UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

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 bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

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

Ecole Doctorale BioSE
(Biologie-Santé-Environnement)
Laboratoire EA 3452 CITHEFOR

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 **Céline DELAITRE**

Sous la direction des Dr François DUPUIS et Dr Sandra LECAT

Caractérisation pharmacologique et fonctionnelle de ligands traceurs du récepteur AT_1 de l'angiotensine II pour l'étude de nouvelles approches thérapeutiques

Le 22 novembre 2023

Membres du jury :

Directeur de thèse	**Mr François DUPUIS**	**MCU, Université de Lorraine, EA 3452 CITHEFOR, Nancy, France**
Co-directrice de thèse	**Mme Sandra LECAT**	**CR, Université de Strasbourg, BSC UMR 7242, CNRS, Illkirch, France**
Présidente et rapportrice	**Mme Céline DEMOUGEOT**	**PR, Université de Bourgogne Franche-Comté, EA 4267 PEPITE, Besançon, France**
Rapporteur	**Mr Nicolas GILLES**	**DR, Université Paris-Saclay, CEA, DMTS, SIMoS, Gif-sur-Yvette, France**
Examinatrice	**Mme Karen MARTINEZ**	**Associate Professor, Université de Copenhague, Department of Chemistry and nano-Science Center, Frederiksberg, Denmark**
Examinateur	**Mr Daniel HENRION**	**DR, INSERM 1083, UMR 6015, CNRS, Université d'Angers, Angers, France**

Remerciements

A travers ces premières pages je souhaiterais remercier toutes les personnes sans qui cette aventure n'aurait pas été la même.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie le Dr. **Nicolas Gilles** pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit et le Pr. **Céline Demougeot** pour avoir suivi l'évolution de ce projet, contribué à son amélioration à travers nos différents échanges et avoir accepté d'être rapporteur de la fin de ce travail. Je remercie également le Dr. **Daniel Henrion** et le Dr. **Karen Martinez** de l'intérêt que vous portez pour ce projet et d'avoir accepté le rôle d'examinateur. Je ne doute pas que notre discussion sera enrichissante.

Je remercie aussi le Dr. **Sébastien Richard** pour ses conseils et ses encouragements lors de nos rencontres à mon comité de suivi de thèse.

Je remercie également le Pr. **Ariane Boudier** et le Dr. **Fréderic Simonin**, respectivement directrice de mon laboratoire d'accueil à Nancy et directeur de recherche de l'équipe « RCPGs, douleur et inflammation » de Strasbourg, de m'avoir accueilli au sein leur laboratoire.

Je remercie plus particulièrement le Dr. **François Dupuis** et le Dr. **Sandra Lecat**, respectivement directeur et co-directeur de ma thèse, pour votre encadrement et votre confiance en moi. Vous avez toujours pris le temps de discuter, me conseiller, me soutenir et m'encourager tout au long de ces trois années. Votre duo a su instaurer une parfaite harmonie entre passion pour la recherche et rigueur scientifique tout en me laissant un certain degré de liberté dans ce projet. J'ai énormément appris à vos côtés, tant humainement que scientifiquement, et je vous remercie infiniment d'avoir fait de moi la chercheuse que je suis devenue.

Je remercie les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer tout au long de ma thèse et qui m'ont aidé à faire progresser ce projet. Le Dr. **Michel Boisbrun** du laboratoire L2CM et le Dr. **Samir Acherar** et **Mathilde Achard** du LCPM, sans qui ce projet n'aurait pas débuté. Ainsi que l'ensemble du personnel de l'Animalerie Centrale ACBS qui m'a permis de travailler dans les meilleures conditions.

Je remercie de nouveau le Dr. **Karen Martinez** mais cette fois c'est pour son accueil au sein de son laboratoire à Copenhague où j'ai eu l'opportunité d'y effectuer un séjour bref mais intense. Je remercie également **André**, **Stylianos**, **Gabriella** et **Benjamin** d'avoir fait de mon séjour un moment inoubliable.

Mes remerciements vont maintenant à l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Strasbourg, **Valérie**, **Marie-Laure**, **Gabrielle**, **Océane**, **Claire** et surtout **Juliette** et **Rosine**, qui m'ont accueilli

dans leur équipe pendant près d'un an. Vous m'avez soutenu, encouragé et fait sortir la tête de la montagne de manips. Grace à vous, je garderai un très bon souvenir de mon passage en Alsace.

Je tiens à remercier très chaleureusement tous les membres du laboratoire CITHEFOR pour tous ces bons moments passés à vos côtés. Merci à **Anne**, **Caroline**, **Marianne** et **Isabelle** pour votre gentillesse, vos encouragements et vos conseils judicieux autour d'un bon café. Un grand merci à **Nathalie** qui a simplifié ma vie administrative toutes ces années. A **Arnaud**, **Thomas**, **Jérémie**, **Isabelle** et **Alexandra**, merci pour toutes ces discussions passionnantes, pour la plupart pas du tout scientifique, et les grands moments de joie et de rigolade. Cette bonne ambiance quotidienne était indispensable pour finir cette thèse sans trop de problèmes, je vous en remercie infiniment. J'ajoute une grande reconnaissance à **Alexandra** d'avoir accepté de m'aider à mener à bien les dernières manips « maudites », merci pour ta gentillesse et ta patience en plus de toutes tes qualités scientifiques.

A tous les doctorants qui nous ont montrés la voie, **Justine**, **Jordan**, **Margaux**, merci de nous avoir prouvé que c'était possible. A tous les doctorants présents, collègues de l'openspace, avec qui j'ai partagé mon bordélique bureau, **Rama**, **Mei-Ling**, **Synthia**, **Mélissa**, **Neila**, **Séphora** et **Célia**. Merci à tous les étudiants ayant contribué à ce travail, de ce laboratoire et d'autres horizons : **Louane**, **Jade**, **Aurore** et **Trung Minh**.

A **Célia** et **Séphora**, je vous suis éternellement reconnaissante pour votre aide, votre soutien et votre positivité dans les bons comme dans les mauvais moments. Nous avons partagé tant de choses ensemble, des rires aux larmes. Nos inestimables thérapies de groupe et nos tirages de cartes vont beaucoup me manquer… Notre projet d'élever des lamas au Canada reste dans un coin de ma tête.

Je remercie aussi tous mes amis, scientifiques ou non, qui ont été présents du début à la fin, même quand je faisais mon asociale et que je n'avais plus le temps de sortir. La liste serait très longue si je devais tous les citer donc merci à la team Imopa, à mes amis d'étude et à mes amis d'enfance !!

Un grand merci à mes parents et à mes frères. Ça y est, cette fois promis c'est vraiment la fin de mes études. Moi qui voulais chercher du boulot à Bac+2, le chemin a été plus long que prévu et cela n'aurait pas été possible sans votre soutien et vos encouragements. Je vous remercie du fond du cœur d'avoir toujours été là et d'avoir fait semblant de comprendre ce que je faisais. Je remercie également ma belle-famille pour tous les moments partagés ensemble.

Pour finir, un immense merci à **Kevin**, avec qui j'ai la chance de partager ma vie. Sans toi, je n'en serais certainement pas là aujourd'hui. Merci d'avoir toujours été présent, merci de me motiver tous les jours, merci de me redonner le sourire quand j'en ai besoin et merci de faire de mon quotidien un pur bonheur.

Valorisation des travaux de thèse

Publications

- **Céline Delaitre**, Michel Boisbrun, Samir Acherar, André Dias, Alexandra Kleinclauss, Mathilde Achard, Mélissa Colin, Trung Minh Nguyen, Karen L. Martinez, Sandra Lecat*, François Dupuis*(2023). Synthesis and pharmacological characterization of fluorescent ligands targeting the angiotensin II receptors derived from agonist, β-arrestin biased agonist and antagonist. En cours de soumission dans Journal of Medicinal Chemistry (IF : 8,039).

- Mélissa Colin, **Céline Delaitre**, Sébastien Foulquier, François Dupuis*(2023). The AT1/AT2 receptor equilibrium is a cornerstone of the regulation of the renin angiotensin system beyond the cardiovascular system. *Molecules* 28, 5481. 10.3390/molecules28145481 (IF : 4,6).

- **Céline Delaitre**, Michel Boisbrun, Sandra Lecat, François Dupuis*(2021). Targeting the Angiotensin II Type 1 Receptor in Cerebrovascular Diseases: Biased Signaling Raises New Hopes. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 6738. 10.3390/ijms22136738 (IF : 6,2).

Congrès et journées scientifiques

Présentation orale

- Journée scientifique 2023 de l'école doctorale BioSE, 03 mai 2023, Nancy (France) : « Pharmacological characterization of new Angiotensin II receptors fluorescent ligands as tracer for in vitro and in vivo labeling »

Poster

- Congrès ARTERY, 19-22 octobre 2022, Nancy (France) : « Physiological effects of a β-arrestins biased angiotensin II type 1 receptor agonist on cerebral circulation »; **Delaitre C**, Colin M, Lecat S, Acherar S, Foulquier S, Lartaud I, Dupuis F.

- 4GPCRnet International Symposium, 26-29 septembre 2022, Leipzig (Allemagne) : « Pharmacological characterization of new Angiotensin II receptors fluorescent ligands as tracer for in vitro and in vivo labeling »; **Delaitre C**, Boisbrun M, Acherar S, Colin M, Lecat S, Dupuis F

- International Research Network (IRN) on GPCRs, 30 novembre - 03 décembre 2021, congrès en ligne : « molecular and functionnal consequences », **Delaitre C**, Boisbrun M, Acherar S, Colin M, Lecat S, Dupuis F.

- Journée scientifique 2021 de l'école doctorale BioSE, 09 novembre 2021, Nancy (France) : « AT1 receptor S-nitrosation : molecular and functional consequences », **Delaitre C**, Lecat S, Dupuis F.

Collaboration internationale

Mise en place d'une collaboration internationale avec l'équipe du Dr. Karen Martinez du Département de Chimie et Centre de Nano-Sciences de l'Université de Copenhague – Mission scientifique à court terme effectuée du 13 mars au 21 avril 2023 avec financement ERNEST – Cost Action 18133

Encadrement

Louane Pellegrini (M2 Biotechnologies – NPA) du 02 janvier au 30 juin 2023 : Caractérisation pharmacologique *in vitro* et *ex vivo* de nouveaux traceurs des récepteurs AT_1 et AT_2 de l'angiotensine II

Jade Tomassone (L3 Sciences pour la Santé – Bio-ingénierie et Médicament) du 27 mars au 19 mai 2023, co-encadrement : Caractérisation pharmacologique *ex vivo* de nouveaux traceurs des récepteurs AT_1 et AT_2 de l'angiotensine II

Enseignement

96h d'enseignement en Licence Sciences de la Vie :

- Licence 1ère année : TD Trafic membranaire, TP de zoologie

- Licence 2ème année : TP de culture cellulaire

Table des matières

Remerciements I
Valorisation des travaux de thèse III
Table des matières V
Liste des figures IX
Liste des tableaux XI
Liste des abréviations XII
Introduction générale 1
Introduction bibliographique 3
Partie 1 : Physiologie et physiopathologie du système rénine angiotensine 5
I. Physiologie du système rénine angiotensine 6
1. Le système rénine angiotensine systémique 6
2. Le système rénine angiotensine tissulaire 8
3. Le système rénine angiotensine cérébrovasculaire 11
4. Interaction entre le SRA et le monoxyde d'azote 12
II. Physiopathologies vasculaires et cérébrovasculaires 14
1. Les pathologies cardiovasculaires 14
2. Les pathologies cérébrovasculaires 15
III. Les récepteurs à l'angiotensine II 17
1. Les récepteurs AT_1 18
2. Les récepteurs AT_2 25
3. L'équilibre AT_1/AT_2 27
Partie 2 : L'inhibition d'AT_1 et les nouvelles pistes thérapeutiques 29
I. Structure et conformation des récepteurs à l'angiotensine II 29
1. Structure des récepteurs AT_1 et AT_2 29
2. Conformation des récepteurs AT_1 et AT_2 33
3. Homodimérisation et hétérodimérisation des récepteurs 37
II. Les antagonistes du récepteur AT_1 38
III. L'agonisme biaisé 40
1. Définition 40
2. Utilisation des agonistes biaisés β-arrestine dans les pathologies cardiovasculaires 42
3. Utilisation des agonistes biaisés β-arrestine dans les pathologies cérébrovasculaires 43
IV. Thérapeutique basée sur le monoxyde d'azote 45
1. Les composés donneurs de NO 45

2. *S*-nitrosation du récepteur AT_1 46
V. Les ligands fluorescents comme traceurs des RCPG 48
1. Les ligands fluorescents 49
2. Propriété de fluorescence des fluorophores pour l'étude des RCPG 50
3. Les méthodes de mesure d'interaction récepteur/ligand fluorescent 50
Hypothèse et objectif de la thèse 53
I. Hypothèse et objectif 53
II. Problématique : outils d'étude inadaptés 53
III. Stratégie d'étude 54
Travaux expérimentaux 57
Partie 1 58
Caractérisation pharmacologique de nouveaux ligands fluorescents traceurs des récepteurs de l'angiotensine 58
Objectifs 59
Matériels et méthode 61
I. Matériels 61
Sondes fluorescentes 61
Lignées cellulaires 63
Vecteurs d'expression disponibles 63
II. Méthodes 64
1. Caractérisation pharmacologique des ligands fluorescents de AT_1 *in vitro* 64
Clonage 64
Culture cellulaire 65
Mesure de la libération calcique intracellulaire 66
Localisation subcellulaire par imagerie de fluorescence 67
Mesure des interactions récepteur/effecteur par transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) 67
Mesure de la sélectivité des ligands fluorescents pour AT_1 par cytométrie en flux 70
Microscopie confocale 71
2. Caractérisation pharmacologique des ligands fluorescents de AT_1 *ex vivo* 74
Animaux et déclaration éthique 74
Préparation des artères cérébrales moyennes de rat 74
Etude de la réactivité artérielle suite à l'application de ligands AT_1 75
Analyses statistiques 75
Résultats et discussion 77
I. Paramètres testés et optimisés pour chaque expérience *in vitro* 77

La température 77
L'albumine de sérum bovin (BSA) 78
Le temps d'incubation 79
II. Sélectivité des ligands fluorescents pour AT_1 80
Les dérivés fluorescents de l'Ang II 80
Les dérivés fluorescents de TRV027 81
Le dérivé fluorescent de Losartan 82
III. Etude fonctionnelle des ligands fluorescents sur AT_1 84
1. Analyse de la voie G_q par mesure de la réponse calcique et du recrutement de la protéine G_q 84
2. Analyse de la voie β-arrestine par mesure du recrutement des β-arrestines 1 et 2 et mesure de l'internalisation des récepteurs AT_1 89
3. Localisation subcellulaire des récepteurs AT_1 et AT_2 activés par les ligands fluorescents 92
IV. Etude de la vasoréactivité de l'artère des ligands fluorescents sur AT_1 95
V. Analyse de l'état d'oligomérisation du récepteur AT1 dans des cellules modèles 97
1. Détermination du K_D du Losartan-Cy3 en fonction de la densité de récepteurs AT_1 97
2. Etude de l'état d'oligomérisation des récepteurs AT_1 103
Conclusion 105
Partie 2 106
Effet des donneurs de NO sur la réponse fonctionnelle aux agonistes du récepteur AT_1 106
Objectifs 107
Matériels et méthode 108
I. Matériels 108
Donneurs de NO 108
Lignées cellulaires 108
II. Méthodes 108
Culture cellulaire 108
Mesure de la libération calcique intracellulaire 109
Localisation subcellulaire par imagerie de fluorescence 109
Mesure des interactions récepteur/effecteur par bioluminescence (BRET) 110
Animaux et déclaration éthique 110
Préparation des artères cérébrales moyennes de rat 111
Etude de la réactivité artérielle suite à l'application de ligands AT_1 111
Analyses statistiques 111
Résultats et discussion 112
I. Etude des effets de la *S*-nitrosation sur la réponse fonctionnelle AT_1 *in vitro* 112

II. Etude des effets de la *S*-nitrosation sur la vasoréactivité de l'artère *ex vivo* 114
Conclusion 116
Discussion générale 117
La caractérisation pharmacologique de nouveaux ligands fluorescents traceurs des récepteurs de l'angiotensine 119
Limites de détection 120
Augmentation de l'EC_{50} avec les ligands fluorescents 121
Comparaison des différents fluorophores Cy3 et TAMRA utilisés 121
Etudes fonctionnelles AT_2 envisagées 122
Tracer les récepteurs endogènes 123
Quantification de l'internalisation des récepteurs 124
Utilisation de la TAMRA-Ang II pour étudier les récepteurs AT_1 et AT_2 124
Commercialisation de nouveaux outils fluorescents pour les récepteurs AT_1 126
Effet des donneurs de NO sur la réponse fonctionnelle aux agonistes du récepteur AT_1 127
Etudes *in vitro* de l'impact des donneurs de NO sur AT_1 127
Etudes *ex vivo* de l'impact des donneurs de NO sur AT_1 128
Développement d'un ligand AT_1 donneur de NO 129
Conclusion 130
Annexes 133
Article 1 : Targeting the Angiotensin II Type 1 Receptor in Cerebrovascular Diseases: Biased Signaling Raises New Hopes 134
Article 2 : The AT1/AT2 receptor equilibrium is a cornerstone of the regulation of the renin angiotensin system beyond the cardiovascular system 155
Draft Article 3 : Synthesis and pharmacological characterization of fluorescent ligands targeting the angiotensin II receptors derived from agonist, β-arrestin biased agonist and antagonist 186
Bibliographie 266

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'une artère et ses trois tuniques : intima, média et adventice 4

Figure 2 : Description simplifiée du métabolisme du système rénine angiotensine..... 6

Figure 3 : Schéma simplifié de la régulation de la pression artérielle par l'Ang II. 7

Figure 4 : Principaux axes presseur et dépresseurs du système rénine angiotensine 11

Figure 5 : Représentation schématique des réactions chimiques possibles du NO avec les protéines, (a) la nitration, (b) la nitrosylation et (c) la *S*-nitrosation 13

Figure 6 : Représentations d'un AVC ischémique et d'un AVC hémorragique. 16

Figure 7 : Voies de signalisation impliquées dans la vasoconstriction induite par AT_1 couplé à la protéine G_q..... 20

Figure 8 : Changements conformationnels de la β-arrestine 2 et libération de son extrémité C-terminale dépendants de l'activation du récepteur par son agoniste. 22

Figure 9 : Cycle d'activation, désensibilisation et internalisation du récepteur 23

Figure 10 : Voies de signalisation impliquées dans la vasodilatation induite par AT_2 26

Figure 11 : Description schématique des caractéristiques structurelles des grandes classes de RCPG 30

Figure 12 : Structure secondaire du récepteur AT_1 humain. 32

Figure 13 : Structure secondaire du récepteur AT_2 humain. 33

Figure 14 : Changements conformationnels connus du récepteur AT_1 : conformation inactive (rose), canonique active (vert) et alternative active (cyan)..... 34

Figure 15 : Changements conformationnels du récepteur AT_1 induits par un stress mécanique. 35

Figure 16 : Conformation active du récepteur AT_2 activé par l'Ang II..... 36

Figure 17 : Représentation schématique du concept d'agonisme biaisé du récepteur AT_1..... 41

Figure 18 : Mesure de la liaison des ligands à l'aide d'approches basées sur la radioactivité ou la fluorescence..... 48

Figure 19 : Représentation schématique du transfert d'énergie par résonance 51

Figure 20 : Structure des sondes fluorescentes synthétisées couplées à la Cyanine 3 55

Figure 21 : Spectres de fluorescence et formules chimiques des différents fluorophores utilisés 61

Figure 22 : Carte génétique du plasmide utilisé pour surexprimer le récepteur AT_1 couplé à la Nano luciférase dans les cellules HEK 293 65

Figure 23 : Schéma représentatif du BRET d'interaction et du BRET de collision..... 68

Figure 24 : Schéma représentatif des protéines de fusion utilisées pour déterminer les interactions récepteur/effecteur et l'internalisation des récepteurs AT_1 69

Figure 25 : Effet de la BSA sur la mobilisation calcique intracellulaire après activation par l'Ang II. 78

Figure 26 : Cinétique d'activation des différents effecteurs du récepteur AT_1 après activation par l'Ang II 79

Figure 27 : Liaison des nouveaux ligands fluorescents sur cellules surexprimant ou non les récepteurs AT_1 ou AT_2 83

Figure 28 : Effets des nouveaux ligands fluorescents sur la voie G_q de cellules surexprimant les récepteurs AT_1 84

Figure 29 : Effets des nouveaux dérivés fluorescents basés sur le TRV027 sur la voie G_q de cellules surexprimant les récepteurs AT_1. 86

Figure 30 : Courbes de recrutement des différents effecteurs du récepteur AT_1 après activation par l'Ang II de cellules surexprimant les récepteurs AT_1 87

Figure 31 : Effets du dérivé fluorescent de Losartan sur la voie G_q de cellules surexprimant les récepteurs AT_1. 88

Figure 32 : Effets des nouveaux ligands fluorescents sur la voie β-arrestine et l'internalisation de cellules surexprimant les récepteurs AT_1 90

Figure 33 : Effets du dérivé fluorescent de Losartan sur la voie β-arrestine et l'internalisation de cellules surexprimant les récepteurs AT_1 92

Figure 34 : Images de microscopie en épifluorescence représentatives des nouveaux ligands fluorescents se liant aux récepteurs GFP-AT_1 ou GFP-AT_2. 94

Figure 35 : Mesures des réponses contractiles des artères cérébrales moyennes de rat isolées et perfusées à différents ligands 95

