation in murine left ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol 52:1274–1281. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.03.013

Johansson BB (1999) Hypertension mechanisms causing stroke. Clin Exp Pharmacol Physiol 26:563–565

Joseph JP, Mecca AP, Regenhardt RW, et al (2014) The angiotensin type 2 receptor agonist Compound 21 elicits cerebroprotection in endothelin-1 induced ischemic stroke. Neuropharmacology 81:134–141. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.044

Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, et al (2004) Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. The Lancet 363:2022–2031. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16451-9

Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, Trifiletti RR (1993) Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. Stroke 24:1709–1716

Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, et al (1993) Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. J Biol Chem 268:24543–24546

Kaposzta Z, Baskerville PA, Madge D, et al (2001) L-arginine and S-nitrosoglutathione reduce embolization in humans. Circulation 103:2371–2375

Kaschina E, Unger T (2003) Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signalling and Function. Blood Press 12:70–88. doi: 10.1080/08037050310001057

Katoh M, Egashira K, Usui M, et al (1998) Cardiac angiotensin II receptors are upregulated by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in rats. Circ Res 83:743–751

Katsumi H, Nishikawa M, Hashida M (2007) Development of nitric oxide donors for the treatment of cardiovascular diseases. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 5:204–208

Kauffenstein G, Laher I, Matrougui K, et al (2012) Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. Cardiovasc Res 95:223–232. doi: 10.1093/cvr/cvs152

Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, et al (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. J Cell Biol 147:1023–1038

Kelm M, Schrader J (1990) Control of coronary vascular tone by nitric oxide. Circ Res 66:1561–1575. doi: 10.1161/01.RES.66.6.1561

Kendall RT, Lee M-H, Pleasant DL, et al (2014) Arrestin-dependent angiotensin AT1 receptor signaling regulates Akt and mTor-mediated protein synthesis. J Biol Chem 289:26155–26166. doi: 10.1074/jbc.M114.595728

Khan M, Dhammu TS, Sakakima H, et al (2012) The inhibitory effect of S-nitrosoglutathione on blood-brain barrier disruption and peroxynitrite formation in a rat model of experimental stroke. J Neurochem 123:86–97. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07947.x

Khan M, Jatana M, Elango C, et al (2006) Cerebrovascular protection by various nitric oxide donors in rats after experimental stroke. Nitric Oxide Biol Chem 15:114–124. doi: 10.1016/j.niox.2006.01.008

Khan M, Sekhon B, Giri S, et al (2005) S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab 25:177–192. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600012

Khan M, Singh I (2016) Inhibition of the AMPK/nNOS pathway for neuroprotection in stroke. Neural Regen Res 11:398–399. doi: 10.4103/1673-5374.179039

Kimura K, Ito M, Amano M, et al (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). Science 273:245–248

Kirabo A, Kearns PN, Jarajapu YP, et al (2011) Vascular smooth muscle Jak2 mediates angiotensin II-induced hypertension via increased levels of reactive oxygen species. Cardiovasc Res 91:171–179. doi: 10.1093/cvr/cvr059

Klett C, Nobiling R, Gierschik P, Hackenthal E (1993) Angiotensin II stimulates the synthesis of angiotensinogen in hepatocytes by inhibiting adenylylcyclase activity and stabilizing angiotensinogen mRNA. J Biol Chem 268:25095–25107

Koike G, Horiuchi M, Yamada T, et al (1994) Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. Biochem Biophys Res Commun 203:1842–1850. doi: 10.1006/bbrc.1994.2402

Kokkola T, Savinainen JR, Mönkkönen KS, et al (2005) S-Nitrosothiols modulate G protein-coupled receptor signaling in a reversible and highly receptor-specific manner. BMC Cell Biol 6:21. doi: 10.1186/1471-2121-6-21

Kovacs JJ, Whalen EJ, Liu R, et al (2008) Beta-arrestin-mediated localization of smoothened to the primary cilium. Science 320:1777–1781. doi: 10.1126/science.1157983

Krishnan B, Torti FM, Gallagher PE, Tallant EA (2013) Angiotensin-(1-7) reduces proliferation and angiogenesis of human prostate cancer xenografts with a decrease in angiogenic factors and an increase in sFlt-1. The Prostate 73:60–70. doi: 10.1002/pros.22540

Kudoh S, Komuro I, Mizuno T, et al (1997) Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. Circ Res 80:139–146

Kukovetz WR, Holzmann S, Pöch G (1992) Molecular mechanism of action of nicorandil. J Cardiovasc Pharmacol 20 Suppl 3:S1-7

Kuschinsky W, Wahl M (1978) Local chemical and neurogenic regulation of cerebral vascular resistance. Physiol Rev 58:656–689. doi: 10.1152/physrev.1978.58.3.656

Lanctôt PM, Leclerc PC, Escher E, et al (1999) Role of N-Glycosylation in the Expression and Functional Properties of Human AT1 Receptor. Biochemistry (Mosc) 38:8621–8627. doi: 10.1021/bi9830516

Langford E, Brown AS, de Belder A, et al (1994) Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. The Lancet 344:1458–1460. doi: 10.1016/S0140-6736(94)90287-9

Laporte SA, Servant G, Richard DE, et al (1996) The tyrosine within the NPXnY motif of the human angiotensin II type 1 receptor is involved in mediating signal transduction but is not essential for internalization. Mol Pharmacol 49:89–95

Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, et al (2013) Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. Circ Res 112:1104–1111. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301077

Lazzarato L, Chegaev K, Marini E, et al (2011) New Nitric Oxide or Hydrogen Sulfide Releasing Aspirins. J Med Chem 54:5478–5484. doi: 10.1021/jm2004514

Lecat S, Bucher B, Mely Y, Galzi J-L (2002) Mutations in the extracellular amino-terminal domain of the NK2 neurokinin receptor abolish cAMP signaling but preserve intracellular calcium responses. J Biol Chem 277:42034–42048. doi: 10.1074/jbc.M203606200

Leclerc PC, Auger-Messier M, Lanctot PM, et al (2002) A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. Endocrinology 143:4702–4710. doi: 10.1210/en.2002-220679

Leclerc PC, Lanctot PM, Auger-Messier M, et al (2006) S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. Br J Pharmacol 148:306–313. doi: 10.1038/sj.bjp.0706725

Lees C, Langford E, Brown AS, et al (1996) The effects of S-nitrosoglutathione on platelet activation, hypertension, and uterine and fetal Doppler in severe preeclampsia. Obstet Gynecol 88:14–19. doi: 10.1016/0029-7844(96)00070-1

Li Y-Q, Ji H, Zhang Y-H, et al (2007) WB1106, a novel nitric oxide-releasing derivative of telmisartan, inhibits hypertension and improves glucose metabolism in rats. Eur J Pharmacol 577:100–108. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.08.008