Figure 36 : Mesures des réponses contractiles des artères cérébrales moyennes de rat isolées et perfusées à différents ligands avant et après blocage des récepteurs AT_1 96

Figure 37 : Mesures des réponses contractiles des artères cérébrales moyennes de rat isolées et perfusées à différents ligands à 10^{-8}M 97

Figure 38 : Densité de récepteur β1AR à la membrane plasmique exprimée dans la lignée cellulaire stable HEK 293 98

Figure 39 : Mesure de la liaison du losartan-Cy3 aux récepteurs AT_1 et aux récepteurs AT_2 par microscopie confocale. 100

Figure 40 : Exemple d'images de cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs GFP-AT_1 en présence de fortes concentrations de Losartan-Cy3 101

Figure 41 : Mesure de la liaison du losartan-Cy3 aux récepteurs GFP-AT_1 par microscopie confocale 102

Figure 42 : Mesure de la liaison du losartan-Cy3 suivant la densité de récepteurs AT_1 103

Figure 43 : Oligomérisation apparente des récepteurs AT_1 dépendant de la densité des récepteurs sur les cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs AT_1 104

Figure 44 : Effets des donneurs de NO sur la signalisation de cellules surexprimant les récepteurs AT_1 113

Figure 45 : Images de microscopie en épifluorescence représentatives de la localisation des récepteurs GFP-AT_1 ou GFP-AT_2 après prétraitement ou non au NacNO et stimulation à des agonistes 113

Figure 46 : Mesures des réponses contractiles des artères cérébrales moyennes à différents ligands avec ou sans prétraitement au GSNO 114

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste exhaustive des différentes études précliniques et cliniques montrant les effets de l'administration de Sartans dans le contexte d'un AVC 39

Tableau 2 : Liste exhaustive des différentes études précliniques et cliniques montrant les effets de l'administration d'agonistes AT_2 dans le contexte d'un AVC 44

Tableau 3 : Liste exhaustive des différentes études précliniques et cliniques montrant les effets de l'administration d'Ang (1-7) dans le contexte d'un AVC. 45

Tableau 4 : Comparaison des propriétés photo-physiques des trois fluorophores utilisés : GFP, Cy3 et TAMRA 62

Tableau 5 : Liste des différents ligands fluorescents étudiés en tant que potentiel ligand traceur des récepteurs AT_1/AT_2 63

Tableau 6 : Caractéristiques du Fluo-4 66

Tableau 7 : Quantité des différents plasmides utilisés pour la transfection transitoire des cellules HEK 293 dans les expériences de BRET 69

Tableau 8 : Quantité des différents plasmides utilisés pour la transfection transitoire des cellules HEK 293 dans les expériences de microscopie confocale 72

Tableau 9 : Conditions optimales d'expérimentation suivant les différentes méthodes *in vitro* 77

Tableau 10 : Valeurs d'EC_{50} de l'Ang II suivant la concentration de BSA dans le tampon 78

Tableau 11 : Valeurs d'EC_{50} des dérivés fluorescents d'Ang II et de TRV027 déterminés par la mesure de la réponse calcique 85

Tableau 12 : Valeurs de pA2 et de Ki du dérivé fluorescent Losartan-Cy3 88

Tableau 13 : Récapitulatif des effets observés des dérivés fluorescents sur les récepteurs de l'Ang II 132

Liste des abréviations

ACM : artère cérébrale moyenne

Ang A : angiotensine A

Ang I : angiotensine I

Ang II : angiotensine II

Ang III : angiotensine III

Ang IV : angiotensine IV

AP-2 : adaptateur de clathrine 2

ARA : antagoniste des récepteurs à l'angiotensine

AT1 : récepteur de type 1 de l'angiotensine II

AT2 : récepteur de type 2 de l'angiotensine II

AVC : accident vasculaire cérébrale

BK : bradykinine

BRET : transfert d'énergie par résonance de bioluminescence

BSA : bovine serum albumin

CML : cellules musculaires lisses

CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires

Cy3 : cyanine 3

DAG : diacylglycérol

DI : diamètre interne

DMT : domaine transmembranaire

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

ECA2 : enzyme de conversion 2 de l'angiotensine

EROs : espèces réactives de l'oxygène

FACS : fluorescence activated cell sorting

FRET : transfert d'énergie par résonance de fluorescence

GFP : green fluorescent protein

GRK : kinases des récepteurs couplés aux protéines G

GSNO : S-nitrsoglutathion

HEK : human embryonic kidney

IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

MAPK : protéines kinases activées par les mitogènes

MasR: récepteur Mas

MP : membrane plasmique

MrgD : Mas-related G protein-coupled receptor D

NacNO : S-nitroso-N-acétylcystéine

NO : monoxyde d'azote

NOS : nitric oxide synthase (eNOS : endothéliale ; iNOS : inductible ; nNOS : neuronale)

PB : peptide blanc

PKC : protéine kinase C

PSS : solution saline physiologique

RCPG : récepteurs couplés aux protéines G

RET : transfert d'énergie par résonance

RSNO : S-nitrosothiol

SHR : spontaneous hypertensive rat

SNP : nitroprussiate de sodium

SRA : système rénine angiotensine

TAMRA : tetramethylrhodamine

Introduction générale

Le système rénine angiotensine (SRA) est un système hormonal connu pour réguler de nombreux processus physiologiques dont le contrôle de la pression artérielle et l'homéostasie vasculaire. Il revêt un rôle majeur dans la régulation de la circulation cérébrale en impactant le remodelage vasculaire et la réponse vasomotrice des artères et artérioles cérébrales.

L'angiotensine II (Ang II) est le principal effecteur du SRA et se lie avec une affinité similaire à deux récepteurs : les récepteurs Ang II de type 1 (AT_1) et de type 2 (AT_2), tous deux appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). L'Ang II induit une vasoconstriction des artères et artérioles cérébrales par l'activation des récepteurs AT_1 via l'activation de la voie des protéines G_q. A l'inverse, l'activation des récepteurs AT_2 permet une vasodilatation, observable uniquement si les récepteurs AT_1 sont préalablement bloqués par un antagoniste sélectif. Un équilibre fonctionnel entre ces récepteurs AT_1 et AT_2 participe au maintien d'une perfusion physiologique de la circulation cérébrale.

Le SRA, et notamment le récepteur AT_1, sont les cibles principales de plusieurs classes de thérapeutique utilisées en première intention dans les maladies cardiovasculaires comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA), communément appelés « sartans » (suffixe retrouvé dans les DCI de ces médicaments). Les ARA sont efficaces dans la prévention des accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Bosch *et al.*, 2002; Dahlöf *et al.*, 2002), cependant, malgré de nombreux effets bénéfiques en préclinique, ces médicaments n'ont pas de résultats curatifs satisfaisants dans les études cliniques sur les phases aiguë ou post-aiguë de l'AVC (Sandset *et al.*, 2011).

Dans le but de maintenir une perfusion physiologique et limiter les conséquences de l'ischémie cérébrale, il est donc nécessaire de développer de nouvelles thérapies se basant sur une meilleure compréhension des mécanismes de la régulation de la circulation cérébrale et de la signalisation des récepteurs AT_1.

Plusieurs agonistes dérivés de l'Ang II ont des propriétés biaisées, activant la voie de signalisation des β-arrestines au détriment de la voie de signalisation des protéines G hétérotrimériques. Ces agonistes biaisés β-arrestine ont un potentiel thérapeutique cardiovasculaire prometteur mais qui reste, à ce jour, inexploré dans les maladies cérébrovasculaires. Dans ce nouveau concept, les agonistes biaisés stabilisent d'autres états conformationnels du récepteur AT_1. Différentes stratégies thérapeutiques sont donc à l'étude dans mon laboratoire, impactant la voie de signalisation AT_1 soit en modifiant directement la conformation du récepteur, comme pourrait l'induire la *S*-nitrosation de AT_1, soit en activant partiellement AT_1 par l'intermédiaire des agonistes biaisés β-arrestine.

Pour étudier en profondeur l'impact que peuvent avoir ces modifications, de nouveaux outils pharmacologiques, des ligands traceurs fluorescents ont été synthétisés et caractérisés, nous permettant de suivre les récepteurs AT_1 et/ou AT_2 et pourront être utilisés afin d'explorer ces nouvelles voies thérapeutiques. En effet, l'activation de la voie des β-arrestines, induisant l'internalisation des récepteurs, pourra être étudiée en pistant ces récepteurs dans les cellules et les tissus.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à des rappels sur la physiologie et la physiopathologie du SRA, en particulier de l'angiotensine II. Nous décrirons ensuite les fonctions et les voies de signalisation des récepteurs AT_1 et AT_2 ainsi que leur implication dans les pathologies cérébrovasculaires. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs AT_1 en thérapie sera discutée puis nous aborderons les nouvelles pistes thérapeutiques envisagées en rappelant le concept d'agonisme biaisé, son intérêt dans le cas des récepteurs AT_1 et les stratégies développées pour orienter sa signalisation, notamment par l'utilisation d'agonistes biaisés ou de donneurs de monoxyde d'azote (NO). Nous finirons par une brève exposition des outils d'étude et des ligands fluorescents développés dans le domaine des RCPG.

La deuxième partie de ce manuscrit sera centrée sur les travaux expérimentaux caractérisant les nouveaux ligands fluorescents pour les récepteurs AT_1 et AT_2. Nous commencerons ensuite à étudier l'impact de la *S*-nitrosation par un donneur de NO sur les récepteurs AT_1 grâce à ces nouveaux traceurs fluorescents.

Dans la dernière partie de ce manuscrit, nous discuterons de l'avancée de ce projet avec les principaux résultats obtenus et nous décrirons les différentes perspectives pour la poursuite du projet et l'utilisation de ces nouveaux outils pharmacologiques.

Introduction bibliographique

Le système vasculaire est un système circulatoire composé d'artères, de veines, de vaisseaux et de capillaires assurant la distribution de sang et de nutriments dans l'ensemble du corps. La paroi artérielle est divisée en trois couches distinctes : l'intima, la média et l'adventice, chacune comprenant divers types cellulaires (**Figure 1**). L'intima, couche la plus interne, est formée par la membrane basale et l'endothélium, composé de cellules endothéliales. La média est principalement constituée de cellules musculaires lisses (CML) qui jouent un rôle primordial sur la motricité du vaisseau. Enfin, l'adventice est composée d'un tissu conjonctif lâche contenant des fibroblastes et des adipocytes.

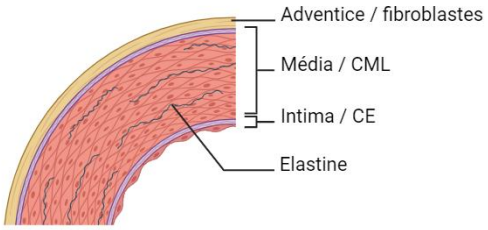


Figure 1 : Structure d'une artère et ses trois tuniques : intima, média et adventice (schéma réalisé *via* BioRender). Différents types cellulaires composent ces différentes tuniques avec leurs fonctions propres. CE : cellules endothéliales ; CML : cellules musculaires lisses

La monocouche de cellules endothéliales constituant l'endothélium vasculaire occupe une place prépondérante dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Les cellules endothéliales vasculaires sont constamment exposées à des stimuli chimiques et mécaniques. En réponse, ces cellules sécrètent différentes substances qui influent sur la vasomotricité, l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, l'hémostase et l'inflammation en impactant le tonus des CML.

Les récepteurs situés à la surface cellulaire jouent un rôle crucial dans la détection des stimuli externes et leur conversion en réponses appropriées à l'intérieur de la cellule. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont les protéines transmembranaires les plus abondantes et variées impliquées dans la transduction du signal intracellulaire. Le génome humain contient plus de 800 RCPG, ce qui représente 4% du génome (Fredriksson *et al.*, 2003).

Les RCPG sont impliqués dans l'homéostasie de nombreux systèmes et le contrôle de processus biologiques variés tels que le métabolisme, la neurotransmission, la réponse inflammatoire, la réponse immunitaire. De ce fait ils sont également impliqués dans des processus physiopathologiques, notamment le diabète, les maladies neurodégénératives, les cancers et les maladies cardiovasculaires (Stoy & Gurevich, 2015). Cela justifie que cette catégorie de récepteur représente la cible la plus importante des médicaments sur le marché avec 40% de ces médicaments visant les RCPG (Hauser *et al.*, 2017; Azam *et al.*, 2020).

La physiologie du SRA, détaillée dans la prochaine partie, est régulée en grande partie par deux RCPG, les récepteurs AT_1 et les récepteurs AT_2 de l'angiotensine II, auxquels s'ajoutent d'autres RCPG tels que MasR, MrgD et les récepteurs adrénergiques.

Partie 1 : Physiologie et physiopathologie du système rénine angiotensine

Le système rénine-angiotensine est un système des plus importants dans la régulation de la volémie et du bilan hydrosodé. Ce mécanisme de rétention de l'eau et du sel a pu être un élément déterminant dans l'adaptation à la vie terrestre qui s'est effectuée il y a des millions d'années. Tous les constituants essentiels de ce système, qui seront cités dans le prochain paragraphe, proviennent de gènes ancestraux et ont une action vasoconstrictrice, hypertensive et un rôle direct sur la fonction rénale.

Le système rénine angiotensine a été découvert en 1898 par Tigerstedt et Bergman, travaillant sur une substance provenant des reins qui provoquait une augmentation de la pression artérielle, nommée par la suite « rénine » (Tigerstedt & Bergman, 1898). Plusieurs décennies après, le concept d'hypertension d'origine rénale, en induisant une ischémie rénale chez le chien, a émergé avec les premiers travaux de Loesch en 1927. Les travaux de l'équipe de Goldblatt ont complété cette approche et permis la création d'un modèle expérimental d'hypertension artérielle par l'induction d'une ischémie rénale chez le chien par clampage de l'artère rénale (Goldblatt *et al.*, 1934). Goldblatt, ainsi que Loesch, démontrèrent que réduire la perfusion artérielle rénale induisait une hypertension artérielle permanente chez le chien. Cette nouvelle technique expérimentale a conduit à des progrès dans la compréhension des mécanismes favorisant l'hypertension artérielle.

Par la suite de nombreuses équipes se sont intéressées à la substance rénale responsable de l'hypertension. C'est une équipe de recherche argentine qui, en 1939, put extraire la substance vasoconstrictrice qu'ils nommèrent hypertensine. L'équipe démontra que la rénine agissait comme une enzyme pour produire cette hypertensine par l'intermédiaire d'un substrat protéique nommé hypertensinogène (Braun-Menendez *et al.*, 1940). En parallèle, une autre équipe démontra également l'existence d'une substance rénale permettant une augmentation de la pression artérielle en concentrant la rénine et étudiant son effet vasoconstricteur dans la queue de chien. Cette deuxième équipe a pu isoler l'angiotonine (Page, 1939; Page & Helmer, 1940). La substance découverte fut renommée angiotensine en accord avec les responsables de ces deux équipes de recherche.

Les autres acteurs de ce système hormonal ont été mis en évidence une dizaine d'années plus tard. Les travaux de Skeggs ont pu démontrer une distinction entre l'angiotensine I (Ang I) et l'angiotensine II (Ang II) et ont permis la découverte de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui digère l'Ang I en la convertissant en Ang II (Skeggs *et al.*, 1954, 1956).

Le concept de système rénine angiotensine a ainsi été établi comme jouant un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G.

I. Physiologie du système rénine angiotensine

1. Le système rénine angiotensine systémique

Le SRA est un système hormonal dont les principaux rôles sont la régulation de la pression artérielle et l'homéostasie hydrosodée, équilibre approprié entre le sodium et l'eau dans le corps. En effet, l'activation de ce système permet une augmentation de la pression artérielle et une rétention hydrosodée. Le SRA suit une cascade de réactions enzymatiques commençant par la synthèse de la rénine et aboutissant à la formation de l'angiotensine II, principal effecteur de ce système.

La rénine, produite par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire, permet le clivage de l'angiotensinogène, une glycoprotéine de 458 acides aminés produite par le foie, pour former l'Ang I, un décapeptide inactif. Ce dernier est ensuite clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), exprimée essentiellement par les cellules endothéliales, pour donner l'angiotensine II active (Skeggs *et al.*, 1967, 1976). L'Ang II est ensuite dégradée en angiotensine III (Ang III) et angiotensine IV (Ang IV) par l'aminopeptidase de type A et l'aminopeptidase de type N respectivement (**Figure 2**).

En plus de la synthèse de l'Ang II par cette voie principale, des synthèses annexes sont décrites. Dans un premier temps, l'angiotensinogène peut être directement clivé en Ang II via le système « renin-like » regroupant plusieurs enzymes, la cathepsine G, la tonine et l'activateur tissulaire du plasminogène. Dans un second temps, l'Ang I peut être clivée en Ang II par d'autres enzymes que l'ECA comme la cathepsine G, l'enzyme de génération de l'angiotensine II sensible à la chymostatine ou par les chymases (Weir & Dzau, 1999).

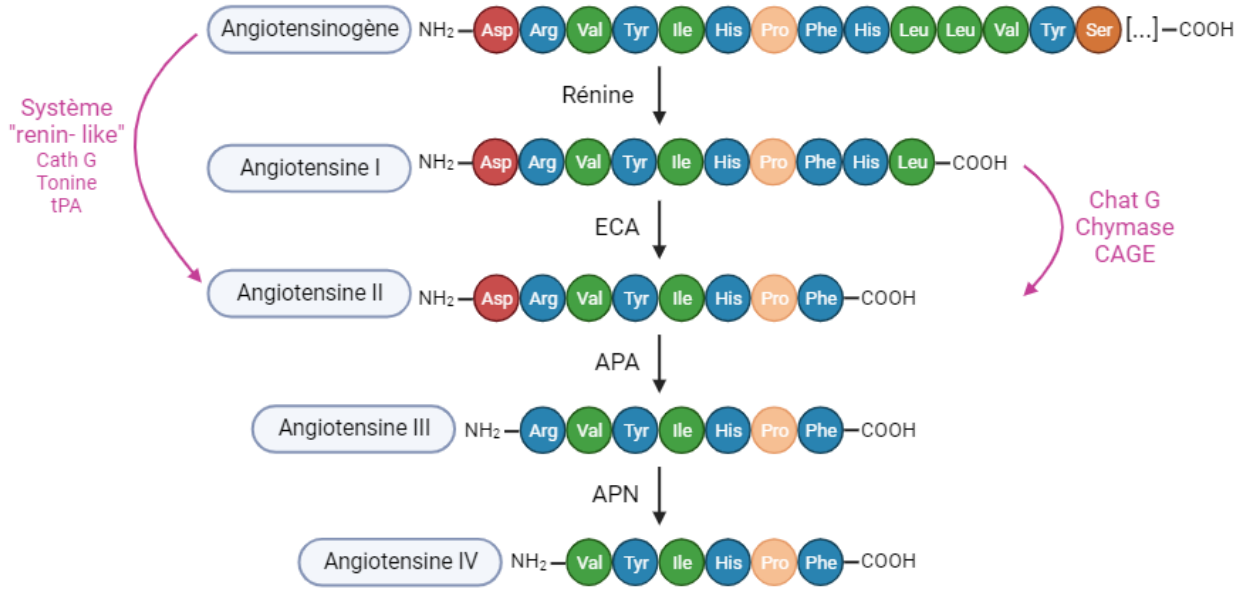


Figure 2 : Description simplifiée du métabolisme du système rénine angiotensine (schéma réalisé *via* BioRender). La cascade de réactions enzymatiques commence par la synthèse de la rénine clivant l'angiotensinogène et se finit ici par le clivage de l'Ang III en Ang IV par l'enzyme APN. APA : aminopeptidase de type A ; APN : aminopeptidase de type N ; CAGE : Chymostatin-sensitive Angiotensin II Generating Enzyme ; Cath G : cathepsine G ; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine ; tPA : activateur tissulaire du plasminogène

En conditions physiologiques, en réponse à une diminution de la pression artérielle et/ou du débit sanguin rénal, la libération de rénine augmente et l'Ang II ainsi produite rétablit la pression artérielle par différents mécanismes. L'Ang II induit une vasoconstriction artérielle par contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) augmentant donc les résistances vasculaires périphériques et la pression artérielle. Au niveau de la glande corticosurrénale, l'Ang II permet la libération d'aldostérone, hormone qui augmente la réabsorption d'eau et de Na^+ au niveau rénal. Cette élévation de la réabsorption hydrosodée peut être aussi favorisée par la contraction des artérioles rénales afférentes qui entraine une diminution de la filtration glomérulaire. L'augmentation consécutive de la volémie entraine une élévation de la pression artérielle. L'Ang II stimule également la libération de vasopressine et de noradrénaline au niveau du système nerveux central contribuant aussi au rétablissement de la pression artérielle à long terme. La vasopressine favorisera la réabsorption d'eau au niveau du tubule distal rénal en cas de diminution de la volémie alors que la noradrénaline induira une vasoconstriction si la pression artérielle diminue (**Figure 3**).

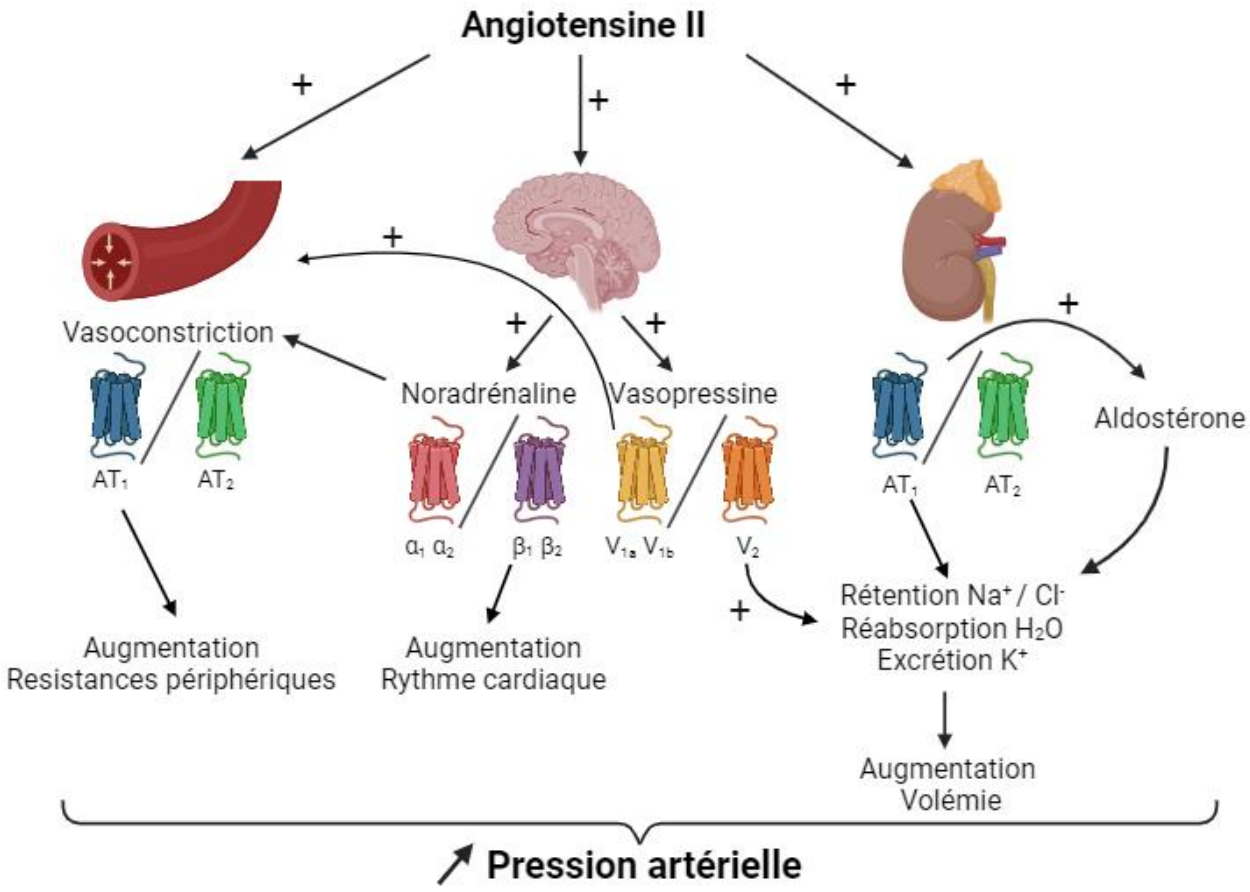


Figure 3 : Schéma simplifié de la régulation de la pression artérielle par l'Ang II (schéma réalisé *via* BioRender). En se fixant sur ces récepteurs AT_1, l'Ang II induit une vasoconstriction augmentant les résistances périphériques. En parallèle l'Ang II active le système sympathique stimulant la production de noradrénaline et de vasopressine. La noradrénaline augmente la vasoconstriction par l'intermédiaire des récepteurs α et augmente le rythme cardiaque avec les récepteurs β1. La vasopressine intervient dans la vasoconstriction *via* ses récepteurs V_1 et favorise la réabsorption d'eau au niveau du tubule distal rénal avec les récepteurs V_2. Enfin l'Ang II permet la libération d'aldostérone, hormone intervenant dans la réabsorption d'eau et de Na^+ au niveau rénal.

Le SRA se compose de deux axes principaux qui ont des effets opposés, un axe presseur et un axe dépresseur. L'axe presseur est représenté par l'Ang II / l'ECA / le récepteur AT_1 alors que l'axe dépresseur est composé du récepteur AT_2 et de l'axe Ang (1-7) / ECA2 / MasR. Récemment une dernière voie vient s'ajouter à cet axe dépresseur, la voie angiotensine A / Alamandine / MrgD. Le SRA peut donc encore se complexifier en ajoutant ces autres signalisations en parallèle tel que l'axe ECA2 / Ang (1-7) / Mas et l'axe angiotensine A-Alamandine-MrgD dont la physiologie sera décrite ci-après (**Figure 4**).

2. Le système rénine angiotensine tissulaire

a. L'axe ECA / Ang II / AT_1-AT_2

Les principaux effets du SRA sont médiés par l'Ang II et plus particulièrement par sa liaison aux récepteurs AT_1 et AT_2.

L'enzyme ECA induit le clivage de l'Ang I en Ang II. La fixation d'Ang II sur les récepteurs AT_1 permet la plupart de ses activités physiologiques, notamment la vasoconstriction artérielle, la croissance et la prolifération cellulaire, l'inflammation, le stress oxydant, la sécrétion d'aldostérone, la réabsorption hydrosodée et la stimulation sympathique (Touyz & Schiffrin, 2000). Le récepteur AT_1 est retrouvé dans la majorité des tissus et principalement au niveau des vaisseaux, du cœur, des reins et du cerveau.

La physiologie induite par le récepteur AT_2 est moins bien définie de par sa faible expression dans la plupart des tissus sains et des réponses discrètes suite à la stimulation de ce récepteur. Pour le SRA, les récepteurs AT_2 ont un rôle important dans le maintien de la pression sanguine et du volume de liquide extracellulaire. Ainsi ils favorisent la diurèse et diminuent la pression artérielle (Carey, 2017b; Sumners *et al.*, 2015).

Le récepteur AT_2 est l'un des principaux récepteurs du « bras protecteur » du SRA, avec le récepteur Mas (MasR), un RCPG activé par une forme tronquée endogène de l'Ang II, l'Ang (1-7). De nombreuses publications illustrent le rôle protecteur et régénérant de ce récepteur AT_2 dans un large éventail de maladies, impliquant des actions anti-inflammatoires, antifibrotiques et protectrices des cellules (Carey, 2017a; Matavelli & Siragy, 2015; Steckelings *et al.*, 2022).

La physiologie et la signalisation de ces deux récepteurs seront décrites plus en détails dans la partie du manuscrit qui leur est consacrée (c*f.* Partie 1. III – p17).

b. L'axe ECA2 / Ang (1-7) / MasR

Les premiers effets de l'Ang (1-7) ont été observés par l'équipe de Campagnole-Santos qui injectait de faibles doses de ce peptide dans la moelle dorsale de rats et observait une diminution de la pression artérielle (Campagnole-Santos *et al.*, 1989).

L'origine de l'Ang (1-7) a été élucidée par la découverte de l'enzyme de conversion 2 de l'angiotensine I (ECA2) quelques années plus tard (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). Cette enzyme permet de cliver l'Ang II en Ang (1-7) directement mais peut aussi cliver l'Ang I en Ang (1-9) qui à son tour sera clivée en Ang (1-7) par l'ECA. Ce peptide se fixera à un RCPG, le récepteur Mas (R. A. S. Santos *et al.*, 2003).

En se liant au récepteur Mas, l'Ang (1-7) induit une vasodilatation via une libération de monoxyde d'azote (NO) par l'intermédiaire de la eNOS et nNOS (Schinzari *et al.*, 2018). L'Ang (1-7) peut contrebalancer les effets de l'Ang II au niveau des cellules musculaires lisses cérébrales, réduisant l'apoptose et la prolifération cellulaire (Bihl *et al.*, 2015). L'administration de ce peptide, dans un modèle *in vitro* d'aorte de rat, inhibe la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) induite par l'Ang II et augmente la libération de NO permettant une vasodilatation accrue, réduisant le stress oxydatif endothélial (Polizio *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2007).

D'autres effets protecteurs, notamment au niveau cardiaque, ont été rapportés, avec une diminution du remodelage ventriculaire (R. A. S. Santos *et al.*, 2004), une diminution de la prolifération cellulaire et également une réduction des arythmies cardiaques (Ferreira *et al.*, 2001). L'Ang (1-7) réduit la réponse inflammatoire et exerce des effets antiprolifératifs, antifibrotiques et antioxydants. Une revue de l'équipe de Santos décrit et résume les nombreux effets protecteurs de l'Ang (1-7) au niveau cardiaque (R. A. Santos, 2014).

En plus de sa liaison aux récepteurs Mas et ses effets cardioprotecteurs, l'Ang (1-7) peut se lier aux récepteurs AT_2 et aux récepteurs MrgD. Il agit également comme un agoniste biaisé vers la voie β-arrestine au niveau des récepteurs AT_1, contribuant à l'effet protecteur de ce peptide (*cf.* Partie 2. III. 1 – p40) (Teixeira *et al.*, 2017).

c. L'axe Angiotensine A / Alamandine / MrgD

L'angiotensine A (Ang A), identifiée en 2007 par l'équipe de Jankowski, est un métabolite de l'Ang II qui diffère d'un acide aminé, une alanine à la place d'une asparagine en position 1 (Jankowski *et al.*, 2007). L'Ang II est convertie en Ang A par décarboxylation de l'acide aspartique dans les leucocytes mononucléaires. L'Ang A interagit avec les deux principaux récepteurs de l'Ang II, AT_1 et AT_2, avec la même affinité que l'Ang II (R. Yang *et al.*, 2011), voire une affinité plus élevée pour les récepteurs AT_2 (Jankowski *et al.*, 2007). Elle exerce des effets vasoconstricteurs et pro-hypertenseurs par l'intermédiaire des récepteurs AT_1, induisant une augmentation de la pression artérielle. Cependant, des concentrations plus élevées d'Ang A par rapport à l'Ang II sont nécessaires pour avoir la même augmentation de la pression artérielle (Badejo Jr *et al.*, 2009; Habiyakare *et al.*, 2014; Jankowski *et al.*, 2007; R. Yang *et al.*, 2011).

L'alamandine est issue de la catalyse de l'Ang A par l'ECA2 mais peut également être générée par la décarboxylation du résidu aspartique de l'Ang (1-7). Elle exerce des effets vasodilatateurs et anti-hypertenseurs par l'intermédiaire des récepteurs MrgD, RCPG apparentés au récepteur Mas (Lautner *et al.*, 2013). Ce peptide, retrouvé chez le rat, la souris et l'homme, a des effets physiologiques similaires à ceux de l'Ang (1-7) au niveau cardiovasculaire, c'est-à-dire, entre-autres, une production de monoxyde d'azote (NO) et une vasodilatation des artères (Qaradakhi *et al.*, 2016). En effet, dans des cardiomyocytes isolés de souris, l'alamandine induit une production de NO par le biais des protéines kinases LKB1 (liver kinase B1) et AMPK (AMP-activated protein kinase), permettant d'inhiber l'hypertrophie des cardiomyocytes (Jesus *et al.*, 2018). De plus, chez un modèle de rat hypertendu, l'administration d'alamandine atténue l'hypertension, diminue la fibrose cardiaque et atténue efficacement le remodelage cardiaque (Lautner *et al.*, 2013; C. Liu *et al.*, 2018). Ce peptide a également un effet anti-inflammatoire et anti-apoptotique en inhibant la signalisation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) et plus précisément en inhibant les protéines p-ERK, p-JNK et p-p38 (P. Li *et al.*, 2018). L'effet antihypertensif et anti-fibrotique artériel de l'alamandine a également été observé chez la souris par l'équipe de Yang. Cette équipe a également montré que l'alamandine atténue la fibrose vasculaire induite par l'Ang II dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de rat en inhibant l'expression de la protéine p38 de la voie des MAPK (C. Yang *et al.*, 2020).

Ces récents travaux illustrent donc ce nouvel axe AngA / alamandine / MrgD s'associant à la fois à l'axe presseur et à l'axe dépresseur du SRA. En effet, l'Ang A peut soit déclencher directement une action vasoconstrictrice et prolifération soit déclencher indirectement des effets opposés, c'est-à-dire des effets antihypertenseurs, antifibrotiques, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques, en se métabolisant en alamandine (Lautner *et al.*, 2013; Qaradakhi *et al.*, 2016; Jesus *et al.*, 2018; C. Liu *et al.*, 2018; P. Li *et al.*, 2018; C. Yang *et al.*, 2020). L'axe AngA / Alamandine / MrgD peut donc représenter un nouveau mécanisme de contre-régulation important au sein du SRA.

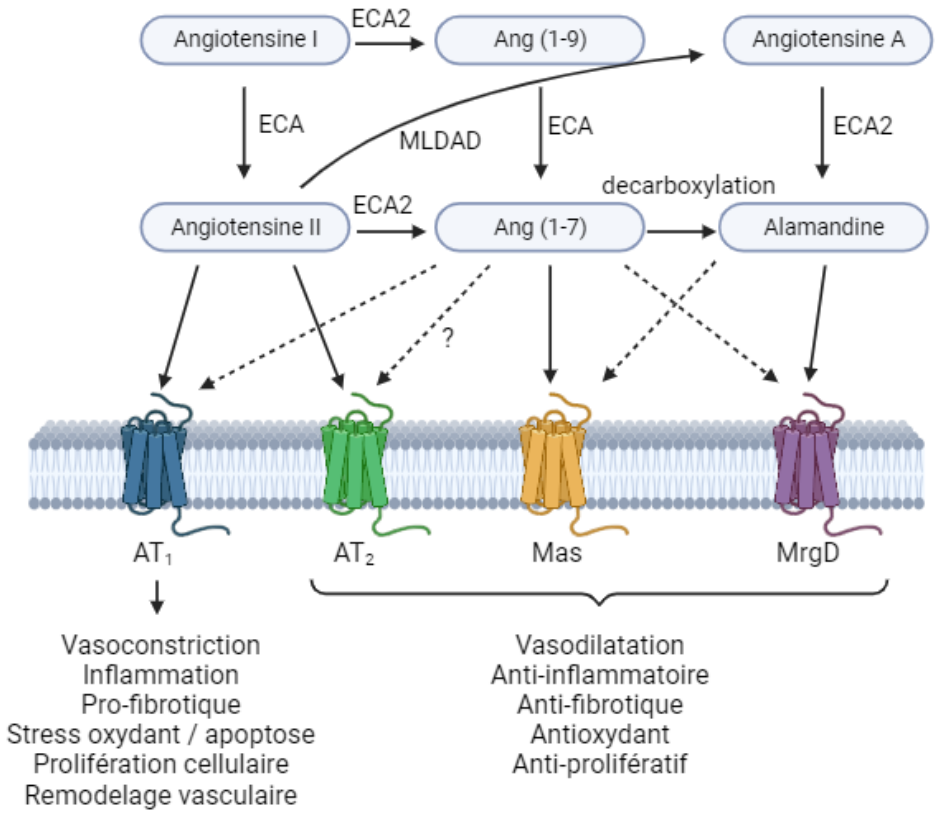


Figure 4 : Principaux axes presseur et dépresseurs du système rénine angiotensine (schéma réalisé *via* BioRender). L'Ang II via les récepteurs AT_1 intervient dans l'axe presseur du SRA en induisant la vasoconstriction, l'inflammation, un stress oxydant, la prolifération cellulaire, le remodelage vasculaire et les effets pro-fibrotiques. L'Ang II est également un acteur de l'axe dépresseur en se fixant aux récepteurs AT_2. L'Ang (1-7) *via* les récepteurs Mas et l'alamandine *via* les récepteurs MrgD sont les autres acteurs de cet axe dépresseur permettant une vasodilatation, des effets anti-inflammatoire, anti-fibrotique, antioxydant et antiprolifératif. Les flèches noires représentent la liaison des peptides à leurs principaux récepteurs permettant une réponse fonctionnelle établie et les flèches en pointillés illustrent la liaison des peptides aux récepteurs n'induisant pas forcément de réponse fonctionnelle décrite dans l'organisme. AT_1 : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; AT_2 : récepteur de type 2 de l'angiotensine II ; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine ; 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

3. Le système rénine angiotensine cérébrovasculaire

Bien que l'Ang II soit un peptide hydrophile ne pouvant pas passer la barrière hématoencéphalique, elle a été mise en évidence au niveau cérébral (Fischer-Ferraro *et al.*, 1971), suggérant l'existence d'un SRA cérébrovasculaire.

La présence des ARN messagers ARNm codant les différents composants de la cascade enzymatique du SRA a également été retrouvée au niveau cérébral (Bader *et al.*, 2001; C. C. Miller *et al.*, 1989; Saavedra *et al.*, 1982; Sernia & Mowchanuk, 1983). Enfin, les récepteurs AT_1 et AT_2 ainsi que leurs ARNm ont été localisés au niveau cérébral chez le rat et l'humain (Barnes *et al.*, 1993; Lenkei *et al.*, 1996; Tsutsumi & Saavedra, 1991). Depuis, l'importance physiologique et physiopathologique du SRA cérébrovasculaire a fait l'objet de nombreuses recherches (de Gasparo *et al.*, 2000). Plus récemment, en 2006, l'équipe de Zhou a mis en évidence la présence des ARNm de l'angiotensinogène, de l'ECA et des récepteurs AT_1 et AT_2 au niveau de microvaisseaux cérébraux (J. Zhou *et al.*, 2006).

Les travaux de Vincent et coll. ont mis en évidence la conversion locale de l'Ang I en Ang II par l'intermédiaire de l'ECA ainsi que la présence et l'impact des récepteurs AT_1 et AT_2 au niveau d'artérioles cérébrales. En effet, dans un modèle de fenêtre crânienne chez le rat normotendu, l'administration *in situ* d'Ang I induit la vasoconstriction des artérioles cérébrales. Cette réponse est inhibée en présence d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), suggérant donc l'expression locale d'ECA et de récepteurs AT_1. En parallèle, en présence d'ARA, la stimulation à l'Ang II permet une vasodilatation induite par les récepteurs AT_2 (Vincent *et al.*, 2005). Les artérioles cérébrales expriment donc bien les récepteurs AT_1 et AT_2 et la stimulation de ces récepteurs induit respectivement une vasoconstriction et une vasodilatation.

Le SRA maintient ainsi un équilibre dynamique entre l'axe presseur et l'axe dépresseur afin de réguler la pression artérielle. Un autre acteur majeur de l'homéostasie vasculaire interagit avec le SRA, il s'agit du NO.

4. Interaction entre le SRA et le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote est l'un des principaux acteurs, en plus du SRA, permettant le maintien de l'homéostasie vasculaire par l'intermédiaire de trois grands types de signalisation.

Le NO est un radical libre soluble et gazeux dont la demi-vie est très faible (Kelm & Schrader, 1990). A partir de L-arginine il est produit en continu par les enzymes de synthèse d'oxide nitrique (NOS) comprenant trois isoformes : la NO synthase neuronale (nNOS), la NO synthase endothéliale (eNOS) et la NO synthase inductible (iNOS), dans les cellules endothéliales, les neurones, les CML, la moelle épinière ou les glandes surrénales (Förstermann & Sessa, 2012). L'activation de ces enzymes est régie par une augmentation de calcium intracellulaire qui permet la fixation du complexe Ca^{2+}/calmoduline aux enzymes et donc leur activation. Au niveau vasculaire, la principale source de stimulation de cette production basale de NO est la contrainte de cisaillement exercée par le flux sanguin sur les cellules endothéliales (Davis *et al.*, 2004; Lu & Kassab, 2011). Les vasodilatateurs endothélium-dépendant permettent également l'augmentation de la production de NO.

Le NO a de nombreux effets vasculaires, intervenant dans le maintien du tonus basal en relaxant les CMLV (Loscalzo & Welch, 1995), dans l'inhibition de la prolifération et migration des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et des cellules endothéliales (Garg & Hassid, 1989; Marks *et al.*, 1995). Il a également des actions anti-inflammatoires en diminuant la perméabilité vasculaire et en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires et la dégranulation de neutrophiles (Hinder *et al.*, 1999; Obermeier *et al.*, 1999).

De plus, le NO a des propriétés antioxydantes en inhibant la production de radicaux libres ou en les captant (Wink *et al.*, 2001). Pour finir, le NO est un agent anti-apoptotique car il est impliqué dans l'activation des voies de signalisation moléculaires intervenant dans la survie cellulaire (Di *et al.*, 2012).

Le NO peut induire des modifications fonctionnelles par trois mécanismes : la nitrosylation, la nitration et la *S*-nitrosation (**Figure 5**). La nitrosylation est l'ajout du NO sur des métaux de transition permettant un changement conformationnel de protéines et donc la régulation de leur activité. La nitrosylation intervient dans l'activation de la guanylate cyclase (GCs), permettant la transformation de GTP en GMPc qui joue un rôle dans la vasodilatation, le remodelage vasculaire ou encore la prolifération de CML (Farah *et al.*, 2018).

La nitration correspond à la fixation de NO_2 à certains résidus, tyrosine ou tryptophane, induisant une perte de fonctionnalité des protéines. Elle semble être impliquée dans de nombreuses pathologies comprenant l'infarctus du myocarde, l'athérosclérose et les maladies neurodégénératives ou inflammatoires (Turko & Murad, 2002). Finalement, la *S*-nitrosation est définie comme la liaison covalente entre le NO et la fraction thiol des résidus cystéines des protéines cibles, formant ainsi des S-nitrosothiols (RSNO). La *S*-nitrosation pourrait réguler l'activité de nombreuses protéines (Stamler *et al.*, 1992), dont probablement celle du récepteur AT_1 que notre équipe étudie (Bouressam *et al.*, 2019).