Lin L, Xu C, Carraway MS, et al (2018) RhoA inactivation by S-nitrosylation regulates vascular smooth muscle contractive signaling. Nitric Oxide Biol Chem 74:56–64. doi: 10.1016/j.niox.2018.01.007

Lin SL, Setya S, Johnson-Farley NN, Cowen DS (2002) Differential coupling of 5-HT(1) receptors to G proteins of the G(i) family. Br J Pharmacol 136:1072–1078. doi: 10.1038/sj.bjp.0704809

Lin SY, Goodfriend TL (1970) Angiotensin receptors. Am J Physiol 218:1319–1328. doi: 10.1152/ajplegacy.1970.218.5.1319

Lithell H, Hansson L, Skoog I, et al (2003) The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. J Hypertens 21:875–886. doi: 10.1097/01.hjh.0000059028.82022.89

Liu X, Miller MJ, Joshi MS, et al (1998) Accelerated reaction of nitric oxide with O2 within the hydrophobic interior of biological membranes. Proc Natl Acad Sci U S A 95:2175–2179

Liu YH, Yang XP, Sharov VG, et al (1997) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. J Clin Invest 99:1926–1935

Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, et al (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. Science 248:1547–1550

Loiola RA, Fernandes L, Eichler R, et al (2011) Vascular mechanisms involved in angiotensin II-induced venoconstriction in hypertensive rats. Peptides 32:2116–2121. doi: 10.1016/j.peptides.2011.09.011

Loscalzo J, Welch G (1995) Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. Prog Cardiovasc Dis 38:87–104

Lu D, Kassab GS (2011) Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. J R Soc Interface 8:1379–1385. doi: 10.1098/rsif.2011.0177

Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, et al (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. Proc Natl Acad Sci U S A 98:2449–2454. doi: 10.1073/pnas.041604898

Mackrill JJ (2004) Generation, use, and validation of receptor-selective antibodies. Methods Mol Biol Clifton NJ 259:47–65. doi: 10.1385/1-59259-754-8:047

Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M (1993) Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab 13:355–358. doi: 10.1038/jcbfm.1993.48

Marley R, Feelisch M, Holt S, Moore K (2000) A chemiluminescense-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. Free Radic Res 32:1–9

Marques FD, Melo MB, Souza LE, et al (2012) Beneficial Effects of Long-Term Administration of an Oral Formulation of Angiotensin-(1–7) in Infarcted Rats. In: Int. J. Hypertens. https://www.hindawi.com/journals/ijhy/2012/795452/. Accessed 14 Mar 2018

Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, et al (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. Nature 375:247–250. doi: 10.1038/375247a0

Maruhashi T, Noma K, Iwamoto Y, et al (2014) Critical Role of Exogenous Nitric Oxide in ROCK Activity in Vascular Smooth Muscle Cells. PLOS ONE 9:e109017. doi: 10.1371/journal.pone.0109017

Marui N, Offermann MK, Swerlick R, et al (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. J Clin Invest 92:1866–1874. doi: 10.1172/JCI116778

Matavelli LC, Zatz R, Siragy HM (2015) A nonpeptide angiotensin II type 2 receptor agonist prevents renal inflammation in early diabetes. J Cardiovasc Pharmacol 65:371–376. doi: 10.1097/FJC.0000000000000207

Mateos L, Perez-Alvarez MJ, Wandosell F (2016) Angiotensin II type-2 receptor stimulation induces neuronal VEGF synthesis after cerebral ischemia. Biochim Biophys Acta 1862:1297–1308. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.03.013

Mathews WR, Kerr SW (1993) Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. J Pharmacol Exp Ther 267:1529–1537

Mayer B, Kleschyov AL, Stessel H, et al (2009) Inactivation of soluble guanylate cyclase by stoichiometric S-nitrosation. Mol Pharmacol 75:886–891. doi: 10.1124/mol.108.052142

Mazor D, Greenberg L, Shamir D, et al (2006) Antioxidant properties of bucillamine: possible mode of action. Biochem Biophys Res Commun 349:1171–1175. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.08.155

Mederos Y Schnitzler M, Storch U, Gudermann T (2016) Mechanosensitive Gq/11 Protein-Coupled Receptors Mediate Myogenic Vasoconstriction. Microcirc N Y N 1994 23:621–625. doi: 10.1111/micc.12293

Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, et al (2008) Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. EMBO J 27:3092–3103. doi: 10.1038/emboj.2008.233

Megson IL, Webb DJ (2002) Nitric oxide donor drugs: current status and future trends. Expert Opin Investig Drugs 11:587–601. doi: 10.1517/13543784.11.5.587

Mehta PK, Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol 292:C82-97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006

Michel MC, Wieland T, Tsujimoto G (2009) How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 379:385–388. doi: 10.1007/s00210-009-0395-y

Miller CC, Carter AT, Brooks JI, et al (1989) Differential extra-renal expression of the mouse renin genes. Nucleic Acids Res 17:3117–3128

Miller MR, Roseberry MJ, Mazzei FA, et al (2000) Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryltrinitrate-tolerant rat femoral arteries. Eur J Pharmacol 408:335–343

Miyamoto A, Laufs U, Pardo C, Liao JK (1997) Modulation of bradykinin receptor ligand binding affinity and its coupled G-proteins by nitric oxide. J Biol Chem 272:19601–19608

Molloy J, Martin JF, Baskerville PA, et al (1998) S-Nitrosoglutathione Reduces the Rate of Embolization in Humans. Circulation 98:1372–1375. doi: 10.1161/01.CIR.98.14.1372

Mordorski B, Pelgrift R, Adler B, et al (2015) S-nitrosocaptopril nanoparticles as nitric oxide-liberating and transnitrosylating anti-infective technology. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med 11:283–291. doi: 10.1016/j.nano.2014.09.017

Moriel P, Pereira IR, Bertolami MC, Abdalla DS (2001) Is ceruloplasmin an important catalyst for S-nitrosothiol generation in hypercholesterolemia? Free Radic Biol Med 30:318–326

Mujić-Delić A, de Wit RH, Verkaar F, Smit MJ (2014) GPCR-targeting nanobodies: attractive research tools, diagnostics, and therapeutics. Trends Pharmacol Sci 35:247–255. doi: 10.1016/j.tips.2014.03.003

Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, et al (1993) Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. J Biol Chem 268:24539–24542

Mullens W, Abrahams Z, Francis GS, et al (2008) Sodium nitroprusside for advanced low-output heart failure. J Am Coll Cardiol 52:200–207. doi: 10.1016/j.jacc.2008.02.083

Münzel T, Daiber A, Mülsch A (2005) Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. Circ Res 97:618–628. doi: 10.1161/01.RES.0000184694.03262.6d