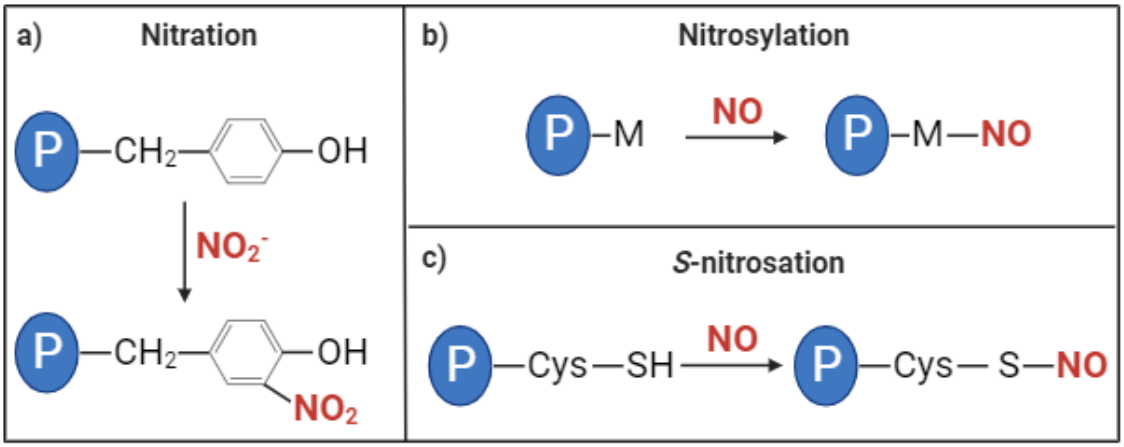


Figure 5 : Représentation schématique des réactions chimiques possibles du NO avec les protéines, (a) la nitration, (b) la nitrosylation et (c) la *S*-nitrosation (schéma réalisé *via* BioRender). Ces réactions chimiques permettent la fixation de NO_2 sur des tyrosines ou tryptophanes de protéines (a) et l'ajout de NO sur des métaux de transition (b), ou sur les cystéines de protéines (c). Cys : cystéine ; M : métal ; NO : monoxyde d'azote ; P : protéine

Le NO a donc de nombreuses fonctions par l'intermédiaire de ses différents mécanismes. Au niveau cérébral il est principalement connu pour son effet vasodilatateur et agit sur des effecteurs du SRA dont les récepteurs à l'angiotensine II.

Les mécanismes d'action du SRA, et le lien étroit avec le NO, sont complexes et font toujours l'objet de nombreuses études. En effet, les récentes découvertes scientifiques, la forte homologie entre les différents peptides et leurs effets opposés, à la fois délétères et protecteurs, font du SRA un sujet d'étude majeur qui revêt une importance capitale pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Une modification entre l'axe presseur et l'axe dépresseur du SRA est observée lors de situations physiopathologiques, engendrant des conséquences délétères notamment au niveau cérébrovasculaire.

II. Physiopathologies vasculaires et cérébrovasculaires

Un déséquilibre entre l'axe presseur et l'axe dépresseur du SRA, favorisant l'activation de l'axe presseur au détriment de l'axe dépresseur, est la conséquence de nombreuses pathologies. L'activation des récepteurs AT_1 par l'Ang II est reconnue pour déclencher, dans certaines situations physiopathologiques, les effets délétères de la stimulation du SRA tels que la vasoconstriction, la rétention d'eau et de sodium, l'augmentation de la pression artérielle, le remodelage cardiovasculaire et la fibrose (de Gasparo *et al.*, 2000; Hunyady & Catt, 2006; Kawai *et al.*, 2017). En raison de ses effets physiologiques variés, le récepteur AT_1 joue un rôle important dans de nombreuses maladies notamment au niveau cardiovasculaire, comme l'hypertrophie cardiaque, l'hypertension et l'insuffisance cardiaque. Il a un impact également sur l'inflammation, la résistance à l'insuline et sur de nombreuses pathologies cérébrales tant vasculaires que neurodégénératives.

1. Les pathologies cardiovasculaires

L'Ang II a un rôle important dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, le remodelage vasculaire, l'infarctus du myocarde ou l'insuffisance cardiaque, aggravées par des facteurs de risques tels que l'hypertension ou le diabète (Dzau & Braunwald, 1991).

Les récepteurs AT_1 peuvent augmenter directement la tension artérielle, avec des niveaux d'expression de l'ARNm de ces récepteurs plus élevés chez des rats hypertendus (de Oliveira-Sales *et al.*, 2010). L'inhibition de ces récepteurs réduit la pression artérielle de ces rats hypertendus (de Oliveira-Sales *et al.*, 2010). De plus, l'expression du récepteur AT_2 est augmentée chez ces rongeurs hypertendus permettant de diminuer la pression artérielle (Gao *et al.*, 2008; Z. Li *et al.*, 2003) et de contribuer à contre balancer les effets induits par AT_1.

Les troubles vasculaires rencontrés, comprenant une augmentation du tonus vasculaire, une augmentation de facteurs de croissance et de cytokines et une adhésion accrue des leucocytes, sont les résultats d'un dysfonctionnement des cellules endothéliales. Ces processus sont impliqués dans le développement des pathologies citées précédemment. L'Ang II est impliquée dans la production

d'EROs, l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires et la vasoconstriction, altérant les fonctions des cellules endothéliales (Pueyo *et al.,* 1998). De plus, il a été démontré que les inhibiteurs de l'ECA et les antagonistes du récepteur AT_1 réduisent la dysfonction endothéliale prouvant leurs implications dans ces processus physiopathologiques (Schiffrin & Touyz, 2004).

L'Ang II est un puissant promoteur d'hypertrophie cardiaque (Yamamoto *et al*., 2000), stimulant la croissance et la prolifération des cardiomyocytes et CMLV par l'intermédiaire du récepteur AT_1 (Dostal *et al.*, 1997). L'Ang II est également impliquée dans le remodelage et la fibrose vasculaire en régulant la transcription de gènes impliqués dans ces phénomènes comme le collagène de type I et de type III, la PTHR2 (parathyroid hormone 2 receptor) et la BMP2 (bone morphogenetic protein 2) (Jaffe & Mendelsohn, 2005) et en augmentant les facteurs de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) et TGF-β1 (transforming growth factor β1) de l'endothélium vasculaire (Zhao *et al.,* 2004). Le rôle d'AT_1 dans le remodelage vasculaire au cours d'une hypertension artérielle a ensuite été confirmé au sein de notre laboratoire par l'utilisation d'antagoniste du récepteur AT_1 chez des rats spontanément hypertendus (SHR) qui permettait d'inverser le remodelage artériolaire cérébral (Dupuis *et al.*, 2005).

2. Les pathologies cérébrovasculaires

Après la mise en évidence d'un SRA cérébrovasculaire et l'impact d'AT_1 dans la régulation de la circulation cérébrale, un lien avec les maladies cérébrovasculaires et neurodégénératives a vite été établi. En effet, l'impact néfaste de ce récepteur a été observé dans de nombreux modèles pathologiques comme les accidents vasculaires cérébraux, les anévrismes mais aussi les maladies de Parkinson et d'Alzheimer.

Le récepteur AT_1 a un rôle clé dans de nombreuses maladies neurodégénératives, majoritairement au niveau neuronal. Son implication dans ces maladies ne sera pas traitée dans ce manuscrit, qui reste centré sur la physiologie vasculaire, mais est abordée dans de nombreuses revues (Kalra *et al*., 2015; Villapol & Saavedra, 2015; Gironacci *et al*., 2018).

Les accidents vasculaires cérébraux sont une cause majeure de décès dans les pays industrialisés et peuvent entrainer de nombreux handicaps physiques consécutifs à un déficit neurologique. Deux étiologies distinctes peuvent induire un AVC : l'ischémie ou l'hémorragie (**Figure 6**). Dans les deux cas, il y aura privation de sang entrainant la réduction des niveaux d'oxygène, l'ischémie et la nécrose du tissu cérébral.

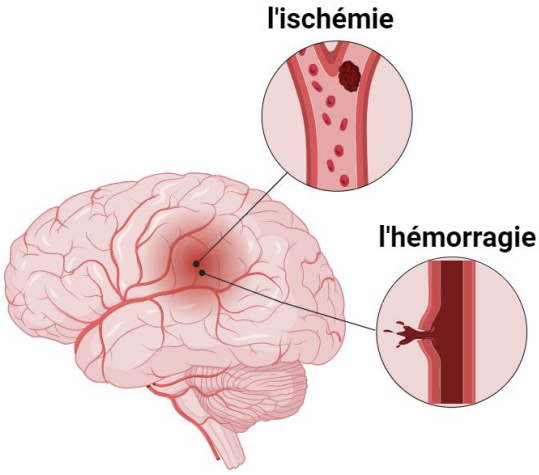


Figure 6 : Représentations d'un AVC ischémique et d'un AVC hémorragique (schéma réalisé *via* BioRender). Le blocage de la circulation sanguine artérielle par un caillot induisant une ischémie ou la rupture de l'artère conduisant à une hémorragie vont induire une zone de pénombre avec une privation de sang.

De nombreuses données précliniques suggèrent qu'une suractivation des récepteurs AT_1 par l'Ang II pourrait contribuer à la sévérité de l'ischémie cérébrale et de ses conséquences, principalement par ses effets vasoconstricteurs sur les artères cérébrales (Näveri *et al.*, 1994). En effet, il a été rapporté une augmentation de la production locale d'Ang II et une vasoconstriction des artères cérébrales induite par les récepteurs AT_1 dans un modèle murin d'AVC ischémique (Kagiyama *et al.*, 2003; Stenman & Edvinsson, 2004). Cela a abouti à la diminution de la perfusion de la zone de pénombre et l'aggravation des conséquences délétères de cette pathologie. Pour contrebalancer les effets d'AT_1, l'expression du gène du récepteur AT_2 est augmentée après un AVC. Cependant l'expression protéique de ce récepteur, mesurée par immunohistochimie avec des anticorps anti-AT_2, reste inchangée dans les artères cérébrales moyennes, limitant ainsi l'impact bénéfique que les agonistes du récepteur AT_2 peuvent avoir (Vikman & Edvinsson, 2006).

En plus de ces effets lors de l'AVC, le récepteur AT_1 favorise l'un des facteurs de risque majeurs de l'AVC, l'hypertension, en impactant le remodelage vasculaire de la paroi artériolaire (Baumbach *et al.*, 2003; Dupuis *et al.*, 2005, 2010). Une réponse pro-inflammatoire est également induite, augmentant le stress oxydatif et favorisant les dommages cellulaires et l'apoptose. Cela pourrait contribuer à l'aggravation de l'AVC avec une zone de pénombre plus étendue et l'augmentation de lésions cérébrales (De Silva & Faraci, 2012; Kazama *et al.*, 2004).

Les anévrismes cérébraux peuvent conduire à des AVC hémorragiques présentant un taux de mortalité très élevé de 48% (Inci & Spetzler, 2000). Il s'agit d'une faiblesse de la paroi artérielle cérébrale provoquant une dilatation ou un renflement localisé. Une baisse de l'expression d'Ang II et d'AT_1 est observée par RT-PCR, sur un lysat d'artère cérébrale corticale de patients présentant une rupture d'anévrisme, pouvant conduire à une réduction de l'épaisseur de la paroi et du remodelage vasculaire favorisant le risque d'anévrismes cérébraux (Ohkuma *et al.*, 2003).

L'Ang II et AT_1 jouent également un rôle central dans les lésions cérébrales traumatiques, entraimant des dommages neuronaux, une mort cellulaire et une inflammation accrues ainsi qu'un dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique. En effet, une corrélation a été établie entre la mortalité due aux anévrismes et l'augmentation de l'activité de l'ECA (Kehoe et al., 2008). L'activation excessive d'AT_1, induisant, entre autres, un remodelage vasculaire et une inflammation, pourrait contribuer aux lésions neuronales (Ando *et al.*, 2004).

Un déséquilibre AT_1/AT_2 en faveur des récepteurs AT_1, modifiant la physiologie du SRA, est donc observé dans de nombreuses pathologies. Il est à noter que l'expression du récepteur AT_2 est généralement régulée positivement pour compenser l'expression du récepteur AT_1, cependant cette compensation est moins efficace au cours du vieillissement (Labandeira-Garcia *et al.*, 2017).

Malgré l'émergence de nouveaux axes dépresseurs opposés aux effets d'AT_1, les principaux effets physiologiques du SRA restent médiés par l'Ang II et sa liaison avec ses deux principaux récepteurs, les récepteurs AT_1 et AT_2.

III. Les récepteurs à l'angiotensine II

L'angiotensine II peut se lier à deux sous-types principaux de RCPG, les récepteurs AT_1 et les récepteurs AT_2, avec la même affinité de l'ordre du nanomolaire (Mukoyama *et al.*, 1993). Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, plus précisément la sous-famille des rhodopsines (classe A), avec le récepteur AT_1 classiquement catégorisé comme récepteur couplé à la protéine $G_{q/11}$ et le récepteur AT_2 couplé principalement à la protéine $G_{i/o}$ (Inagami, 1999).

Deux autres sous-types de récepteurs de l'Ang II existent, les récepteurs AT_3 et les récepteurs AT_4, avec un impact physiologique mineur comparé aux deux précédents. En effet, les récepteurs AT_3 ont été observés uniquement dans les cellules de neuroblastome de souris et ont comme principal ligand l'Ang II (Chaki & Inagami, 1992). Quant aux récepteurs AT_4, ils sont présents dans divers organes tels que le cœur, les reins, les poumons et le cerveau, avec comme principal ligand l'Ang IV (Swanson *et al.*, 1992).

Bien que les fonctions et la caractérisation pharmacologique des récepteurs AT_3 ne soient pas encore déterminées et leur existence remise en cause, des études récentes ont démontré l'implication des récepteurs AT_4 dans la mémoire et la maladie d'Alzheimer (Royea & Hamel, 2020; Wilson *et al.*, 2009). En raison du manque d'information et de leur intérêt moindre dans la physiologie du SRA, ces deux sous-types de récepteurs ne seront pas davantage abordés dans ce manuscrit.

1. Les récepteurs AT_1

a. Généralités

Chez l'homme, le gène de AT_1 est localisé sur la bande q22 du chromosome 3 et code pour une isoforme. Deux isoformes du récepteur AT_1 ont été retrouvées chez la souris et le rat, les récepteurs AT_{1A} et AT_{1B}, ayant une homologie de séquence supérieure à 95% (variation de 17 acides aminés), une même affinité pour l'Ang II et des fonctions identiques (N. Iwai & Inagami, 1992). Seule leur localisation dans l'organisme diffère avec une limitation des récepteurs AT_{1B} au niveau du cerveau, des testicules et des glandes surrénales alors que les récepteurs AT_{1A} sont exprimés au niveau des reins, du foie, des ovaires, du cœur, des poumons et des tissus adipeux en plus de ceux cités précédemment (de Gasparo *et al.*, 2000). Les gènes codant leur expression sont localisés sur les chromosomes 17 et 2 respectivement. La structure détaillée des récepteurs AT_1 sera détaillée dans la deuxième partie de cette introduction (*cf.* Partie 2. I. 1. a – p31).

Comme mentionné précédemment, les activités physiologiques majeures de l'Ang II sont principalement médiées par sa liaison aux récepteurs AT_1, retrouvés dans la plupart des tissus, en particulier au niveau des vaisseaux, du cœur, des reins et du cerveau. Ces activités comprennent, entre autres, la vasoconstriction artérielle, la croissance et la prolifération cellulaire, l'inflammation, le stress oxydant, la sécrétion d'aldostérone et la réabsorption hydrosodée (Touyz & Schiffrin, 2000).

Les récepteurs AT_1 peuvent médier leur signal par les protéines G et également par les β-arrestines. La prochaine partie sera donc centrée sur ces voies de signalisation intracellulaire.

b. Signalisation

La superfamille des RCPG déclenche une cascade de signalisation médiée par les protéines G hétérotrimériques avec lesquelles ils interagissent. Lorsque les RCPG sont inactifs, ces protéines intracellulaires se localisent principalement à la membrane plasmique et forment un complexe comprenant une sous-unité Gα et le complexe indissociable βγ.

Un changement conformationnel du récepteur est induit suite à la liaison du ligand au récepteur, entrainant l'activation des protéines G et la production de seconds messagers (Venkatakrishnan *et al.*, 2013). Les protéines G agissent comme des médiateurs dans l'activation des effecteurs intracellulaires tels que les enzymes, les canaux ioniques et d'autres.

Lors de l'activation des récepteurs, ces derniers catalysent l'échange d'une molécule de guanosine diphosphate (GDP) par une molécule de guanosine triphosphate (GTP) sur la sous-unité G_α de la protéine G, la dissociant du complexe $G_{\beta\gamma}$ et permettant à chacune d'activer leurs effecteurs respectifs (Pierce *et al.*, 2002). La sous-unité $G_{\beta\gamma}$ peut moduler plusieurs effecteurs tels que les canaux potassiques et calciques, les kinases de la famille des kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK), les

phospholipases C (PLCβ, PLCε et PLCη), la phosphoinositide 3 kinase (PI_3K), la famille des MAPK et également des adénylates cyclases (Dupré *et al.*, 2009; S. M. Khan *et al.*, 2013). La protéine G_α est divisée en 4 familles : $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha i/o}$ et $G_{\alpha 12/13}$. Ces familles ont toutes un rôle physiologique et des protéines effectrices associées différentes (Syrovatkina *et al.*, 2016).

Les RCPG peuvent activer d'autres voies de signalisation indépendantes de la protéine G comme l'activation de certaines kinases (Src), la transactivation du récepteur de l'EGF ou le recrutement de β-arrestines. Ces dernières sont centrales dans l'arrêt de la signalisation des RCPG par la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs.

Comme de nombreux RCPG, le récepteur AT_1 est capable d'activer deux voies principales de signalisation : une signalisation médiée par les protéines G et une signalisation médiée par la voie des β-arrestines. La signalisation de ce récepteur est largement documentée et détaillée dans de nombreuses revues (Kawai *et al.*, 2017; Delaitre *et al.*, 2021).

Signalisation médiée par les protéines G

Les récepteurs AT_1 peuvent se coupler à différentes protéines G hétéromériques comme G_q, $G_{i/o}$ et $G_{12/13}$ (de Gasparo *et al.*, 2000; Wirth *et al.*, 2008). Ils induisent diverses voies de signalisation avec des seconds messagers, notamment la phospholipase Cβ (PLCβ), RhoA, les espèces réactives de l'oxygène (EROs) et la famille des MAPK. Ces voies médient la contraction vasculaire et le remodelage vasculaire, y compris l'hypertrophie et la migration, et jouent un rôle dans les maladies cardiovasculaires.

Par son couplage avec la protéine $G_{q/11}$, le récepteur AT_1 provoque la contraction des CMLV en activant la PLCβ qui hydrolyse le phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate en inositol triphosphate (IP_3) et en diacylglycérol (DAG) (**Figure 7**). La production d'IP_3 induit une libération de calcium, issue du réticulum endoplasmique, qui va se complexer avec la calmoduline. Ce complexe va phosphoryler les chaines légères de myosines, entrainant la contraction des CMLV et la vasoconstriction. En présence de calcium, le DAG active la protéine kinase C (PKC) qui participe également à la vasoconstriction en activant l'échangeur Na^+/H^+ qui provoque l'alcalinisation du milieu intracellulaire favorisant ainsi les interactions entre l'actine et la myosine (Vallega *et al.*, 1988). Une activation prolongée de la PKC par la conversion de l'acide phosphatidique en DAG conduit à un rétrocontrôle positif et donc une vasoconstriction soutenue. En effet, la phospholipase D (PLD), activée par le récepteur AT_1 et l'élévation de la PLC, hydrolyse la phosphatidylcholine en choline et acide phosphatidique qui sera lui-même converti en DAG par des phosphohydrolases. Le DAG participe également en tant qu'effecteur à la voie des MAPK qui contribue à la vasoconstriction (Mehta & Griendling, 2007). Les protéines kinases de la famille Src peuvent être phosphorylées par l'activation des récepteurs AT_1 par l'Ang II et vont jouer un rôle important dans la phosphorylation de la PLCβ et la formation d'IP_3 (Ishida *et al.*, 1995).

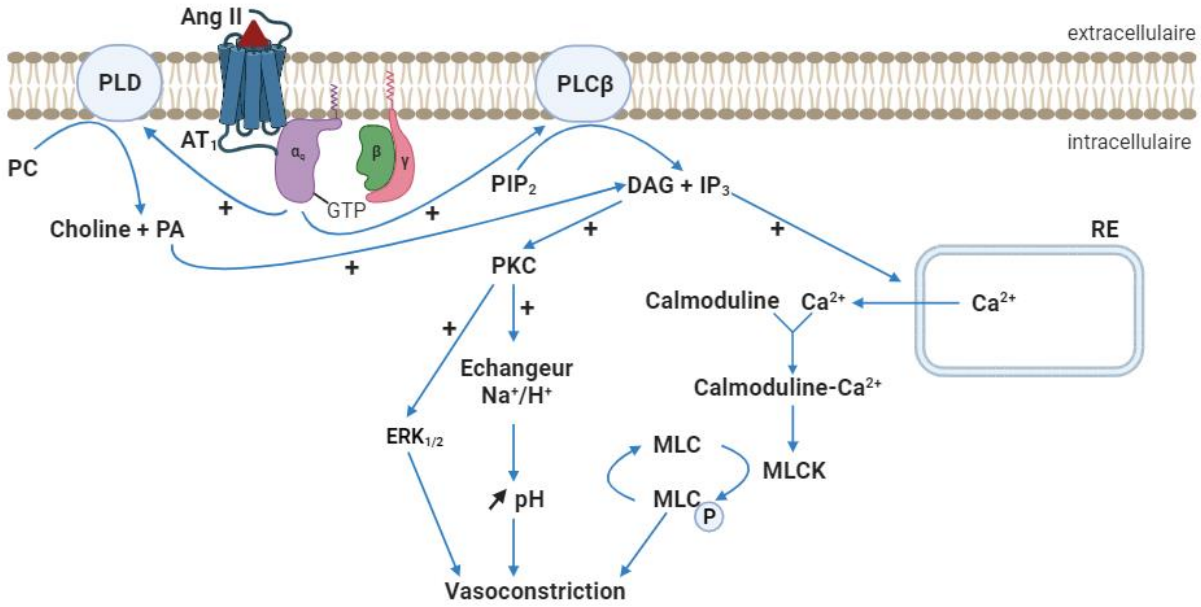


Figure 7 : Voies de signalisation impliquées dans la vasoconstriction induite par AT_1 couplé à la protéine G_q (schéma réalisé *via* BioRender). Par son couplage avec la protéine $G_{q/11}$, le récepteur AT_1 provoque la contraction des CMLV lorsqu'il est activé par un agoniste. Ang II : Angiotensine II ; AT_1 : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; DAG : diacylglycérol ; $ERK_{1/2}$: extracellular signal-regulated kinases 1/2 ; GTP : guanosine triphosphate ; IP3 : inositol triphosphate ; MLC : chaines légères de la myosine ; MLCK : kinase des chaines légères de la myosine ; PA : acide phosphatidique ; PC : phosphatidylcholine ; PIP_2 : phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate ; PLC : phospholipase C ; PLD : phospholipase D ; RE : réticulum endoplasmique

Connu pour activer principalement $G_{q/11}$, AT_1 a également la capacité d'activer $G_{i/o}$ et $G_{12/13}$ qui vont à leur tour activer des effecteurs spécifiques.

La protéine $G_{12/13}$, couplée au récepteur AT_1, est impliquée dans l'activation de la voie RhoA/ROCK, essentielle à la contraction et au remodelage vasculaire ainsi qu'à l'inflammation induite par l'Ang II (Wirth *et al.*, 2008). Les ROC kinases (ROCK) phosphorylent la sous-unité ciblant les phosphatases de la myosine (MYPT) qui inhibe la déphosphorylation des chaines légères de myosine et augmente donc la vasoconstriction.

La voie RhoA/ROCK peut également être activée en réponse à l'augmentation de calcium induit par IP_3. En effet, l'élévation de calcium active la kinase Jak2 qui pourra phosphoryler Arhgef1, un facteur d'échange de la guanine de RhoA, qui activera à son tour RhoA (Guilluy *et al.*, 2010).

L'activation d'AT_1 permet la production d'acide arachidonique et de ses métabolites en phosphorylant et en activant la phospholipase A2 (PLA2). Les dérivés de l'acide arachidonique jouent un rôle dans le maintien du tonus vasculaire, dans l'inflammation et dans l'oxydation de la NAD(P)H (Zafari *et al.*, 1999).

En plus de la PKC, l'activation du récepteur AT_1 peut induire des voies de signalisation aboutissant à l'activation d'autres protéines kinases intracellulaires telle que les MAPK et AKT qui sont impliquées dans la différenciation, la prolifération et la migration des CMLV (Taniyama *et al.*, 2004).

Parmi les MAPK, les $ERK_{1/2}$ (extracellular signal-regulated kinases) et la voie PI_3K/AKT, par l'activation de l'anoctamine-1 (ANO1), sont impliqués dans la contraction des CMLV médiée par l'Ang II (Touyz & Schiffrin, 2000; B. Wang *et al.*, 2015) ainsi que dans la croissance et la prolifération cellulaire (Touyz & Berry, 2002). Les kinases JNK et p38MAPK, quant à elles, ont un rôle dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire ainsi que dans l'inflammation induite par l'Ang II (Force *et al.*, 1996).

La voie des MAPK peut aussi stimuler la NADPH oxydase, générant ainsi des EROs tels que le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde. La génération de EROs, en particulier l'anion superoxyde, induit la dégradation du NO dans les CMLV et les cellules endothéliales (Gryglewski *et al.*, 1986; Rubanyi & Vanhoutte, 1986). L'activation des NADPH oxydases implique divers effecteurs tels que PLD, PKC, Src, PI_3K, AKT et Rac-1 (Seshiah *et al.*, 2002). La production de EROs est impliquée dans le remodelage et l'inflammation vasculaires, donc dans de nombreux processus pathologiques tels que l'hypertrophie vasculaire et l'hypertension (Marui *et al.*, 1993; Rajagopalan *et al.*, 1996; Ushio-Fukai *et al.*, 1996).

Au niveau cellulaire, dans les reins, la zone glomérulaire surrénalienne et les hépatocytes du foie, les récepteurs AT_1 couplés aux protéines $G_{i/o}$ induisent une diminution de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) en inhibant les adénylates cyclases (de Gasparo *et al.*, 2000; Katada *et al.*, 1986; Stryer & Bourne, 1986; Syrovatkina *et al.*, 2016).

Arrêt de la réponse médiée par les β-arrestines

Dès la fin des années 1990, certains travaux décrivaient l'interaction des β-arrestines avec AT_1 permettant une régulation négative des récepteurs, appelée désensibilisation, et leur internalisation (Lefkowitz & Shenoy, 2005).

Après stimulation, les récepteurs AT_1 activés sont phosphorylés par des GRK. Les β-arrestines sont alors recrutées sur AT_1 et inhibent la signalisation des protéines G en interférant avec la conformation du récepteur. Il s'agit de la désensibilisation homologue du récepteur (Hilger *et al.*, 2018; Violin & Lefkowitz, 2007). La phosphorylation par les GRK augmente l'affinité des arrestines pour le récepteur activé et ce recrutement d'arrestines permet le découplage du récepteur à la protéine G.

Les récepteurs peuvent aussi être phosphorylés par des kinases dépendantes de seconds messagers comme PKC et PKA, cependant ces dernières ne font pas la distinction entre récepteur activé et inactivé, entrainant une désensibilisation du récepteur par les β-arrestines, quel que soit son état d'activation. Il s'agit de la désensibilisation hétérologue (S. Rajagopal & Shenoy, 2018). Un dernier mécanisme peut conduire au couplage du récepteur AT_1 avec les β-arrestines, il s'agit de l'étirement mécanique.

La famille des arrestines regroupe quatre isoformes qui partagent environ 50% d'identité de séquence, l'arrestine-1, l'arrestine-2 (ou β-arrestine 1), l'arrestine-3 (ou β-arrestine 2) et l'arrestine-4. Selon leur fonction et leur homologie de séquence, ces arrestines sont divisées en deux sous-groupes : les arrestines visuelles exprimées spécifiquement dans la rétine (arrestine-1 pour les bâtonnets et arrestine-4 pour les cônes) et les β-arrestines exprimées ubiquitairement et partageant 76% d'identité de séquence (Nakagawa *et al.*, 2002). Ces β-arrestines régulent la transduction du signal des RCPG non visuels.

Les β-arrestines jouent un rôle crucial dans le processus d'internalisation des récepteurs. Elles facilitent l'association entre les récepteurs et la formation de structures recouvertes de clathrines appelées CCP (clathrin coated pit) en se liant au complexe de clathrines ainsi qu'à l'adaptateur de clathrine 2 (AP-2) (Fessart *et al.*, 2005).

L'interaction d'une β-arrestine avec le récepteur AT_1 phosphorylé est suivie d'un changement de conformation de cette β-arrestine entrainant la libération de son extrémité C-terminale (**Figure 8**), contenant des motifs de liaison pour les clathrines et AP-2 (Gurevich & Gurevich, 2013; Lefkowitz & Shenoy, 2005; Ostermaier *et al.*, 2014). Cette région a également une haute affinité pour la liaison aux phosphoinositides par la présence de plusieurs résidus chargés positivement (Zhuang *et al.*, 2010).

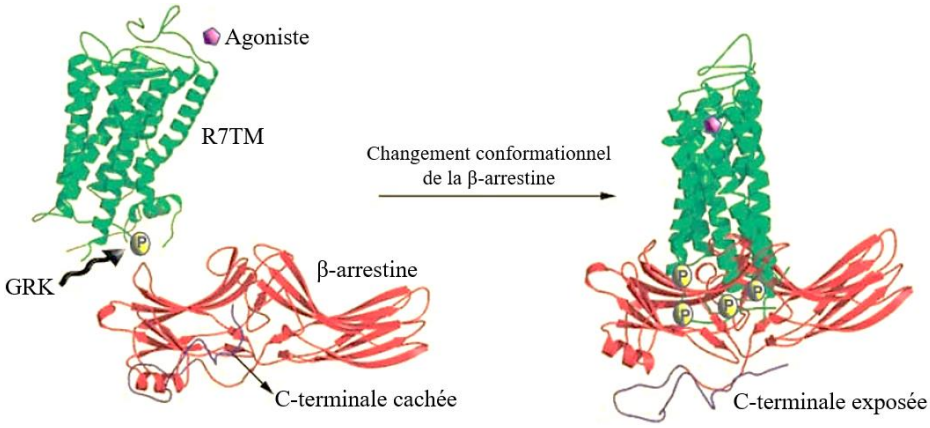


Figure 8 : Changements conformationnels de la β-arrestine 2 et libération de son extrémité C-terminale dépendants de l'activation du récepteur par son agoniste (Modifié d'après Lefkowitz *et al*) (Lefkowitz & Shenoy, 2005). La β-arrestine modifie sa conformation en interagissant avec le récepteur activé par son agoniste. L'extrémité C-terminale de la β-arrestine (en gris) se retrouvera donc à l'extérieur de la structure (mouvement illustré par la flèche noire). GRK : G protein-coupled receptor kinase ; R7TM : récepteur à 7 domaines transmembranaires.

L'ensemble de ces interactions provoque le déplacement du complexe vers les puits recouverts de clathrines (**Figure 9**). Ces puits s'invaginent progressivement jusqu'à la libération de la vésicule dans le cytosol. La division de la vésicule est réalisée par la dynamine qui s'enroule autour du col vésiculaire et le ferme par contraction en utilisant l'hydrolyse du GTP comme source d'énergie. Une fois libérées dans le cytosol, les vésicules sont dépouillées des clathrines afin que leur membrane puisse interagir avec les protéines motrices du cytosquelette et fusionner avec les endosomes précoces (McMahon & Boucrot, 2011).

L'internalisation des récepteurs AT_1 peut se faire *via* une voie indépendante de la clathrine, la voie des cavéolines. Ces structures sont des invaginations de la membrane plasmique qui sont formées par les protéines cavéolines et cavins et enrichies en glycosphingolipides et cholestérol (Kovtun *et al.*, 2015). L'internalisation des vésicules recouvertes de cavéolines est également dépendante de la dynamine.

Après internalisation, les récepteurs sont soit recyclés à la membrane, soit dégradés dans les lysosomes. Le récepteur AT_1 recrute les deux types de β-arrestines de manière égale et s'internalise sous forme de complexe stable, induisant un recyclage lent vers la membrane plasmique (Gáborik & Hunyady, 2004; Thomas & Qian, 2003). Il s'agit donc de récepteurs de classe B qui ont une affinité élevée et similaire avec les deux isoformes de β-arrestine, d'après les données *in vitro* (Oakley *et al.*, 2000).

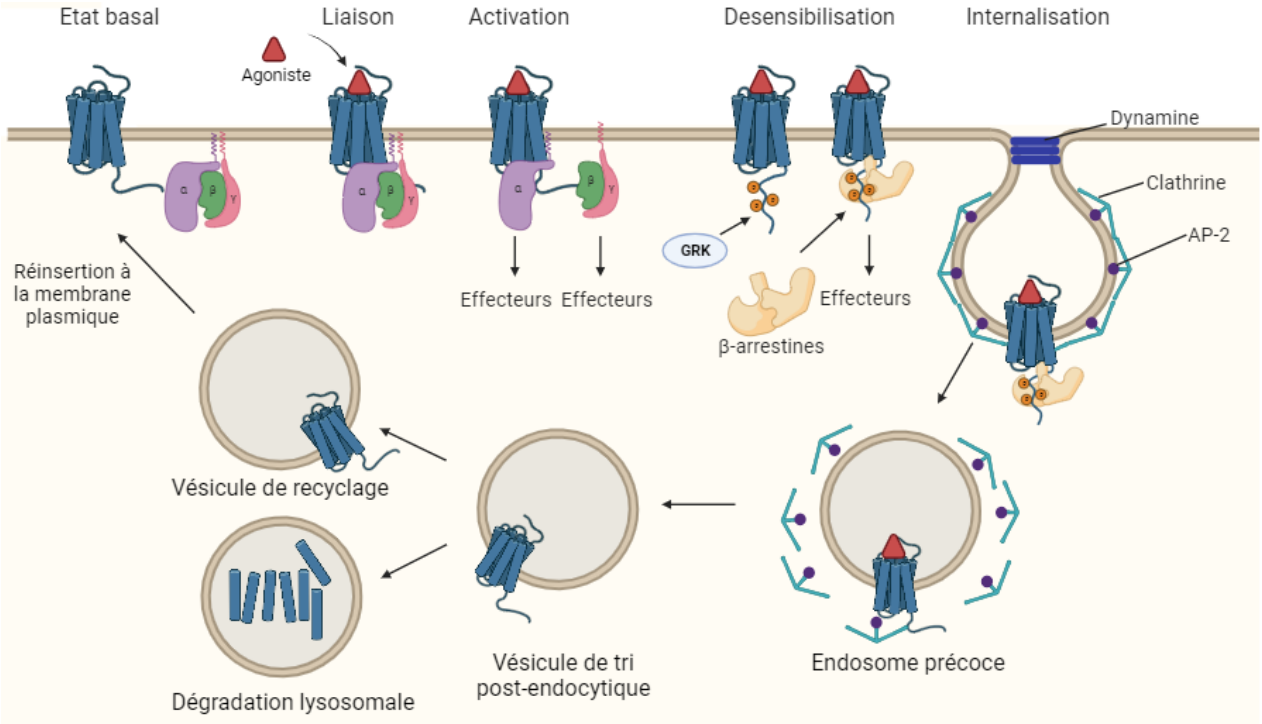


Figure 9 : Cycle d'activation, désensibilisation et internalisation du récepteur (schéma réalisé *via* BioRender et modifié d'après Ramachandran *et al*) (Ramachandran *et al.*, 2012). Le récepteur activé par son agoniste va être phosphorylé par les GRK afin d'être reconnu et lié par les β-arrestines. Ce complexe se déplace dans des puits recouverts de clathrines et va être invaginé jusqu'à la libération de la vésicule dans le cytosol. Les vésicules sont ensuite dépouillées des clathrines afin que leur membrane puisse interagir avec les protéines motrices du cytosquelette et fusionner avec les endosomes précoces. Les récepteurs retrouvés dans les endosomes peuvent ensuite être dégradés ou recyclés à la surface de la membrane plasmique. AP-2 : adaptateur de clathrine 2 ; GRK : G protein-coupled receptor kinase

Cette internalisation a un impact sur la capacité de réponse de la cellule à la stimulation par un agoniste. Ce mécanisme pourrait permettre le maintien de l'homéostasie des RCPG, le contrôle de la distribution membranaire des récepteurs ou la création d'une réserve intracellulaire de récepteurs disponibles pour remplacer ceux désensibilisés (McDonald *et al.*, 2007).

Ce n'est que plus tardivement que de nombreux travaux ont confirmé que les β-arrestines peuvent déclencher des voies de signalisation en agissant comme des protéines adaptatrices.

Signalisation médiée par les β-arrestines

En plus de la désensibilisation et de l'internalisation du récepteur AT_1 permettant sa régulation à la baisse, la voie des β-arrestines déclenche de nombreuses signalisations en servant de protéines d'échafaudage protéique en aval des RCPG, comme la voie Src, MAPK et AKT/mTOR (Luttrell *et al.*, 1999, 2018; Luttrell & Lefkowitz, 2002). La voie de signalisation des β-arrestines pourrait ainsi être impliquée dans divers processus cellulaires tels que la prolifération et la croissance cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, l'absorption et la migration de nutriments. Ces β-arrestines jouent également un rôle dans la suppression de l'apoptose médiée par le récepteur AT_1 (Povsic *et al.*, 2003; Revankar *et al.*, 2004).

Un complexe AT_1/arrestine/Src peut se former à la membrane plasmique et a été observé sur des fibroblastes et des cellules HEK 293 (Luttrell *et al.*, 1999). Il serait impliqué dans la prolifération, la survie et l'adhésion cellulaire ainsi que le réarrangement du cytosquelette et le trafic membranaire (Bromann *et al.*, 2004; Parsons & Parsons, 2004). Le complexe arrestine/Src régule des protéines impliquées dans le contrôle de l'endocytose des RCPG (GRK, dynamine, AP-2) ainsi que des kinases d'adhésion focale permettant la modulation du cytosquelette et la migration cellulaire (Cleghorn *et al.*, 2015).

Les arrestines font partie des protéines d'échafaudage qui permettent l'activation des voies MAPK. Leur surexpression entraine une diminution de la production d'IP_3 et renforce l'activation de la voie $ERK_{1/2}$ suite à une stimulation d'AT_1 (Tohgo *et al.*, 2002). La forme activée $ERK_{1/2}$ liée à l'arrestine est impliquée dans la désensibilisation du récepteur, le réarrangement du cytosquelette, la traduction des protéines et donc dans la prolifération cellulaire (Pitcher *et al.*, 1999; Elorza *et al.*, 2003). Cette signalisation semble liée à la signalisation des protéines G car en l'absence de cette dernière dans les cellules HEK 293, l'activation des réponses ERK ne peut s'établir (Grundmann *et al.*, 2018).

Les β-arrestines peuvent induire ou inhiber la voie PI3K/AKT/mTOR permettant une régulation précise du cycle cellulaire et de la croissance cellulaire. Après stimulation d'AT_1, les arrestines favorisent la phosphorylation de mTOR dépendante d'AKT (Kendall *et al.*, 2014). A l'inverse, après stimulation du récepteur PAR-2, les deux sous-types de β-arrestines inhibent l'activité de la PI_3K (Luan *et al.*, 2009). Les β-arrestines peuvent également bloquer l'activité du facteur de transcription anti-apoptotique NFκB en se liant à la protéine inhibitrice IκB, la stabilisant, après la stimulation du récepteur (Witherow *et al.*, 2004).

La voie des β-arrestines, permet de limiter la signalisation du récepteur AT_1 en interrompant le couplage de la protéine G hétérotrimérique, mais a donc, elle aussi, une cascade de signalisation qui lui est propre avec des effets protecteurs potentiels en régulant la mobilité cellulaire, la croissance cellulaire et l'apoptose ainsi que l'absorption et la migration de nutriments.

L'ensemble des voies de signalisation induites par l'activation du récepteur AT_1 a fait l'objet de nombreuses revues qui détaillent les connaissances de toute la signalisation AT_1 et de la signalisation induite par les β-arrestines (Delaitre *et al.*, 2021; DeWire *et al.*, 2007; Kawai *et al.*, 2017; Mehta & Griendling, 2007).

2. Les récepteurs AT_2

a. Généralités

Comme mentionné précédemment, les activités physiologiques du récepteur AT_2 s'opposent à celles du récepteur AT_1 avec l'induction de vasodilatation, des effets pro-apoptotiques et antiprolifératifs (Tsutsumi & Saavedra, 1991; Touyz & Schiffrin, 2000; Dimitropoulou *et al.*, 2001).

Le récepteur AT_2 possède une affinité pour l'Ang II similaire à celle du récepteur AT_1, de l'ordre du nanomolaire, cependant l'activité AT_1 prédomine sur l'activité d'AT_2 en condition physiologique car les récepteurs AT_1 sont plus abondamment exprimés chez l'adulte.

Bien que le récepteur AT_2 soit principalement exprimé au stade fœtal, sa faible expression est limitée à certains tissus chez l'adulte comme le cerveau, le cœur, les reins, les ovaires et les vaisseaux (Kaschina & Unger, 2003). Une grande homologie de séquence du récepteur AT_2 est retrouvée entre les rongeurs et l'homme, de l'ordre de 72% avec des différences concentrées sur la partie N-terminale (de Gasparo *et al.*, 2000).

b. Signalisation

De nombreuses études de clonage ont montré le caractère atypique de ce récepteur, n'induisant ni la voie des protéines G classique ni la voie des β-arrestines, mais pouvant se coupler à une protéine G_i. Des preuves indirectes confirment ce couplage car en empêchant l'action de ces protéines G_i, par des mutations de gènes ou par simple inhibition, cela affecte également la médiation du signal des récepteurs AT_2 (Hansen *et al.*, 2000; J. Li *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, il n'a jamais été démontré par un test fonctionnel qu'AT_2 était capable d'activer directement les voies canoniques associées aux RCPG. Cependant, l'étude de la signalisation du récepteur AT_2 a beaucoup progressé ces dernières années tant au niveau des voies de signalisation qu'au niveau des effets physiologiques et cellulaires (Karnik *et al.*, 2015; Steckelings *et al.*, 2022).

Les impacts physiologiques d'AT_2 sont inverses à ceux des récepteurs AT_1, il est donc logique que sa signalisation soit différente. En effet, les réponses physiologiques principales sont une vasodilatation, la prévention de l'acidification du milieu cellulaire, une action antiproliférative, anti-inflammatoire et pro-apoptotique. Bien que la signalisation du récepteur AT_2 ne soit pas encore parfaitement établie, de nombreux facteurs ont été identifiés, notamment la production et libération de NO et de bradykinine (BK) puis l'activation de nombreuses protéines phosphatases (Padia & Carey, 2013).