Murad F (1986) Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. J Clin Invest 78:1–5

Murphy E, Kohr M, Menazza S, et al (2014) Signaling by S-Nitrosylation in the Heart. J Mol Cell Cardiol 73:18–25. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.003

Murphy E, Kohr M, Sun J, et al (2012) S-nitrosylation: a radical way to protect the heart. J Mol Cell Cardiol 52:568–577. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.08.021

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, et al (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. Nature 351:233–236. doi: 10.1038/351233a0

Murray CJ, Lopez AD (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet Lond Engl 349:1269–1276. doi: 10.1016/S0140-6736(96)07493-4

Nakajima M, Mukoyama M, Pratt RE, et al (1993) Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. Biochem Biophys Res Commun 197:393–399. doi: 10.1006/bbrc.1993.2492

Näveri L, Strömberg C, Saavedra JM (1994) Angiotensin II AT1 receptor mediated contraction of the perfused rat cerebral artery. Neuroreport 5:2278–2280

Nickenig G, Bäumer AT, Grohè C, et al (1998) Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. Circulation 97:2197–2201

Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S, et al (2000) Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. Circulation 102:1828–1833

*Niederhoffer N, Marque V, Lartaud-Idjouadiene I, et al (1997) Vasodilators, Aortic Elasticity, and Ventricular End-Systolic Stress in Nonanesthetized, Unrestrained Rats. Hypertension 30:1169–1174. doi: 10.1161/01.HYP.30.5.1169

Nishimura Y, Ito T, Saavedra JM (2000) Angiotensin II AT(1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. Stroke 31:2478–2486

Nozik-Grayck E, McMahon TJ, Huang Y-CT, et al (2002) Pulmonary vasoconstriction by serotonin is inhibited by S-nitrosoglutathione. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282:L1057-1065. doi: 10.1152/ajplung.00081.2001

Nozik-Grayck E, Whalen EJ, Stamler JS, et al (2006) S-nitrosoglutathione inhibits alpha1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290:L136-143. doi: 10.1152/ajplung.00230.2005

O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, et al (2010) Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. Lancet Lond Engl 376:112–123. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60834-3

Oestreicher EM, Guo C, Seely EW, et al (2006) Estradiol increases proteinuria and angiotensin II type 1 receptor in kidneys of rats receiving L-NAME and angiotensin II. Kidney Int 70:1759–1768. doi: 10.1038/sj.ki.5001897

Oh K-S, Oh BK, Park CH, et al (2012) Baicalein potently inhibits Rho kinase activity and suppresses actin stress fiber formation in angiotensin II-stimulated H9c2 cells. Biol Pharm Bull 35:1281–1286

Oh K-S, Oh BK, Park CH, et al (2013) Cardiovascular effects of a novel selective Rho kinase inhibitor, 2-(1H-indazole-5-yl)amino-4-methoxy-6-piperazino triazine (DW1865). Eur J Pharmacol 702:218–226. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.027

Ohtsu H, Mifune M, Frank GD, et al (2005) Signal-crosstalk between Rho/ROCK and c-Jun NH2-terminal kinase mediates migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:1831–1836. doi: 10.1161/01.ATV.0000175749.41799.9b

Ohyama K, Yamano Y, Sano T, et al (1995) Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA. Regul Pept 57:141–147

Ohyama K, Yamano Y, Sano T, et al (2002) Role of the conserved DRY motif on G protein activation of rat angiotensin II receptor type 1A. Biochem Biophys Res Commun 292:362–367. doi: 10.1006/bbrc.2002.6670

Omura-Matsuoka E, Yagita Y, Sasaki T, et al (2009) Postischemic administration of angiotensin II type 1 receptor blocker reduces cerebral infarction size in hypertensive rats. Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens 32:548–553. doi: 10.1038/hr.2009.69

Opelt M, Wölkart G, Eroglu E, et al (2018) Sustained Formation of Nitroglycerin-Derived Nitric Oxide by Aldehyde Dehydrogenase-2 in Vascular Smooth Muscle without Added Reductants: Implications for the Development of Nitrate Tolerance. Mol Pharmacol 93:335–343. doi: 10.1124/mol.117.110783

Page IH (1939) ON THE NATURE OF THE PRESSOR ACTION OF RENIN. J Exp Med 70:521–542

Pandey A, Gaikwad AB (2017) Compound 21 and Telmisartan combination mitigates type 2 diabetic nephropathy through amelioration of caspase mediated apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 487:827–833. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.134

Pang PS, Butler J, Collins SP, et al (2017) Biased ligand of the angiotensin II type 1 receptor in patients with acute heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIB, dose ranging trial (BLAST-AHF). Eur Heart J 38:2364–2373. doi: 10.1093/eurheartj/ehx196

*Parent M, Boudier A, Dupuis F, et al (2013a) Are in situ formulations the keys for the therapeutic future of S-nitrosothiols? Eur J Pharm Biopharm 85:640–649. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.08.005

*Parent M, Boudier A, Perrin J, et al (2015) In Situ Microparticles Loaded with S-Nitrosoglutathione Protect from Stroke. PLOS ONE 10:e0144659. doi: 10.1371/journal.pone.0144659

*Parent M, Dahboul F, Schneider R, et al (2013b) A Complete Physicochemical Identity Card of S-nitrosoglutathione. Curr Pharm Anal 9:31–42. doi: 10.2174/157341213804806098

*Parent M, Dupuis F, Vigneron C, et al (2013c) Quel avenir en thérapeutique cardiovasculaire pour le monoxyde d'azote et ses dérivés ? Ann Pharm Fr 71:84–94. doi: 10.1016/j.pharma.2012.12.004

Pathan AR, Karwa M, Pamidiboina V, et al (2010) Oral bioavailability, efficacy and gastric tolerability of P2026, a novel nitric oxide-releasing diclofenac in rat. Inflammopharmacology 18:157–168. doi: 10.1007/s10787-010-0043-7

Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L (1990) Cerebral autoregulation. Cerebrovasc Brain Metab Rev 2:161–192

*Perrin-Sarrado C, Salgues V, Giummelly P, et al (2017) Ability of Different S-Nitrosothiols to Induce Vascular Storage of Nitric Oxide and to Decrease Vasoconstrictive Capacities of Isolated Rat Aortae. Abstr. Postgrad. Train. Netw. Nutr. 2017 12

Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, et al (2002) Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. Science 298:834–836. doi: 10.1126/science.1074683

Phillips IM (1987) Functions of Angiotensin in the Central Nervous System. Annu Rev Physiol 49:413–433. doi: 10.1146/annurev.ph.49.030187.002213