La vasodilatation induite par les récepteurs AT_2 est consécutive à plusieurs signalisations (**Figure 10**). La production de NO résultante de la stimulation de la eNOS par le récepteur AT_2 induit la voie GCs/GMPc permettant un relâchement des CML (Siragy & Carey, 1997). De plus, AT_2 inhibe l'activation de la voie RhoA/ROCK et donc la phosphorylation des chaines légères de la myosine (Savoia *et al.*, 2005). Pour finir, il peut activer la phospholipase A2 (PLA2), entrainant une libération d'acide arachidonique. Ce dernier, dégradé en acide époxy-eicosatrienoique par les cytochromes P450, stimulerait les canaux potassiques à large conductance activés par le calcium, permettant la vasodilatation (Dimitropoulou *et al.*, 2001).

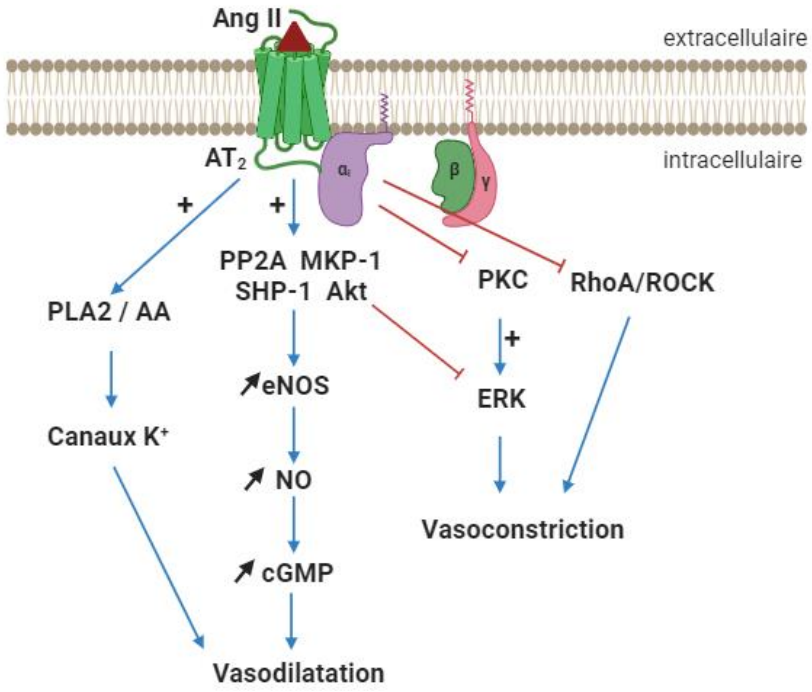


Figure 10 : Voies de signalisation impliquées dans la vasodilatation induite par AT_2 (schéma réalisé *via* BioRender). La vasodilatation induite par les récepteurs AT_2 activés par leur agoniste est consécutive à plusieurs signalisations induisant directement la vasodilatation ou participant à l'inhibition de la vasoconstriction. AA : Acide arachidonique ; Akt : protein kinase B ; Ang II : Angiotensine II ; AT_2 : récepteur de type 2 de l'angiotensine II ; eNOS ; ERK : extracellular signal-regulated kinases ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; MKP-1 : mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 ; NO : nitric oxide ; PKC ; PLA2 : phospholipase A2 ; PPA2 : protein phosphatase A2 ; SHP-1 : SH2 domain-containing phosphatase 1

AT_2 exerce aussi un rôle anti-inflammatoire en inhibant l'activité de la NAD(P)H oxydase au niveau de CMLV et de tissus aortiques, responsable de la production d'EROs (M. Iwai *et al.*, 2005). Il a également un effet pro-apoptotique en activant une protéine suppresseur de tumeur p53 dans les cellules endothéliales, permettant la mise en sénescence des cellules et à terme la mort cellulaire (Peluso *et al.*, 2022).

L'activité du récepteur AT_2 est également médiée par la bradykinine. La stimulation des AT_2 dépendante des récepteurs de la bradykinine active la protéine kinase A qui va phosphoryler eNOS (Yayama *et al.*, 2006). De plus, l'hétérodimérisation entre ces deux récepteurs induit l'augmentation de la production de cGMP et de NO (Abadir *et al.*, 2006).

Enfin, l'activation des protéines phosphatases comme la PP2A (protein phosphatase A2), MKP-1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase 1) et SHP-1 (SH2 domain-containing phosphatase 1) est indispensable pour le rôle protecteur du récepteur. Elle est une étape primordiale dans la signalisation des récepteurs AT_2, que la signalisation en amont implique ou non des protéines G. Elle est au centre de l'activation des actions anti-inflammatoire, antifibrotique, rénale, vasodilatatrice et neuroprotectrice. C'est pourquoi le récepteur AT_2 est décrit comme exerçant des actions protectrices dans de nombreuses pathologies (Steckelings *et al.*, 2022).

3. L'équilibre AT_1/AT_2

Les récepteurs AT_1 et les récepteurs AT_2, ainsi que leur équilibre fonctionnel, sont des acteurs importants dans la régulation de la circulation cérébrale (Colin *et al.*, 2023). L'Ang II est un peptide à la fois vasoconstricteur et vasodilatateur suivant sa liaison avec les récepteurs AT_1 ou les récepteurs AT_2 respectivement. Un équilibre s'instaure entre ces récepteurs, comme cela a été établi au niveau cérébrovasculaire. En effet, chez la souris, la réponse pressive mesurée par tensiomètre induite par l'Ang II, injectée par l'intermédiaire d'une micro canule implantée dans un ventricule cérébral unilatéral, est plus importante si les récepteurs AT_2 sont bloqués par un antagoniste, le PD123319 (Z. Li *et al.*, 2003). Inversement, une vasodilatation médiée par l'Ang II est observée lorsque les récepteurs AT_1 sont inhibés par un sartan (Vincent *et al.*, 2005). Chez les rats hypertendus, la pression artérielle est réduite lorsque les récepteurs AT_1 sont bloqués par un sartan (de Oliveira-Sales *et al.*, 2010). De plus, la stimulation des récepteurs AT_2 par un agoniste spécifique induit une diminution de la pression artérielle. En effet une corrélation a été établie entre une diminution de la pression artérielle, une diminution de l'activité du nerf sympathique rénal et l'augmentation de l'expression protéique d'AT_2 dans la médulla ventrolatérale rostrale de rats (Gao *et al.*, 2008).

L'équilibre AT_1/AT_2 peut être régulé directement en impactant le niveau d'expression de ces récepteurs. Pour le récepteur AT_1, la protéine ATRAP (protéine associée au récepteur AT_1) agit comme un régulateur négatif en inhibant l'activation de la PLC, la production d'IP_3 et la prolifération cellulaire (Lopez-Ilasaca *et al.*, 2003; Mogi *et al.*, 2007). De plus, la surexpression de cette protéine va augmenter l'internalisation du récepteur AT_1, diminuant son expression à la surface des cellules (Tanaka *et al.*, 2005). Pour le récepteur AT_2, c'est le facteur de transcription PLZF qui diminuera son expression (Senbonmatsu *et al.*, 2003). A l'inverse, la protéine ARAP-1 potentialise la signalisation d'AT_1 en restaurant son expression membranaire (Guo *et al.*, 2006). Quant au récepteur AT_2, la protéine ATIP (aussi nommée ATBP50) impacte positivement l'expression de ce récepteur à la membrane en régulant son transport vers la membrane cellulaire. De plus, l'expression d'AT_2 à la membrane régule positivement l'expression de l'ARNm d'ATIP générant une boucle de rétroaction positive (Wruck *et al.*, 2005).

Cet équilibre AT_1/AT_2 est crucial et sera modifié en faveur des récepteurs AT_1 lors de situations physiopathologiques, engendrant des conséquences délétères notamment au niveau cérébrovasculaire.

Partie 2 : L'inhibition d'AT_1 et les nouvelles pistes thérapeutiques

L'importance du récepteur AT_1 dans les nombreuses pathologies citées ci-dessus fait de lui une cible thérapeutique de premier ordre. La première piste thérapeutique étudiée a eu pour objectif de bloquer totalement le récepteur AT_1 et sa signalisation en aval par l'utilisation d'antagonistes du récepteur, les ARA, aussi appelés sartans. Au cours de ces dernières décennies, le récepteur AT_1 a fait l'objet de nombreuses recherches et de nouveaux mécanismes de signalisation de ce récepteur ont vu le jour, rendant sa pharmacologie encore plus complexe. L'étude de la structure et des différents changements conformationnels des récepteurs AT_1 et AT_2 pourrait permettre l'émergence de nouvelles réflexions quant à la régulation de leur signalisation et de leur impact physiologique.

I. Structure et conformation des récepteurs à l'angiotensine II

1. Structure des récepteurs AT_1 et AT_2

Actuellement, plus d'une centaine de structures tridimensionnelles de RCPG ont été obtenues par cristallographie (Shonberg *et al.*, 2015; D. Zhang *et al.*, 2015) améliorant constamment les modèles structuraux par homologie de séquence et de nombreux logiciels, dont alphafold, sont de plus en plus utilisés. De plus, l'obtention des structures de certains RCPG dans différents états conformationnels d'activation, ou en interaction avec divers partenaires, fournit une meilleure compréhension de la relation entre la structure et la fonction du récepteur.

Les RCPG partagent plusieurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles. Une topologie membranaire commune à tous les RCPG a été observée avec sept segments hydrophobes composés chacun d'environ 25 à 35 acides aminés. Une forte homologie de séquence entre RCPG est constatée au niveau des sept domaines transmembranaires (DTM), allant de 30 à 100% d'homologie (Cvicek *et al.*, 2016). Ces segments sont reliés entre eux par trois boucles intracellulaires cytoplasmiques et trois boucles extracellulaires. Les RCPG possèdent également un domaine amino-terminal extracellulaire (N-ter) et une extrémité carboxy-terminale (C-ter) du côté cytoplasmique.

Les parties extracellulaires et les DTM sont impliqués dans la liaison du ligand et la transmission du signal d'activation jusqu'aux parties intracellulaires participant à la signalisation cellulaire en interagissant avec des effecteurs.

La majorité des RCPG possèdent deux cystéines situées à l'extrémité de la première boucle extracellulaire et sur la deuxième boucle extracellulaire formant un pont disulfure qui joue un rôle important dans la stabilisation des conformations du récepteur. L'extrémité C-terminale du récepteur possède un ou plusieurs sites de palmitoylation, impliqué dans l'ancrage lipidique dans la membrane, au niveau de la sortie du septième segment transmembranaire.

L'extrémité N-terminale correspond à la région la plus variable pouvant aller de 4 acides aminés à 5900 acides aminés. La deuxième boucle extracellulaire présente également une grande variété de structures secondaires. L'arrangement des DTM au sein de la membrane plasmique diffère aussi, induisant d'importantes différences dans la taille et la forme de la poche de liaison du ligand. Les différences significatives de taille des boucles et des extrémités N- et C-terminales ainsi que la variation des séquences de ces extrémités constituent l'un des critères permettant de distinguer plusieurs familles de RCPG. Quatre classes majeures ressortent du modèle de Kolakowski, principalement basées sur l'homologie de séquence, avec les classes A, B, C et F (Fredriksson & Schiöth, 2005; Jacoby *et al.*, 2006). La classe A regroupe les RCPG similaires à la rhodopsine qui sont impliqués dans différentes fonctions telles que l'odorat, la vision, la production d'hormones et la neurotransmission. La deuxième classe, la classe B, est composée de RCPG semblables au récepteur de la sécrétine et regroupe les familles « Adhésion » et « Sécrétine » du système GRAFS. La classe C comprend ceux similaires au récepteur du glutamate alors que la classe F rassemble les récepteurs homologues aux protéines Frizzled/Smoothened (**Figure 11**) (Fredriksson & Schiöth, 2005).

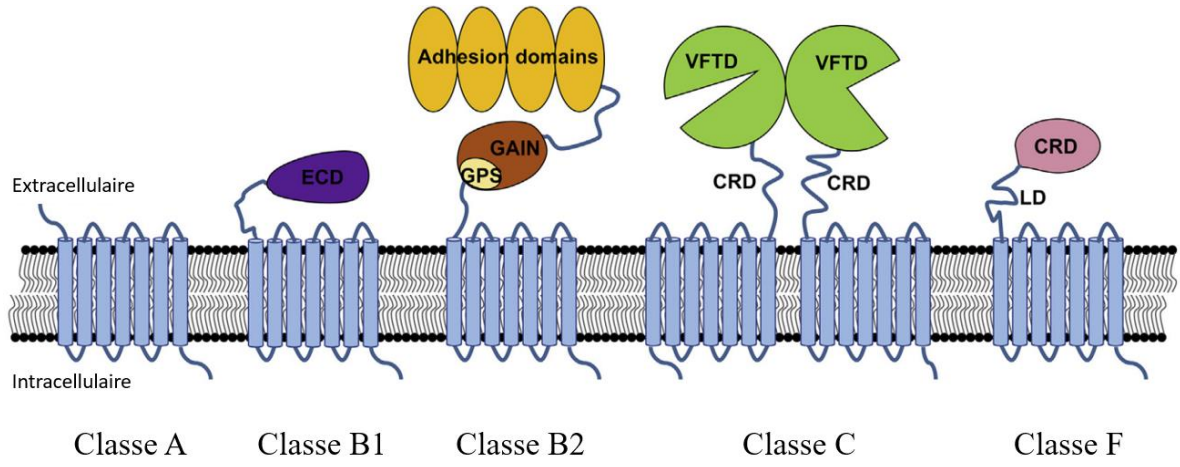


Figure 11 : Description schématique des caractéristiques structurelles des grandes classes de RCPG (adapté de Qu *et al* (Qu *et al.*, 2020)). Les RCPG de classe A ont une extrémité N-terminale courte tandis que ceux de classe B1 ont un ECD et ceux de classe B2 ont une extrémité N-terminale très longue composée *in fine* de domaines d'adhésion. La classe C comporte des VFTD responsables de la liaison du ligand endogène et de la formation de dimères. La classe F regroupe les RCPG avec un CRD à l'extrémité N-terminale. CRD : cysteine-rich domain ; ECD : exracellular domain ; GAIN : GPCR autoproteolysis-inducing domain ; GPS: GPCR proteolytic site ; LD : linker domain ; VFTD : venus flytrap domain

La classe A « Rhodopsin-like » regroupe près de 80% des RCPG avec une homologie globale d'une vingtaine d'acides aminés hautement conservés. Plusieurs séquences consensus sont retrouvées dont les deux cystéines permettant le pont disulfure, le motif E/DRY situé à l'extrémité cytoplasmique du troisième DTM et le motif NPxxY au niveau du septième DTM jouant un rôle dans l'activation et la réponse à l'agoniste du récepteur (He *et al.*, 2001; Rovati *et al.*, 2007).

Cette classe de RCPG présente une huitième hélice au début de la partie C-terminale qui possède, pour certains, une cystéine pouvant être palmitoylée permettant son ancrage à la membrane plasmique (Ovchinnikov *et al.*, 1988). D'autres modifications post-traductionnelles peuvent survenir, comme la glycosylation assurant le bon repliement et la stabilité du récepteur et pouvant influencer l'affinité du ligand pour son récepteur (Lanctot *et al.*, 2005).

a. Structure secondaire du récepteur AT_1

Chez l'Homme le récepteur AT_1 est composé de 359 acides aminés avec un poids moléculaire proche de 41 kDa (**Figure 12**). Chez le rat, les récepteurs AT_{1A} et AT_{1B} comprennent également 359 acides aminés mais leur séquence varie respectivement de 19 et 21 acides aminés en comparaison au récepteur AT_1 humain (Auzan & Clauser, 2009).

Les régions extracellulaires, comprenant la partie N-terminale et 3 boucles extracellulaires, ont trois sites de N-glycosylation, nécessaires pour le bon repliement du récepteur et son adressage à la membrane (Deslauriers *et al.*, 1999; Lanctôt *et al.*, 1999). Il y a également 10 résidus cystéines dont 4 (sur la partie N-terminale et la troisième boucle extracellulaire) qui sont impliqués dans des ponts disulfures essentiels pour la liaison avec l'Ang II (Ohyama *et al.*, 1995). La région cytoplasmique du récepteur, comprenant les trois boucles intracellulaires et la queue C-terminale, a de nombreux sites pouvant être phosphorylés par des sérines-thréonines kinases, notamment par la protéine kinase C (PKC) (**Figure 12**).

Le récepteur AT_1 possède plusieurs séquences classiquement retrouvées dans les RCPG de classe A dont le motif DRY, situé sur le 3ème DTM, impliqué dans le couplage et l'activation de la protéine Gq (Ohyama *et al.*, 2002). Le motif NPxxY impliqué dans la médiation du signal d'AT_1 est retrouvé sur la partie C-terminale du 7ème DTM. La substitution de la tyrosine de cette séquence entraine une diminution de la signalisation médiée par la voie des protéines G mais n'induit pas de diminution de l'interaction médiée par la voie des β-arrestines (Hunyady *et al.*, 1995; Laporte *et al.*, 1996). Ces études montrent que le récepteur AT_1 peut médier son signal selon deux voies, l'une dépendante de la protéine G et l'autre indépendante de cette voie (**Figure 12**).

D'autres mutations du récepteur AT_1 permettent de modifier/moduler sa signalisation. En effet, une augmentation de la signalisation médiée par les protéines G et une diminution de l'internalisation sont observées chez les mutants Δ329, récepteurs AT_1 avec une délétion des 31 derniers résidus de la queue cytoplasmique (Conchon *et al.*, 1998). Une diminution de l'action de la phospholipase C sans modification de l'internalisation est constatée lorsque l'aspartate 74 est muté en asparagine (D74N). Cependant, si l'aspartate est muté en tyrosine, l'effet inverse est observé (Hunyady *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 2000). Ces études ont suggéré que le récepteur AT_1 peut adopter différentes conformations qui lui permettent de moduler sa signalisation et activer différentes voies.

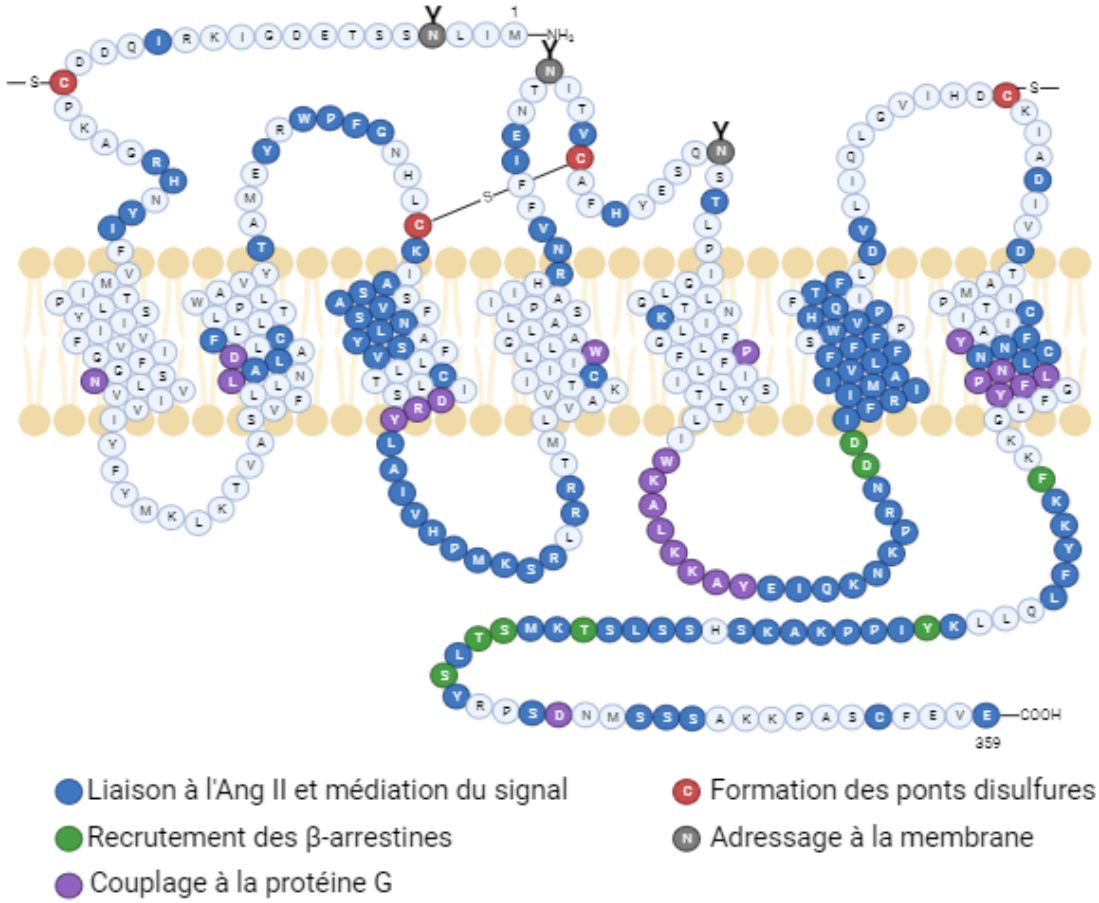


Figure 12 : Structure secondaire du récepteur AT_1 humain (schéma réalisé *via* BioRender). Ce récepteur a différents acides aminés identifiés comme intervenant dans la liaison à l'Ang II, la formation de ponts disulfure, l'adressage à la membrane et le recrutement des différents effecteurs.

b. Structure secondaire du récepteur AT_2

Le récepteur AT_2 est également un RCPG de classe A, partageant une homologie de séquence d'acides aminés de 34% avec le récepteur AT_1 (Ichiki *et al.*, 1994) mais possèdant la même affinité pour l'Ang II de l'ordre du nanomolaire. Le récepteur AT_2 est composé de 363 acides aminés codés par une seule région présente sur le chromosome X, pour un poids moléculaire d'environ 41kDa (**Figure 13**). Il possède 5 sites de N-glycosylation sur son extrémité N-terminale et 4 résidus cystéines sur la partie extracellulaire, impliqués dans la formation de ponts disulfures. Contrairement au récepteur AT_1, ces ponts ne sont pas primordiaux pour la liaison de l'Ang II au récepteur AT_2 (Heerding *et al.*, 2001).