Pobiner BF, Northup JK, Bauer PH, et al (1991) Inhibitory GTP-binding regulatory protein Gi3 can couple angiotensin II receptors to inhibition of adenylyl cyclase in hepatocytes. Mol Pharmacol 40:156–167

Poitras M, Sidibé A, Richard DE, et al (1998) Effect of uncoupling agents on AT1 receptor affinity for antagonist analogs of angiotensin II. Receptors Channels 6:65–72

Pörsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M (1994) Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. Br J Pharmacol 111:652–654

Pradidarcheep W, Stallen J, Labruyère WT, et al (2009) Lack of specificity of commercially available antisera against muscarinergic and adrenergic receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 379:397–402. doi: 10.1007/s00210-009-0393-0

PROGRESS Collaborative Group (2001) Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. Lancet Lond Engl 358:1033–1041. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06178-5

Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. Nat Rev Drug Discov 9:373–386. doi: 10.1038/nrd3024

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. J Clin Invest 97:1916–1923

Rakesh K, Yoo B, Kim I-M, et al (2010) beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. Sci Signal 3:ra46. doi: 10.1126/scisignal.2000769

Ramkhelawon B, Vilar J, Rivas D, et al (2009) Shear stress regulates angiotensin type 1 receptor expression in endothelial cells. Circ Res 105:869–875. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.204040

Rapoport RM, Draznin MB, Murad F (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. Nature 306:174–176

Rashid P, Weaver C, Leonardi-Bee J, et al (2003) The effects of transdermal glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor, on blood pressure, cerebral and cardiac hemodynamics, and plasma nitric oxide levels in acute stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc 12:143–151. doi: 10.1016/S1052-3057(03)00037-5

Rathinasabapathy A, Horowitz A, Horton K, et al (2018) The Selective Angiotensin II Type 2 Receptor Agonist, Compound 21, Attenuates the Progression of Lung Fibrosis and Pulmonary Hypertension in an Experimental Model of Bleomycin-Induced Lung Injury. Front Physiol 9:. doi: 10.3389/fphys.2018.00180

Ravi K, Brennan LA, Levic S, et al (2004) S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. Proc Natl Acad Sci U S A 101:2619–2624

Ribeiro VS, Cabral EV, Vieira LD, et al (2018) Perinatal α-tocopherol overload programs alterations in kidney development and renal angiotensin II signaling pathways at birth and at juvenile age: Mechanisms underlying the development of elevated blood pressure. Biochim Biophys Acta. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.04.007

Ricchiuti V, Lapointe N, Pojoga L, et al (2011) Dietary sodium intake regulates angiotensin II type 1, mineralocorticoid receptor, and associated signaling proteins in heart. J Endocrinol 211:47–54. doi: 10.1530/JOE-10-0458

Rimar S, Gillis CN (1993) Selective pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide is due to hemoglobin inactivation. Circulation 88:2884–2887

Ritchie RH, Schiebinger RJ, LaPointe MC, Marsh JD (1998) Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide. Am J Physiol 275:H1370-1374

Rossi R, Giustarini D, Milzani A, et al (2001) Physiological Levels of S-Nitrosothiols in Human Plasma. Circ Res 89:e47–e47

Rovati GE, Capra V, Neubig RR (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. Mol Pharmacol 71:959–964. doi: 10.1124/mol.106.029470

Rubanyi GM, Vanhoutte PM (1986) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. Am J Physiol 250:H822-827. doi: 10.1152/ajpheart.1986.250.5.H822

Saavedra JM, Fernandez-Pardal J, Chevillard C (1982) Angiotensin-converting enzyme in discrete areas of the rat forebrain and pituitary gland. Brain Res 245:317–325

Saavedra JM, Sánchez-Lemus E, Benicky J (2011) Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. Psychoneuroendocrinology 36:1–18. doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.10.001

Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, et al (1997) Risk Factors. Stroke 28:1507–1517. doi: 10.1161/01.STR.28.7.1507

Salem S, Jankowski V, Asare Y, et al (2015) Identification of the Vasoconstriction-Inhibiting Factor (VIF), a Potent Endogenous Cofactor of Angiotensin II Acting on the Angiotensin II Type 2 Receptor. Circulation 131:1426–1434. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013168

Sampaio WO, Nascimento AAS, Santos RAS (2003) Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 284:H1985-1994. doi: 10.1152/ajpheart.01145.2002

Sandset EC, Bath PMW, Boysen G, et al (2011) The angiotensin-receptor blocker candesartan for treatment of acute stroke (SCAST): a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. Lancet Lond Engl 377:741–750. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60104-9

Santos RA (2014) Angiotensin-(1–7). Hypertension 63:1138–1147. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01274

Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, et al (2004) Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. Physiol Genomics 17:292–299. doi: 10.1152/physiolgenomics.00227.2003

Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, et al (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. Proc Natl Acad Sci U S A 100:8258–8263. doi: 10.1073/pnas.1432869100

Sarr M, Chataigneau M, Etienne-Selloum N, et al (2007) Targeted and persistent effects of NO mediated by S-nitrosation of tissue thiols in arteries with endothelial dysfunction. Nitric Oxide Biol Chem 17:1–9. doi: 10.1016/j.niox.2007.04.003

Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, et al (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. Nature 351:230–233. doi: 10.1038/351230a0

Sasaki S, Higashi Y, Nakagawa K, et al (2001) Effects of Angiotensin-(1-7) on Forearm Circulation in Normotensive Subjects and Patients With Essential Hypertension. Hypertension 38:90–94. doi: 10.1161/01.HYP.38.1.90

Savage PD, Lovato J, Brosnihan KB, et al (2016) Phase II Trial of Angiotensin-(1-7) for the Treatment of Patients with Metastatic Sarcoma. Sarcoma 2016:. doi: 10.1155/2016/4592768

Savoia C, Ebrahimian T, He Y, et al (2006) Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. J Hypertens 24:2417–2422. doi: 10.1097/01.hjh.0000251902.85675.7e

Savoia C, Tabet F, Yao G, et al (2005) Negative regulation of RhoA/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 23:1037–1045

Schinzari F, Tesauro M, Veneziani A, et al (2018) Favorable Vascular Actions of Angiotensin-(1-7) in Human Obesity. Hypertens Dallas Tex 1979 71:185–191. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10280

Schleifenbaum J, Kassmann M, Szijártó IA, et al (2014) Stretch-activation of angiotensin II type 1a receptors contributes to the myogenic response of mouse mesenteric and renal arteries. Circ Res 115:263–272. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.302882

Schonhoff CM, Gaston B, Mannick JB (2003) Nitrosylation of Cytochrome c during Apoptosis. J Biol Chem 278:18265–18270. doi: 10.1074/jbc.M212459200

Schrader J, Kulschewski A, Dendorfer A (2007) Inhibition of the renin-angiotensin system and the prevention of stroke. Am J Cardiovasc Drugs Drugs Devices Interv 7:25–37

Schrader J, Lüders S, Kulschewski A, et al (2003) The ACCESS Study: evaluation of Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. Stroke 34:1699–1703. doi: 10.1161/01.STR.0000075777.18006.89

Schubert R, Mulvany MJ (1999) The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. Clin Sci Lond Engl 1979 96:313–326

Seabra AB, Fitzpatrick A, Paul J, et al (2004) Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. Br J Dermatol 151:977–983. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.06213.x

Selemidis S, Dusting GJ, Peshavariya H, et al (2007) Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. Cardiovasc Res 75:349–358. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.030

Semple PF, Boyd AS, Dawes PM, Morton JJ (1976) Angiotensin II and its heptapeptide (2-8), hexapeptide (3-8), and pentapeptide (4-8) metabolites in arterial and venous blood of man. Circ Res 39:671–678

Sernia C, Mowchanuk MD (1983) Brain angiotensinogen: in vitro synthesis and chromatographic characterization. Brain Res 259:275–283

Servant G, Dudley DT, Escher E, Guillemette G (1994) The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of N-glycosylation. Mol Pharmacol 45:1112–1118

Servant G, Dudley DT, Escher E, Guillemette G (1996) Analysis of the role of N-glycosylation in cell-surface expression and binding properties of angiotensin II type-2 receptor of rat pheochromocytoma cells. Biochem J 313 (Pt 1):297–304

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, et al (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. Circ Res 91:406–413

*Shah SU, Socha M, Sejil C, Gibaud S (2017) Spray-dried microparticles of glutathione and S-nitrosoglutathione based on Eudragit® FS 30D polymer. Ann Pharm Fr 75:95–104. doi: 10.1016/j.pharma.2016.09.001

Sharma NM, Zheng H, Li Y-F, Patel KP (2012) Nitric oxide inhibits the expression of AT1 receptors in neurons. Am J Physiol Cell Physiol 302:C1162-1173. doi: 10.1152/ajpcell.00258.2011

Shinohara T, Harada M, Ogi K, et al (2004) Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine. J Biol Chem 279:23559–23564. doi: 10.1074/jbc.M314240200

Siragy HM, Carey RM (1996) The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats. J Clin Invest 97:1978–1982. doi: 10.1172/JCI118630

Siragy HM, Carey RM (1997) The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. J Clin Invest 100:264–269

Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS, Carey RM (1996) Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. Am J Physiol 271:R1090-1095. doi: 10.1152/ajpregu.1996.271.4.R1090

Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP (1956) The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. J Exp Med 103:295–299

Skeggs LT, Lentz KE, Gould AB, et al (1967) Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system. Fed Proc 26:42–47

Skeggs LT, Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP (1954) THE EXISTENCE OF TWO FORMS OF HYPERTENSIN. J Exp Med 99:275–282

Sogo Naoki, Campanella Ciro, Webb David J, Megson Ian L (2009) S-Nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery. Br J Pharmacol 131:1236–1244. doi: 10.1038/sj.bjp.0703700

Sokoloff L (1997) 1 - Anatomy of Cerebral Circulation. In: Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, et al. (eds) Primer on Cerebrovascular Diseases. Academic Press, San Diego, pp 3–5

Sosa-Canache B, Cierco M, Gutierrez CI, Israel A (2000) Role of bradykinins and nitric oxide in the AT2 receptor-mediated hypotension. J Hum Hypertens 14 Suppl 1:S40-46

Souza JM, Peluffo G, Radi R (2008) Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? Free Radic Biol Med 45:357–366. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.010

Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, et al (1992a) Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. Proc Natl Acad Sci U S A 89:7674–7677

Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, et al (1992b) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. Proc Natl Acad Sci U S A 89:444–448

Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ (1997) (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. Neuron 18:691–696

Steckelings U, Lindblad L, Leisvuori A, et al (2017) [PP.02.17] SUCCESSFUL COMPLETION OF A PHASE I, RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO CONTROLLED, SINGLE ASCENDING DOSE TRIAL FOR THE FIRST IN CLASS ANGIOTENSIN AT2-RECEPTOR AGONIST COMPOUND 21. J Hypertens 35:e105. doi: 10.1097/01.hjh.0000523257.57873.95

Stenman E, Edvinsson L (2004) Cerebral ischemia enhances vascular angiotensin AT1 receptor-mediated contraction in rats. Stroke 35:970–974. doi: 10.1161/01.STR.0000121642.53822.58

Stockand JD, Silverman M, Hall D, et al (1998) Arachidonic acid potentiates the feedback response of mesangial BKCa channels to angiotensin II. Am J Physiol 274:F658-664

Strauss MH, Hall A (2009) Angiotensin receptor blockers should be regarded as first-line drugs for stroke prevention in both primary and secondary prevention settings: no. Stroke 40:3161–3162. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.559062

Strong K, Mathers C, Bonita R (2007) Preventing stroke: saving lives around the world. Lancet Neurol 6:182–187. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70031-5

Sugden PH, Clerk A (1997) Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. Cell Signal 9:337–351

Sugimura T, Sako K, Tohyama Y, Yonemasu Y (1998) Consecutive in vivo measurement of nitric oxide in transient forebrain ischemic rat under normothermia and hypothermia. Brain Res 808:313–316

Suzuki H, Kimura K, Shirai H, et al (2009) Endothelial nitric oxide synthase inhibits G12/13 and rho-kinase activated by the angiotensin II type-1 receptor: implication in vascular migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29:217–224. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.181024

Szarka N, Amrein K, Horvath P, et al (2017) Hypertension-Induced Enhanced Myogenic Constriction of Cerebral Arteries Is Preserved after Traumatic Brain Injury. J Neurotrauma 34:2315–2319. doi: 10.1089/neu.2016.4962

Takeuchi K, Mizoguchi H, Araki H, et al (2001) Lack of gastric toxicity of nitric oxide-releasing indomethacin, NCX-530, in experimental animals. Dig Dis Sci 46:1805–1818

Tam SW, Saha JK, Garvey DS, et al (2000) Nitrosothiol-based NO-donors inhibit the gastrointestinal mucosal damaging actions of NSAIDs. InflammoPharmacology 8:81–88. doi: 10.1023/B:INFL.0000041134.63836.63

Tanaka Y, Tamura K, Koide Y, et al (2005) The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. FEBS Lett 579:1579–1586. doi: 10.1016/j.febslet.2005.01.068

Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, et al (2004) Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 287:C494-499. doi: 10.1152/ajpcell.00439.2003

Teixeira LB, Parreiras-e-Silva LT, Bruder-Nascimento T, et al (2017) Ang-(1-7) is an endogenous β-arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy. Sci Rep 7:. doi: 10.1038/s41598-017-12074-3