Le récepteur AT_2 possède également de nombreuses séquences retrouvées dans les RCPG de classe A et dans AT_1, à savoir le motif DRY situé sur le 3ème DTM et le motif NPxxY sur le 7ème DTM nécessaires au couplage à la protéine G. En revanche, la 3ème boucle intracellulaire et la queue C-terminale divergent fortement, contribuant au fait qu'AT_2 ne semble pas capable de s'associer aux protéines G et à l'absence de recrutement des β-arrestines (de Gasparo *et al.*, 2000; Karnik *et al.*, 2015).

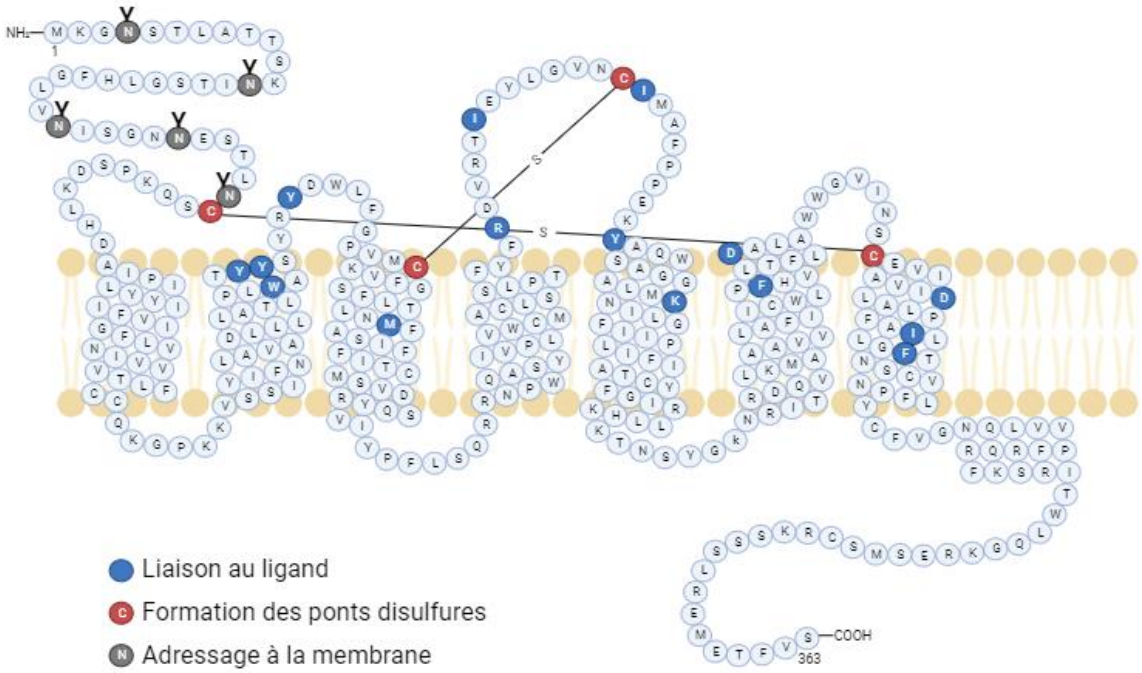


Figure 13 : Structure secondaire du récepteur AT_2 humain (schéma réalisé *via* BioRender). Ce récepteur a certains acides aminés identifiés comme intervenant dans la liaison au ligand, la formation de ponts disulfures et l'adressage à la membrane.

2. Conformation des récepteurs AT_1 et AT_2

a. Etats conformationnels du récepteur AT_1

Les travaux de Cabana en 2015 ont permis de mettre en évidence des conformations distinctes du récepteur AT_1 pour activer la voie des protéines G ou la voie des β-arrestines. L'activation de la voie des protéines G nécessite un changement conformationnel du 7ème DTM induit par le ligand alors que la voie des β-arrestines peut être activée à l'état conformationnel basal du récepteur (Miura *et al.*, 2003; Cabana *et al.*, 2015; Delaitre *et al.*, 2021).

Selon la nature du ligand qui se lie à AT_1, le récepteur peut adopter au moins trois conformations, inactive, canonique active ou alternative active, qui ont pu être décryptées récemment par dynamique moléculaire et cristallographie aux rayons X (Suomivuori *et al.*, 2020; Wingler, *et al.*, 2019a; Wingler *et al.*, 2020; Wingler, *et al.*, 2019b) (**Figure 14**). La conformation inactive du récepteur AT_1 a un positionnement du 6ème DTM vers l'intérieur ainsi qu'un léger mouvement vers l'extérieur du 7ème DTM, excluant tout contact avec les effecteurs intracellulaires protéines G et β-arrestines (Takezako *et al.*, 2017; H. Zhang *et al.*, 2015a). Les ARA permettent de stabiliser cette conformation inactive, entrainant un agonisme inverse observé pharmacologiquement.

La fixation de l'Ang II ou d'agonistes biaisés (*cf.* Partie 2. III. 1 – p40) vers la voie des protéines G, induit la conformation canonique active avec un déplacement vers l'extérieur du 6ème DTM (Suomivuori *et al.*, 2020), caractéristique de l'activation des principales voies de signalisation G_q

(Wingler *et al.*, 2020). Un déplacement vers l'extérieur du 7ème DTM dans la partie intracellulaire permet l'interaction avec les différents effecteurs intracellulaires dont les protéines G et les β-arrestines.

La conformation alternative active, quant à elle, privilégie presque exclusivement la voie de signalisation des β-arrestines. En effet, le déplacement incomplet vers l'extérieur du 7ème DTM du côté intracellulaire empêche le couplage des protéines G au motif DRY du récepteur. Cependant les deux conformations actives (canonique et alternative) peuvent interagir avec les β-arrestines.

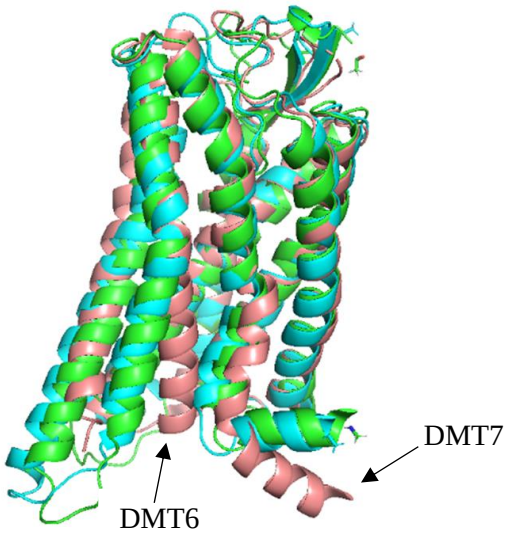


Figure 14 : Changements conformationnels connus du récepteur AT_1 : conformation inactive (rose), canonique active (vert) et alternative active (cyan) (D'après Delaitre *et al.* 2021). Les DTM6 et DTM7 sont situés à l'avant. Dans la structure inactive, le DTM6 est courbé à l'intérieur du récepteur alors que son DTM7 est légèrement tourné vers l'extérieur

Une hypothèse intéressante a été avancée pour expliquer pourquoi le récepteur AT_1 peut adopter une conformation alternative active qui se lie presque exclusivement à la β-arrestine et non aux protéines G. Wingler *et al.* ont suggéré qu'un mécanisme de signalisation biaisée pourrait prédisposer AT_1 à adopter une conformation β-arrestine exclusive (Wingler *et al.*, 2020). Il est intéressant de noter que la liaison de l'Ang II à AT_1 induit non seulement des modifications au niveau de la poche de liaison du ligand, mais également au niveau des résidus qui constituent un réseau polaire crucial dans la région transmembranaire du récepteur. Dans la plupart des RCPG de classe A, ce réseau polaire forme un site de liaison au sodium qui stabilise la conformation inactive. Cette interaction Na^+/RCPG est due à la liaison entre le Na^+ et une sérine hautement conservée dans le 3ème DTM. Cependant, pour le récepteur AT_1, cette sérine est remplacée par l'asparagine atténuant la liaison de Na^+ et favorisant ainsi la conformation alternative active. Des substitutions de résidus similaires dans le motif conservé de liaison Na^+ ont été rapportées dans plusieurs récepteurs de chimiokines atypiques, tels que le récepteur CXCR7 (Galzi *et al.*, 2010; S. Rajagopal *et al.*, 2010), qui ne signalent pas *via* les protéines G, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle l'absence du site de liaison Na^+ pourrait privilégier la conformation alternative active β-arrestine exclusive.

L'induction d'une modification covalente directement sur le récepteur AT_1 pourrait aussi moduler sa conformation et donc sa signalisation comme cela semble être le cas lors de la *S*-nitrosation du récepteur AT_1 (Bouressam *et al.*, 2019) (*cf.* Partie 2. IV. 2 – p47). Ce récepteur peut également être activé par un stress mécanique, indépendant de la liaison de ligand, il s'agit donc d'un mécanosenseur (Zou *et al.*, 2004). Le stress mécanique induit un réarrangement du 7ème DTM permettant au récepteur de passer en conformation active (Yasuda *et al.*, 2008). Fait intéressant, l'antagoniste des récepteurs AT1, le candesartan, inhibe cette activation mécanique en stabilisant la conformation inactive du récepteur (**Figure 15**).

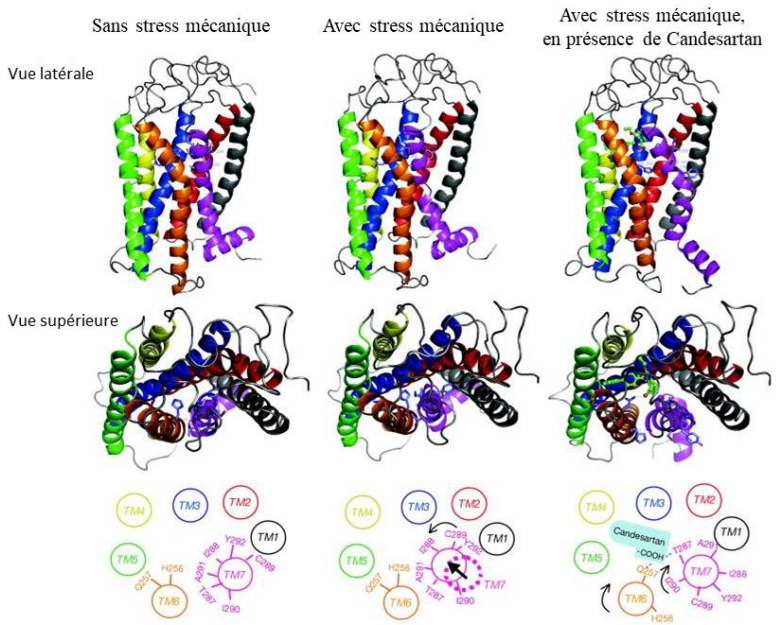


Figure 15 : Changements conformationnels du récepteur AT_1 induits par un stress mécanique (modifié d'après Yasuda *et al.* 2008). Les récepteurs ont été modélisés dans différents états : sans étirement et avec étirement en présence ou non de Candesartan. Le récepteur AT_1 adopte une conformation inactive sans étirement, stabilisée également par le Candesartan (agoniste inverse) ou une conformation active stabilisée par l'étirement mécanique. TM1 à TM7 : domaine transmembranaire 1 à 7.

b. Etats conformationnels du récepteur AT_2

Récemment, de nombreuses structures et conformation du récepteur AT_2 ont pu être élucidées par l'intermédiaire des techniques de diffraction X-ray et cristallisation des protéines (**Figure 16**) (Asada *et al.*, 2020; Miyagi *et al.*, 2020; H. Zhang *et al.*, 2017). Ces récentes découvertes révèlent plusieurs différences importantes entre AT_2 et les autres RCPG de classe A. L'orientation des DTMs du récepteur AT_2 est similaire à celle de récepteurs actifs mais aucune conformation inactive n'a été identifiée (H. Zhang *et al.*, 2017). De plus, l'hélice 8 du récepteur est positionnée vers l'intérieur du récepteur, vers la poche de liaison intracellulaire. Cette position stabilise le récepteur dans une conformation active et induit un encombrement stérique bloquant le recrutement de protéines G et de β-arrestines (H. Zhang *et al.*, 2017).

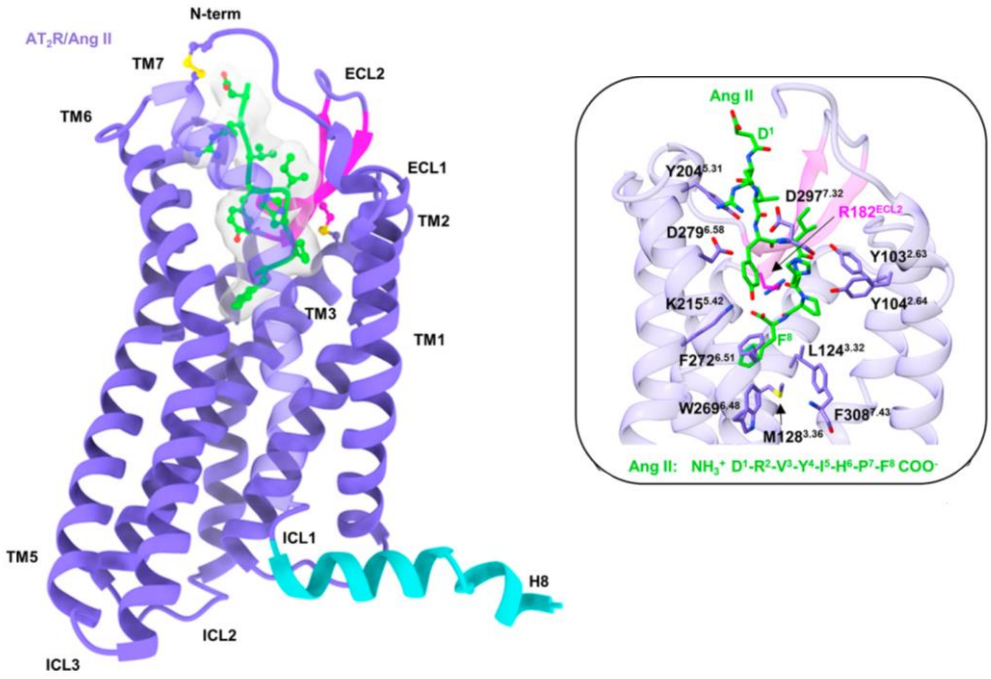


Figure 16 : Conformation active du récepteur AT_2 activé par l'Ang II (Modifié d'après Steckelings *et al.* 2022 (Steckelings *et al.*, 2022)). Cette conformation active illustre l'orientation des hélices et la poche de liaison peptidique (structure transparente autour de l'Ang II représentée en vert) (ECL : extracellular loops ; ICL : intracellular loops ; TM : transmembrane

Cependant, à ce jour, il reste beaucoup de zones d'ombre concernant le lien entre la structure du récepteur et la médiation de son signal après la liaison d'agonistes. En effet, l'étude d'Asada *et al.* montre que la structure cristalline d'AT_2 lié avec l'Ang II permet l'orientation canonique de l'hélice 8, permettant son interaction aux différents effecteurs protéiques (Asada *et al.*, 2020). De plus, la boucle intracellulaire 3 du récepteur AT_2 est dépourvue des motifs consensus requis pour la liaison à G_q alors que ce récepteur peut se lier à G_i (Mukoyama *et al.*, 1993). La protéine G_i peut se lier à la deuxième boucle intracellulaire de certains RCPG pouvant expliquer sa liaison à AT_2. La conformation atypique de ce récepteur peut expliquer sa signalisation singulière avec une voie de signalisation par les protéines G controversée et l'absence d'interaction avec les β-arrestines.

En plus d'une physiologie opposée aux récepteurs AT_1, les récepteurs AT_2 peuvent exercer une activité antagoniste en formant un complexe hétérodimérique avec AT_1 (AbdAlla *et al.*, 2001a), bien que la formation d'homodimères AT_2 soit privilégiée (Miura *et al.*, 2010). Cette hétérodimérisation, confirmée par des techniques plus récentes de transfert d'énergie par fluorescence ou bioluminescence (FRET/BRET) (Inuzuka *et al.*, 2016; Rivas-Santisteban *et al.*, 2020), empêcherait l'activation des protéines G_q et la signalisation qui en découle dont la production d'IP_3.

3. Homodimérisation et hétérodimérisation des récepteurs

La communication allostérique entre les différents récepteurs peut modifier la liaison du ligand, la conformation du récepteur et les interactions avec les différentes protéines effectrices.

Les récepteurs AT_1 et les récepteurs AT_2 peuvent s'homodimériser accentuant la signalisation de ces récepteurs en aval suivant le type cellulaire (Lyngsø *et al.*, 2009). Les homodimères AT_1/AT_1 retrouvés dans les plaquettes ou dans les cellules PC-12 sont décrits comme des dimères stables et indépendants du ligand, cependant, la conséquence fonctionnelle de ces dimères n'a pas été analysée (AbdAlla *et al.*, 2001a; AbdAlla *et al.*, 2001b). Une augmentation de la signalisation de l'inositol phosphate médiée par $G_{q/11}$ en réponse à la stimulation de l'Ang II a été observée sur des monocytes isolés de patients souffrant d'hypertension présentant des homodimères AT_1/AT_1 (AbdAlla *et al.*, 2004). Les homodimères AT_2/AT_2 pourraient être importants pour la signalisation AT_2 et peuvent permettre une signalisation pro-apoptotique indépendante du ligand (Miura *et al.*, 2005; Porrello *et al.*, 2011).

Ces récepteurs peuvent s'hétérodimériser entre eux. Les complexes AT_1/AT_2 ainsi formés dans les lignées cellulaires et les biopsies myométriales humaines conduisent à l'inhibition de la voie des protéines Gq et Gi médiée par AT_1, donc à l'inhibition de la réponse calcique et de l'activation des MAPK et de $ERK_{1/2}$ (AbdAlla *et al.*, 2001a). Le trafic intracellulaire est aussi impacté avec une internalisation du complexe AT_1/AT_2 après stimulation de cellules HeLa surexprimant les récepteurs par l'Ang II alors que les récepteurs AT_2 seuls ne s'internalisaient pas (Inuzuka *et al.*, 2016). Le récepteur AT_2 dans ce complexe agit comme un agoniste inverse du récepteur AT_1 en empêchant les changements conformationnels nécessaires à la signalisation des protéines G du récepteur AT_1.

Les récepteurs AT_1 et AT_2 sont également capables de s'hétérodimériser avec le récepteur Mas (Kostenis *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2017). Dans des cellules CHO-K1, les formes humaines des récepteurs AT_1 et MAS ont été transfectés et lors de la coexpression de ces deux récepteurs, la puissance et l'efficacité maximale de l'Ang II pour la mobilisation calcique ont diminué (Kostenis *et al.*, 2005). Concernant le récepteur AT_2, sa dimérisation avec le récepteur Mas entraine une production accrue de NO favorisant l'axe dépresseur du SRA (Patel *et al.*, 2017). De plus, plusieurs études décrivent que AT_2 et Mas peuvent être fonctionnellement interdépendants, leurs antagonistes respectifs impactant la signalisation de l'autre récepteur (Durand *et al.*, 2010; Roks *et al.*, 2004; Walters *et al.*, 2005) et l'invalidation génique de l'un des deux récepteurs supprimant la réponse physiologique de l'autre dans des cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs (Leonhardt *et al.*, 2017).

Les modifications fonctionnelles consécutives de la dimérisation des récepteurs et leur changement d'expression peuvent impacter la physiologie de ces derniers.

II. Les antagonistes du récepteur AT_1

De nombreuses études précliniques et cliniques ont investigué les effets des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine (ARA) dans ces différentes pathologies liées à AT_1.

Les ARA sont largement utilisés pour les traitements de troubles cardiovasculaires, les maladies rénales et les altérations du métabolisme comme le diabète. L'efficacité clinique des inhibiteurs du SRA dont les sartans, en tant qu'antihypertenseur n'est plus à prouver (Te Riet *et al.*, 2015). L'utilisation de ces inhibiteurs comme potentielles pistes thérapeutiques dans la prévention du remodelage vasculaire est également envisagée dans notre laboratoire (Dupuis *et al.*, 2010). Les inhibiteurs de l'ECA et les ARA ont aussi été étudiés en préventif et curatif potentiel dans les pathologies cérébrovasculaires. Les ARA ont une action agoniste inverse en stabilisant l'état inactif du récepteur AT_1.

En plus d'inhiber AT_1, certains ARA comme le telmisartan ou le losartan peuvent activer PPARγ protégeant directement le système vasculaire (An *et al.*, 2010) permettant d'améliorer le débit sanguin cérébral.

Les sartans ont de nombreux effets bénéfiques au niveau cérébrovasculaire chez les rats hypertendus en régulant le flux sanguin cérébral, en améliorant la perfusion sanguine et réduisant l'apoptose et la taille d'infarctus (Omura-Matsuoka *et al.*, 2009). Le remodelage vasculaire ainsi que les dommages neuronaux sont également réduits contribuant aussi à la protection cérébrale dans les maladies neurodégénératives. Les ARA protègent le flux sanguin cérébral et réduisent l'inflammation, l'hypoxie, les lésions de la barrière hémato-encéphalique et les pertes neurologiques et cognitives dans les modèles animaux d'ischémie cérébrale, de lésion traumatique et de maladie d'Alzheimer (Delaitre *et al.*, 2021; Saavedra, 2016). La revue que nous avons publiée (présentée en annexe) ainsi que celle de Wanderer *et al.* illustrent les études précliniques mettant en avant les effets bénéfiques des ARA dans le cadre d'AVC, d'anévrismes ou de lésions traumatiques cérébrales (Delaitre *et al.*, 2021; Wanderer *et al.*, 2020).