Tetzner A, Gebolys K, Meinert C, et al (2016) G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. Hypertens Dallas Tex 1979 68:185–194. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07572

Thomas WG, Qian H, Chang C-S, Karnik S (2000) Agonist-induced Phosphorylation of the Angiotensin II (AT1A) Receptor Requires Generation of a Conformation That Is Distinct from the Inositol Phosphate-signaling State. J Biol Chem 275:2893–2900. doi: 10.1074/jbc.275.4.2893

Thrift AG, Dewey HM, Macdonell RAL, et al (2001) Incidence of the Major Stroke Subtypes: Initial Findings From the North East Melbourne Stroke Incidence Study (NEMESIS). Stroke 32:1732–1738. doi: 10.1161/01.STR.32.8.1732

Tigerstedt R, Bergman PQ (1898) Niere und Kreislauf1. Skand Arch Für Physiol 8:223–271. doi: 10.1111/j.1748-1716.1898.tb00272.x

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, et al (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. Pharmacol Rev 45:205–251

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, et al (2000) A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. J Biol Chem 275:33238–33243. doi: 10.1074/jbc.M002615200

Tissir F, Rivière M, Guo D-F, et al (1995) Localization of the genes encoding the three rat angiotensin II receptors, Agtr1a, Agtr1b, Agtr2, and the human AGTR2 receptor respectively to rat chromosomes 17q12, 2q24 and Xq34, and the human Xq22. Cytogenet Genome Res 71:77–80. doi: 10.1159/000134067

Toth P, Csiszar A, Sosnowska D, et al (2013a) Treatment with the cytochrome P450 ω-hydroxylase inhibitor HET0016 attenuates cerebrovascular inflammation, oxidative stress and improves vasomotor function in spontaneously hypertensive rats. Br J Pharmacol 168:1878–1888. doi: 10.1111/bph.12079

Toth P, Csiszar A, Tucsek Z, et al (2013b) Role of 20-HETE, TRPC channels, and BKCa in dysregulation of pressure-induced Ca2+ signaling and myogenic constriction of cerebral arteries in aged hypertensive mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 305:H1698-1708. doi: 10.1152/ajpheart.00377.2013

Toth P, Tucsek Z, Sosnowska D, et al (2013c) Age-related autoregulatory dysfunction and cerebromicrovascular injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab 33:1732–1742. doi: 10.1038/jcbfm.2013.143

Touyz RM (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol 37:1263–1273. doi: /S0100-879X2004000800018

Touyz RM, Endemann D, He G, et al (1999) Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. Hypertens Dallas Tex 1979 33:366–372

Touyz RM, Schiffrin EL (2000) Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. Pharmacol Rev 52:639–672

Touyz RM, Yao G, Quinn MT, et al (2005) p47phox Associates With the Cytoskeleton Through Cortactin in Human Vascular Smooth Muscle Cells: Role in NAD(P)H Oxidase Regulation by Angiotensin II. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:512–518. doi: 10.1161/01.ATV.0000154141.66879.98

Tsai EJ, Kass DA (2009) Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. Pharmacol Ther 122:216–238. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.02.009

Tsikas D, Sandmann J, Gutzki FM, et al (1999) Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry. II. Quantitative determination of S-nitrosoalbumin in human plasma using S-[15N]nitrosoalbumin as internal standard. J Chromatogr B Biomed Sci App 726:13–24

Tsikas D, Schmidt M, Böhmer A, et al (2013) UPLC-MS/MS measurement of S-nitrosoglutathione (GSNO) in human plasma solves the S-nitrosothiol concentration enigma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 927:147–157. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.01.023

Tsutsumi K, Saavedra JM (1991) Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. Am J Physiol 261:R209-216. doi: 10.1152/ajpregu.1991.261.1.R209

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, et al (1999) Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. J Clin Invest 104:925–935. doi: 10.1172/JCI7886

Turko IV, Murad F (2002) Protein nitration in cardiovascular diseases. Pharmacol Rev 54:619–634

Turner CA, Cooper S, Pulakat L (1999) Role of the His273 located in the sixth transmembrane domain of the angiotensin II receptor subtype AT2 in ligand-receptor interaction. Biochem Biophys Res Commun 257:704–707. doi: 10.1006/bbrc.1999.0207

Underbakke ES, Iavarone AT, Chalmers MJ, et al (2014) Nitric oxide-induced conformational changes in soluble guanylate cyclase. Struct Lond Engl 1993 22:602–611. doi: 10.1016/j.str.2014.01.008

Uno M, Nishimura S, Fukuchi K, et al (2012) Identification of physiologically active substances as novel ligands for MRGPRD. J Biomed Biotechnol 2012:816159. doi: 10.1155/2012/816159

Urata H, Healy B, Stewart RW, et al (1990) Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. Circ Res 66:883–890

Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, et al (1996) p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 271:23317–23321

Usui M, Ichiki T, Katoh M, et al (1998) Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. Hypertens Dallas Tex 1979 32:527–533

Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, et al (2011) Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. FASEB J 25:2433–2446. doi: 10.1096/fj.10-180331

Verbrugghe P, Verhoeven J, Clijsters M, et al (2018) The Effect of a Nonpeptide Angiotensin II Type 2 Receptor Agonist, Compound 21, on Aortic Aneurysm Growth in a Mouse Model of Marfan Syndrome. J Cardiovasc Pharmacol 71:215–222. doi: 10.1097/FJC.0000000000000560

Verdonk K, Durik M, Abd-Alla N, et al (2012) Compound 21 induces vasorelaxation via an endothelium- and angiotensin II type 2 receptor-independent mechanism. Hypertens Dallas Tex 1979 60:722–729. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.196022

*Vincent J-M, Kwan YW, Chan SL, et al (2005) Constrictor and dilator effects of angiotensin II on cerebral arterioles. Stroke 36:2691–2695. doi: 10.1161/01.STR.0000190002.79052.bf

Vollmer JY, Alix P, Chollet A, et al (1999) Subcellular compartmentalization of activation and desensitization of responses mediated by NK2 neurokinin receptors. J Biol Chem 274:37915–37922

von Anrep G (1912) On local vascular reactions and their interpretation. J Physiol 45:318–327

Wackenfors A, Vikman P, Nilsson E, et al (2006) Angiotensin II-induced vasodilatation in cerebral arteries is mediated by endothelium-derived hyperpolarising factor. Eur J Pharmacol 531:259–263. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.11.064

Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, et al (2004) Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. J Med Chem 47:5995–6008. doi: 10.1021/jm049715t

Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM (2012) Serotonin and blood pressure regulation. Pharmacol Rev 64:359–388. doi: 10.1124/pr.111.004697

Weinreb RN, Ong T, Scassellati Sforzolini B, et al (2015) A randomised, controlled comparison of latanoprostene bunod and latanoprost 0.005% in the treatment of ocular hypertension and open angle glaucoma: the VOYAGER study. Br J Ophthalmol 99:738–745. doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305908

Weinreb RN, Scassellati Sforzolini B, Vittitow J, Liebmann J (2016) Latanoprostene Bunod 0.024% versus Timolol Maleate 0.5% in Subjects with Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension: The APOLLO Study. Ophthalmology 123:965–973. doi: 10.1016/j.ophtha.2016.01.019

Weir MR, Dzau VJ (1999) The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. Am J Hypertens 12:205S-213S

Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. Physiol Rev 85:1159–1204. doi: 10.1152/physrev.00003.2005

Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M (1989) Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. Biochem Biophys Res Commun 163:284–291

Wiemer G, Schölkens BA, Wagner A, et al (1993) The possible role of angiotensin II subtype AT2 receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts. J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens 11:S234-235

Willmot M, Ghadami A, Whysall B, et al (2006) Transdermal glyceryl trinitrate lowers blood pressure and maintains cerebral blood flow in recent stroke. Hypertens Dallas Tex 1979 47:1209–1215. doi: 10.1161/01.HYP.0000223024.02939.1e

Willmot M, Gray L, Gibson C, et al (2005) A systematic review of nitric oxide donors and L-arginine in experimental stroke; effects on infarct size and cerebral blood flow. Nitric Oxide Biol Chem 12:141–149. doi: 10.1016/j.niox.2005.01.003

Wilsdorf T, Gainer JV, Murphey LJ, et al (2001) Angiotensin-(1-7) does not affect vasodilator or TPA responses to bradykinin in human forearm. Hypertens Dallas Tex 1979 37:1136–1140

Wing LMH, Reid CM, Ryan P, et al (2003) A Comparison of Outcomes with Angiotensin-Converting–Enzyme Inhibitors and Diuretics for Hypertension in the Elderly. N Engl J Med 348:583–592. doi: 10.1056/NEJMoa021716

Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, et al (1993) Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. Arch Biochem Biophys 300:115–123. doi: 10.1006/abbi.1993.1016

Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, et al (2008) G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. Nat Med 14:64–68. doi: 10.1038/nm1666

*Wu W, Gaucher C, Fries I, et al (2015) Polymer nanocomposite particles of S-nitrosoglutathione: A suitable formulation for protection and sustained oral delivery. Int J Pharm 495:354–361. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.074

*Wu W, Perrin-Sarrado C, Ming H, et al (2016) Polymer nanocomposites enhance S-nitrosoglutathione intestinal absorption and promote the formation of releasable nitric oxide stores in rat aorta. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med 12:1795–1803. doi: 10.1016/j.nano.2016.05.006

Xavier C, Vaneycken I, D'huyvetter M, et al (2013) Synthesis, preclinical validation, dosimetry, and toxicity of 68Ga-NOTA-anti-HER2 Nanobodies for iPET imaging of HER2 receptor expression in cancer. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med 54:776–784. doi: 10.2967/jnumed.112.111021

Yamano Y, Ohyama K, Chaki S, et al (1992) Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. Biochem Biophys Res Commun 187:1426–1431

Yamano Y, Ohyama K, Kikyo M, et al (1995) Mutagenesis and the Molecular Modeling of the Rat Angiotensin II Receptor (AT1). J Biol Chem 270:14024–14030. doi: 10.1074/jbc.270.23.14024

Yang R, Smolders I, Vanderheyden P, et al (2011) Pressor and renal hemodynamic effects of the novel angiotensin A peptide are angiotensin II type 1A receptor dependent. Hypertens Dallas Tex 1979 57:956–964. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.161836

Yasuda N, Miura S, Akazawa H, et al (2008) Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. EMBO Rep 9:179–186. doi: 10.1038/sj.embor.7401157

Yayama K, Hiyoshi H, Imazu D, Okamoto H (2006) Angiotensin II stimulates endothelial NO synthase phosphorylation in thoracic aorta of mice with abdominal aortic banding via type 2 receptor. Hypertens Dallas Tex 1979 48:958–964. doi: 10.1161/01.HYP.0000244108.30909.27

Yee DK, Kisley LR, Heerding JN, Fluharty SJ (1997) Mutation of a conserved fifth transmembrane domain lysine residue (Lys215) attenuates ligand binding in the angiotensin II type 2 receptor. Brain Res Mol Brain Res 51:238–241

Yim HE, Yoo KH, Bae IS, Hong YS (2017) Early Treatment With Enalapril and Later Renal Injury in Programmed Obese Adult Rats. J Cell Physiol 232:447–455. doi: 10.1002/jcp.25444

You D, Loufrani L, Baron C, et al (2005) High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. Circulation 111:956–957. doi: 10.1161/01.CIR.0000156503.62815.48

Young BM, Nguyen E, Chedrawe MAJ, et al (2017) Differential Contribution of Transmembrane Domains IV, V, VI, and VII to Human Angiotensin II Type 1 Receptor Homomer Formation. J Biol Chem 292:3341–3350. doi: 10.1074/jbc.M116.750380

Yu M, Sun C-W, Maier KG, et al (2002) Mechanism of cGMP contribution to the vasodilator response to NO in rat middle cerebral arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol 282:H1724-1731. doi: 10.1152/ajpheart.00699.2001

Yusuf S, Diener H-C, Sacco RL, et al (2008a) Telmisartan to Prevent Recurrent Stroke and Cardiovascular Events. N Engl J Med 359:1225–1237. doi: 10.1056/NEJMoa0804593

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, et al (2000) Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. N Engl J Med 342:145–153. doi: 10.1056/NEJM200001203420301

Yusuf S, Teo K, Anderson C, et al (2008b) Effects of the angiotensin-receptor blocker telmisartan on cardiovascular events in high-risk patients intolerant to angiotensin-converting enzyme inhibitors: a randomised controlled trial. Lancet Lond Engl 372:1174–1183. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61242-8

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, et al (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. Hypertens Dallas Tex 1979 32:488–495

Zhang J, Pratt RE (1996) c. J Biol Chem 271:15026–15033. doi: 10.1074/jbc.271.25.15026

Zhang X, Huang B, Zhang L, et al (2012) SNObase, a database for S-nitrosation modification. Protein Cell 3:929–933. doi: 10.1007/s13238-012-2094-6

Zhao Y, Zhu Q, Sun S, et al (2018) Renal transplantation increases angiotensin II receptor-mediated vascular contractility associated with changes of epigenetic mechanisms. Int J Mol Med 41:2375–2388. doi: 10.3892/ijmm.2018.3435

Zhou J, Ando H, Macova M, et al (2005) Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab 25:878–886. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600082

Zhou J, Pavel J, Macova M, et al (2006) AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats. Stroke 37:1271–1276. doi: 10.1161/01.STR.0000217404.64352.d7

Zou Y, Akazawa H, Qin Y, et al (2004) Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. Nat Cell Biol 6:499–506. doi: 10.1038/ncb1137

Zuckerbraun BS, Stoyanovsky DA, Sengupta R, et al (2007) Nitric oxide-induced inhibition of smooth muscle cell proliferation involves S-nitrosation and inactivation of RhoA. Am J Physiol Cell Physiol 292:C824-831. doi: 10.1152/ajpcell.00592.2005

IMPORTANCE DE LA *S*-NITROSATION DES RÉCEPTEURS CÉRÉBROVASCULAIRES DE L'ANGIOTENSINE II

Les accidents vasculaires cérébraux sont la deuxième cause de mortalité dans le monde, le développement de nouvelles thérapeutiques est donc urgent. Deux acteurs jouent un rôle majeur dans la régulation de la circulation cérébrale : le monoxyde d'azote (NO) et le système rénine angiotensine (SRA).

Le chapitre 1 de ce manuscrit s'intéresse tout d'abord au NO, son rôle physiologique et ses voies de signalisation. Nous présentons les donneurs de NO disponibles sur le marché ainsi que ceux en développement. La bucillamine dinitrosée, développée dans notre laboratoire, fait l'objet d'une évaluation *in vitro* et *in vivo*. La deuxième partie de l'introduction s'intéresse au SRA, en rappelant son rôle prépondérant dans le maintien de la pression artérielle et de la régulation cérébrovasculaire. Nous présentons les récepteurs de l'angiotensine II (AngII), AT_1 et AT_2, responsables respectivement d'une vasoconstriction et d'une vasodilatation des artères cérébrales. Enfin la dernière partie présente la régulation des récepteurs de l'AngII par le NO, en particulier *via* la *S*-nitrosation du récepteur, la liaison d'un groupement NO sur une fonction thiol d'un résidu cystéine. Nous présentons les travaux de Leclerc qui montrent que l'exposition de cellules surexprimant le récepteur AT_1 à un donneur de NO entraine une diminution d'affinité de l'AngII pour AT_1 (Leclerc *et al*., 2006).

Le chapitre 2 est consacré aux études expérimentales. L'objectif des travaux présentés dans cette thèse est d'étudier l'importance de la *S*-nitrosation des récepteurs de l'AngII au niveau cérébrovasculaire. Tout d'abord nous abordons la problématique actuelle concernant l'aspécificité des anticorps anti-AT_1. Nous montrons que le nouvel anticorps monoclonal anti-AT_1, censé être plus spécifique, ne reconnaît pas AT_1 en western blot et en immunofluorescence, rendant donc son utilisation impossible. Nous faisons ensuite la démonstration pharmacologique des effets de la *S*-nitrosation sur les récepteurs de l'AngII. Nous montrons que l'exposition à un donneur de NO (*S*-nitrosoglutathion ou nitroprussiate de sodium) abolit spécifiquement la vasoconstriction médiée par AT_1 comparé à d'autres vasoconstricteurs partageant ou non sa voie de signalisation. De plus cette exposition abolit aussi le tonus myogénique AT_1-dépendant indépendant de la stimulation par l'AngII suggérant que l'altération survient sur le récepteur lui-même. Nous montrons par ailleurs que cet effet (i) ne dépend pas du NO endogène, (ii) se fait par une *S*-nitrosation plutôt que par la voie de la GMPc/GCs. Enfin nous étudions l'internalisation du récepteur par cytométrie en flux, sur un modèle hétérologue d'expression AT_1. Nos résultats montrent que le GSNO ne modifie pas la localisation d'AT_1 à la membrane et n'empêche pas son internalisation, indiquant que la voie β-arrestine n'est pas impactée par la nitrosation.

L'ensemble de ces résultats permet d'établir que la *S*-nitrosation d'AT_1 constitue une cible thérapeutique potentiellement intéressante dans les AVC, où l'augmentation de la vasoconstriction médiée par AT_1 est délétère.

Mots-clés : Monoxyde d'azote – Angiotensine II – *S*-nitrosation – circulation cérébrale – Récepteur AT_1

IMPORTANCE OF *S*-NITROSATION OF CEREBROVASCULAR ANGIOTENSIN II RECEPTORS

Stroke is the second leading cause of death worldwide, the development of new therapeutics is thus urgent. Two actors play a major role in the regulation of cerebral circulation: nitric oxide (NO) and the renin-angiotensin system (RAS).

The first chapter of this manuscript focuses on NO, its role and its signaling pathways. We present the available NO donors as well as those in development. Dinitrosobucillamine, a new NO donor developed in our team, is evaluated *in vitro* and *in vivo*. The second part of the introduction focuses on RAS and its preponderant role in blood pressure maintenance and cerebrovascular regulation. We present the angiotensin II (AngII) receptors, AT_1 and AT_2 responsible for vasoconstriction and vasodilation of cerebral arteries, respectively. Finally, the last part presents the regulation of AngII receptors by NO, in particular through *S*-nitrosation of the receptors, the covalent bound between NO and cysteine residues. We present the work of Leclerc, showing that exposure of cells overexpressing AT_1 to NO causes a decrease in AngII affinity for AT_1 (Leclerc *et al*., 2006).

The second chapter is devoted to the experimental studies. The objective of this work is to study the importance of AngII receptor *S*-nitrosation at the cerebrovascular level. First, we address the current problematic concerning the nonspecificity of anti-AT_1 antibodies. We show here that the new monoclonal anti-AT_1 antibody, which is supposed to be more specific, does not recognize AT_1 in western blot and immunofluorescence, making its use impossible. We then make a pharmacological demonstration of *S*-nitrosation effects on AngII receptors. We show that exposure to NO donors (*S*-nitrosoglutathione or sodium nitroprusside) specifically abolishes AT_1-mediated vasoconstriction compared to other vasoconstrictors sharing or not its signaling pathway. Moreover, this exposure also abolishes AT_1-mediated AngII-independent myogenic tone, suggesting an alteration on the receptor itself. We also show that this effect (i) does not depend on endogenous NO, (ii) is mediated by *S*-nitrosation rather than by the cGMP/sGC pathway. Finally, we study AT_1 internalization by flow cytometry on a heterologous model of AT_1 expression. Our results show that GSNO does not alter AT_1 cell surface localization and does not prevent its internalization, indicating that the β-arrestin pathway is not impacted by nitrosation.

Key words: Nitric oxide – Angiotensin II – *S*-nitrosation – cerebral circulation – AT_1 receptor