Cependant les études cliniques ne corroborent pas entièrement les données précliniques (**Tableau 1**). De nombreuses études cliniques mettent en évidence l'effet bénéfique du blocage à long terme du SRA sur la prévention des AVC avec une réduction du taux d'AVC de 32% et un risque relatif d'AVC mortel réduit de 61% (Bosch *et al.*, 2002; Hansson *et al.*, 1999). Les études utilisant des ARA montrent des résultats similaires à celles utilisant des inhibiteurs de l'ECA suggérant que l'effet bénéfique de ces derniers est principalement lié à la prévention de la stimulation du récepteur AT_1 (Lithell *et al.*, 2003; Schrader *et al.*, 2005). La prévention des AVC par les ARA est ainsi bien établie mais leur efficacité est remise en question dans les phases aiguës et post-aiguës. En effet, certaines études ne montrent aucun effet bénéfique des ARA par rapport au placebo (Sandset *et al.*, 2011; Yusuf, Diener, *et al.*, 2008). De plus, les ARA n'agissent ni sur les lésions cérébrales ni sur la réduction du volume de l'infarctus. De

nombreuses revues soulignent les limites de ces inhibiteurs en clinique (Gironacci *et al.*, 2018; Kalra *et al.*, 2015; Villapol & Saavedra, 2015).

Tableau 1 : Liste exhaustive des différentes études précliniques et cliniques montrant les effets de l'administration de Sartans dans le contexte d'un AVC

Etudes	Effets spécifiques aux ARA
Preuves précliniques	• Amélioration de l'autorégulation cérébrovasculaire : Nishimura *et al* (Nishimura *et al.*, 2000); Ito *et al* (Ito *et al.*, 2002) • Diminution de la taille de l'infarctus : Lou *et al* (Lou *et al.*, 2004); Fagan *et al* (Fagan *et al.*, 2006); Liu *et al* (H. Liu *et al.*, 2008); Krikov *et al* (Krikov *et al.*, 2008); Hosomi *et al* (Hosomi *et al.*, 2005); Mecca *et al* (Mecca *et al.*, 2009); Kim *et al* (C. K. Kim *et al.*, 2015); Ito *et al* (Ito *et al.*, 2002); Li *et al* (J.-M. Li *et al.*, 2008); Nishimura *et al* (Nishimura *et al.*, 2000); Engelhorn *et al* (Engelhorn *et al.*, 2004) • Diminution de l'œdème cérébral : Fagan *et al* (Fagan *et al.*, 2006); Hosomi *et al* (Hosomi *et al.*, 2005); Ito *et al* (Ito *et al.*, 2002); Nishimura *et al* (Nishimura *et al.*, 2000) • Effets anti-inflammatoires et anti-apoptotiques : Lou *et al* (Lou *et al.*, 2004); Kim *et al* (C. K. Kim *et al.*, 2015) • Effets anti-oxydant et pro-régénératifs : Liu *et al* (H. Liu *et al.*, 2008) • Neuroprotection : Chrysant *et al* (Chrysant, 2004, 2007)
Preuves cliniques	• Réduction du risque d'AVC : essai CAPPP (CAPtopril Prevention Project) (Hansson *et al.*, 1999), essai HOPE (Heart Outcome Prevention Evaluation) (Bosch *et al.*, 2002; Svensson *et al.*, 2001), étude PROGRESS (perindopril PROtection aGainst REcurreny Stroke Study) (PROGRESS Collaborative Group, 2001), étude LIFE (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension) (Dahlöf *et al.*, 2002; Kjeldsen *et al.*, 2005), essai SCOPE (Study on Cognition and Prognostic in the Elderly) (Lithell *et al.*, 2003), étude MOSES (Morbidity and Mortality After Stroke, Eposartan Compared with nitrendipine for secondary prevention) (Schrader *et al.*, 2005) • Diminution de la tension artérielle : étude ACCESS (Acute Candesartan Cilexetil therapy in Stroke Survivors) (Nakamura *et al.*, 2010; Schrader *et al.*, 2003) • Action antiplaquettaire : Serebruany *et al* (Serebruany *et al.*, 2004)

Controverse clinique	• Aucune différence avec le groupe placébo : étude SCAST (Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial) (Hornslien *et al.*, 2015; Jusufovic *et al.*, 2015, 2016; Sandset *et al.*, 2011; Yusuf *et al.*, 2008a; Yusuf *et al.*, 2008b), étude PRoFESS (Prevention Regimen for Effectively Avoiding Second Strokes) (Bath *et al.*, 2009; Diener *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2012), étude TRANSCEND (Telmisartan Randomized AssessmeNt Study in aCE-iNtolerant subjects with cardiovascular Disease) (Yusuf *et al.*, 2008a), étude ONTARGET (ONgoing Telmisartan Alone and in combination with Ramipril Global Endpoint Trial) (Fitchett, 2007; Jarvis, 2012), étude VENTURE (Valsartan Efficacy oN modesT blood pressure Reduction in acute ischemic stroke) (Oh *et al.*, 2015)

A ce jour les traitements et alternatives thérapeutiques sont rares pour l'ensemble de ces pathologies. L'absence de thérapeutique efficace justifie de nouveau l'intérêt du SRA et d'AT_1 comme cibles thérapeutiques. En effet, des avancées récentes montrent que l'activation d'AT_1 conduit non seulement à sa signalisation classique mais également à des voies de signalisation dépendantes de la β-arrestine qui pourraient avoir des effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires. Nous avons rapporté précédemment que le récepteur peut adopter différents états conformationnels (*cf.* Partie 2. I. 2 – p33), cela étant lié à une activation différentielle des voies de signalisation en aval. De plus, notre équipe a montré que la réponse fonctionnelle des récepteurs AT_1 et AT_2 peut se voir modifiée malgré l'absence de variation de leurs expressions géniques et protéiques (Foulquier *et al.*, 2011, 2012). L'équipe a donc émis l'hypothèse qu'une régulation post-traductionnelle des récepteurs pourrait expliquer ces variations fonctionnelles.

Moduler la signalisation du récepteur AT_1 par l'utilisation d'agonistes biaisés ou par des modifications post-traductionnelles semble être un potentiel thérapeutique dans des situations physiopathologiques où la circulation cérébrale est altérée.

III. L'agonisme biaisé

1. Définition

Certains ligands de RCPG dits biaisés pour une voie de signalisation par rapport à une autre peuvent en initier sélectivement une ou plusieurs lorsqu'ils sont couplés à leur récepteur. Ces agonistes stabiliseront préférentiellement l'une des conformations que le RCPG peut adopter, initiant ainsi une signalisation spécifique en aval. Ce nouveau concept, appelé « sélectivité fonctionnelle » ou « agonisme biaisé » (Galandrin *et al.*, 2007), a été proposé avant les années 2000 mais n'a été exploré que récemment (Roth & Chuang, 1987) . En simplifiant ce système, certains ligands biaisés pourront, par exemple, activer sélectivement la voie dépendante des protéines G sans activer la voie dépendante des β-arrestines et inversement (Violin & Lefkowitz, 2007).

Dans le cas du récepteur AT_1, le premier agoniste biaisé vers les β-arrestines à avoir été caractérisé est un analogue de l'Ang II, le SII (Holloway *et al.*, 2002). Par la suite, plusieurs agonistes biaisés à haute affinité pour le récepteur AT_1 ont été développés sur la base de la structure du SII (Wei *et al.*, 2003) et caractérisés pharmacologiquement dont les agonistes biaisés G_q TRV055 et TRV056 activant uniquement la voie des protéines G sans activer celle des β-arrestines et les agonistes biaisés β-arrestine TRV023 et TRV027 qui permettent l'activation des β-arrestines sans activation des protéines G (**Figure 17**).

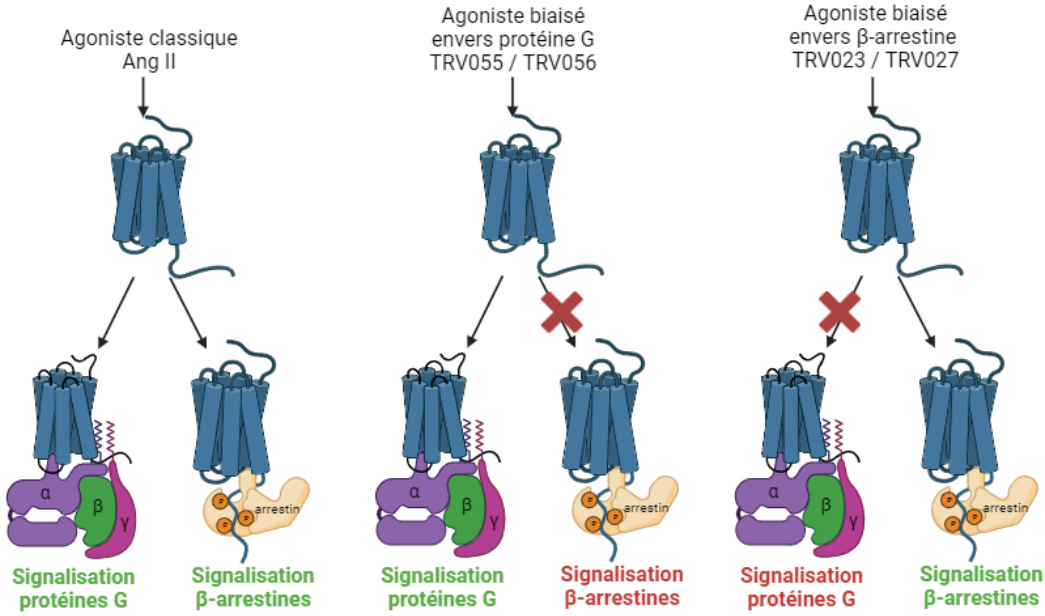


Figure 17 : Représentation schématique du concept d'agonisme biaisé du récepteur AT_1 (schéma réalisé *via* BioRender). Les récepteurs AT_1 activés par l'Ang II induisent la signalisation des protéines G et des β-arrestines. Lorsqu'ils sont activés par un agoniste biaisé envers les protéines G, les récepteurs AT_1 induisent uniquement la signalisation des protéines G et inversement pour les agonistes biaisés envers les β-arrestines avec une signalisation des β-arrestines exclusivement.

A la différence de nombreux RCPG, le récepteur AT_1 peut adopter une conformation activant exclusivement les β-arrestines qui a été démontrée récemment par l'équipe de Lefkowitz avec la caractérisation moléculaire et pharmacologique des agonistes biaisés combinée à des données structurales (Pfeiffer *et al.*, 2021; Wingler *et al.*, 2019a; Wingler *et al.*, 2020; Wingler *et al.*, 2019b).

En plus de la conformation du récepteur, le fond cellulaire et l'expression simultanée d'autres récepteurs peuvent conduire à des changements de phosphorylation à l'extrémité C-terminale des récepteurs AT_1 activés. Ce changement de phosphorylation peut induire la liaison de différentes conformations de β-arrestines, différentes voies d'internalisation et une signalisation en aval altérée. C'est la théorie des codes-barres de phosphorylation (Whalen *et al.*, 2011; X. E. Zhou *et al.*, 2017), différents patrons de phosphorylation induits par les GRK permettant de contrôler la spécificité d'activation des voies de signalisation en aval du récepteur dont le recrutement d'arrestines dépendant de la phosphorylation.

Le récepteur AT_1 est donc sujet à un agonisme biaisé vers la voie β-arrestine et de nombreux agonistes biaisés ont déjà vu le jour et suscités un intérêt thérapeutique contre les maladies cardiovasculaires. L'efficacité de cette approche repose sur l'utilisation d'un agoniste biaisé qui permet à la fois de bloquer la voie G_q du récepteur AT_1 (ce qui est l'objectif recherché avec les sartans) et d'activer les voies de signalisation dépendantes des β-arrestines ayant des effets protecteurs cités précédemment.

2. Utilisation des agonistes biaisés β-arrestine dans les pathologies cardiovasculaires

Après la phosphorylation des récepteurs AT_1, la β-arrestine 1 et la β-arrestine 2 peuvent être recrutées mais ces dernières ne stabiliseront pas le récepteur dans une même conformation (Sanni *et al.*, 2010), ainsi des différences fonctionnelles sont observées (Lymperopoulos *et al.*, 2019). Au niveau cardiaque, la β-arrestine 1 a des effets plutôt délétères avec une diminution de la fonction cardiaque et une augmentation de l'inflammation et de l'apoptose. Inversement la β-arrestine 2 a des effets protecteurs, anti-apoptotique, anti-inflammatoire et « pro-survie » en activant les signalisations Src, ERK1/2, AKT et PI_3K. Ces études ont été conduites sur différents types cellulaires dont les cellules HEK et les cardiomyocytes de rats H9c2, mais également sur des cœurs de souris souffrant d'insuffisance cardiaque après un infarctus du myocarde (DeWire *et al.*, 2007; McCrink *et al.*, 2017; Peterson & Luttrell, 2017). Il a été également rapporté que la β-arrestine 2 inhibe le processus inflammatoire des macrophages après un infarctus du myocarde (Watari *et al.*, 2013).

L'importance de la voie des β-arrestines par l'intermédiaire du récepteur AT_1 a été étudiée au niveau cardiovasculaire grâce à l'utilisation des différents ligands biaisés vers cette voie β-arrestines, principalement le TRV023 et le TRV027 (K.-S. Kim *et al.*, 2012; K. Rajagopal *et al.*, 2006). Le SII, avec une faible affinité pour le récepteur AT_1, exerçait déjà des effets cytoprotecteurs anti-apoptotiques dans les CMLV de rats (Ahn *et al.*, 2009).

A ce jour, seul le TRV027 a été testé dans des essais cliniques pour l'insuffisance cardiaque NCT01187836), les maladies rénales (NCT01444872) et l'infection au COVID-19 (NCT04419610 ; NCT04924660). Le TRV027 stimule le recrutement des β-arrestines avec l'activation de plusieurs voies de kinases comme Src, la voie des protéines kinases activée par le mitogène p42/44 ou encore AKT et eNOS. Ce ligand biaisé augmente la contractilité cardiaque *in vitro* et réduit la pression artérielle chez le rat. Il réduit également les résistances systémiques et augmente le débit cardiaque et le débit sanguin rénal dans le cas d'un modèle canin d'insuffisance cardiaque (Boerrigter *et al.*, 2011, 2012; Violin *et al.*, 2010), contrairement aux sartans qui diminuaient les performances cardiaques. Des tests de ce peptide chez l'homme ont également été réalisés, chez des sujets sains (Soergel *et al.*, 2013) et chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque aiguë avec une première étude BLAST-AHF (Biased Ligand of the Angiotensine receptor STudy in Acute Heart Failure) (Felker *et al.*, 2015), mais n'ont pas permis

de confirmer ces effets bénéfiques (Pang *et al.*, 2017). Même si les résultats de cette dernière étude ne semblent pas à la hauteur des attentes, toute cette littérature témoigne de l'intérêt de favoriser l'activation de cette voie de signalisation β-arrestine AT_1-dépendante dans les pathologies cardiovasculaires.

Des effets similaires ont été observés en utilisant le TRV023 *in vivo* chez des rats ou chez des modèles génétiques de souris mimant une cardiomyopathie ou n'exprimant plus la β-arrestine 2, avec une diminution de la pression artérielle et une augmentation de la contractilité cardiaque. Ce dernier ligand réduit également la mort cellulaire en activant les voies MAPK et AKT. Le TRV023 prévient aussi l'hypertrophie cardiaque induite par l'Ang II tout en préservant la contractilité. Comparé au Losartan, ce ligand biaisé préserve plus efficacement la contractilité cardiaque tout en ayant des effets cytoprotecteurs (K.-S. Kim *et al.*, 2012; Monasky *et al.*, 2013; Tarigopula *et al.*, 2015).

L'Ang (1-7), composant de l'axe protecteur ECA2/Ang (1-7)/Mas vu précédemment (*cf.* Partie 1. I. 2. B – p8), peut se lier au récepteur AT_1 et induire la voie des β-arrestines, favorisant la phosphorylation de $ERK_{1/2}$. Il est donc un ligand biaisé envers la β-arrestine du récepteur AT_1 qui a de nombreux effets cardioprotecteurs observés chez des modèles murins d'hypertrophie cardiaque, de cardiomyopathie ou d'infarctus du myocarde (Ferreira *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2007; Grobe *et al.*, 2007; Noor *et al.*, 2011; Ryba *et al.*, 2017).

3. Utilisation des agonistes biaisés β-arrestine dans les pathologies cérébrovasculaires

A ce jour, aucune étude ne s'est focalisée sur l'impact des agonistes biaisés envers les β-arrestines spécifiques des récepteurs AT_1 sur les maladies cérébrovasculaires. Pourtant l'axe protecteur du SRA, comprenant entre-autres le récepteur AT_2 et l'Ang (1-7), a de nombreux effets cérébroprotecteurs lors d'AVC ischémiques et hémorragiques, démontrés par des études précliniques (Kangussu *et al.*, 2020; Andone *et al.*, 2022) (**Tableaux 2 et 3**).

En effet, l'Ang (1-7) protège contre les lésions du système nerveux central et les déficits neurologiques induits par les AVC ischémiques expérimentaux (Mecca *et al.*, 2011). Par l'intermédiaire du récepteur Mas, ce peptide a des effets antioxydants et anti-inflammatoires en diminuant la libération de cytokines pro-inflammatoires. L'Ang (1-7) protège contre les dysfonctionnements cognitifs lors d'une hypoperfusion cérébrale chez les rats. Cet effet neuroprotecteur est associé à l'augmentation de la génération de NO, une diminution de la perte neuronale et la suppression de la prolifération d'astrocytes dans l'hippocampe. A l'inverse, un déficit en ECA2 conduit à une altération de la fonction cognitive, un stress oxydatif accru et une diminution du facteur neurotrophique dérivé du cerveau. Couplé à un sartan, l'Ang (1-7) améliore la structure et la fonction vasculaire en favorisant la biodisponibilité du NO et le remodelage vasculaire tout en diminuant la génération d'EROs (Savoia *et al.*, 2020). La capacité de ce peptide à se lier à AT_1, à AT_2, voire aux hétérodimères, pourrait contribuer à ces effets bénéfiques cérébrovasculaires.

Les β-arrestines 1 et 2 semblent également avoir des effets neuroprotecteurs. L'équipe de Wang a montré une augmentation de l'expression protéique de ces deux arrestines dans un modèle d'AVC ischémique chez la souris. De plus, la suppression de la β-arrestine 1, par KO dans des modèles murins d'ischémie cérébrale, aggrave les lésions cérébrales ischémiques en impactant la taille de l'infarctus, les déficits neuronaux et la mortalité. Ces effets sont corrélés avec la suppression de l'autophagie, de l'apoptose et de la nécrose neuronales induites *in vitro* et *in vivo* (P. Wang *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent donc que la β-arrestine 1 aurait des effets neuroprotecteurs liés à l'autophagie.

Le rôle de la β-arrestine 2 dans les troubles neurologiques n'est pas encore élucidé. Certaines études *in vitro* soutiennent un rôle délétère de cette arrestine notamment dans le dysfonctionnement des monocytes à médiation adrénergique induits par l'AVC (H. Wang *et al.*, 2018). Une autre étude, plus récente, suggère que la signalisation médiée par la β-arrestine 2 améliore la fonction endothéliale et l'intégrité de la barrière hématoencéphalique après un AVC chez la souris (Kanki *et al.*, 2019). En effet, la médiation de la signalisation de la β-arrestine 2 par le récepteur PAR-1 induit une activation de la MAPK 42/44, augmentant la sécrétion de PDGF-β, l'une des principales molécules cibles pour favoriser l'angiogenèse.

Tableau 2 : Liste exhaustive des différentes études précliniques et cliniques montrant les effets de l'administration d'agonistes AT_2 dans le contexte d'un AVC

Etudes	Effets spécifiques aux agonistes AT_2 (C21 et CGP42112)
Preuves précliniques	• Diminution de la taille de l'infarctus : Alhusban *et al* (Alhusban *et al.*, 2015); Mateos *et al* (Mateos *et al.*, 2016); Joseph *et al* (Joseph *et al.*, 2014); McCarthy *et al* (McCarthy *et al.*, 2009, 2012, 2014); Lee *et al* (Lee *et al.*, 2012); Min *et al* (Min *et al.*, 2014) • Améliore la fonction motrice : Lee *et al* (Lee *et al.*, 2012); McCarthy *et al* (McCarthy *et al.*, 2009, 2012, 2014) • Diminution de l'œdème cérébral : Min *et al* (Min *et al.*, 2014) • Vasodilatation : McCarthy *et al* (McCarthy *et al.*, 2014) • Effets anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et antioxydants : Joseph *et al* (Joseph *et al.*, 2014); McCarthy *et al* (McCarthy *et al.*, 2009, 2012, 2014); Lee *et al* (Lee *et al.*, 2012); Min *et al* (Min *et al.*, 2014) • Effets pro-angiogéniques : Alhusban *et al* (Alhusban *et al.*, 2015); Mateos *et al* (Mateos *et al.*, 2016)

Tableau 3 : Liste exhaustive des différentes études précliniques et cliniques montrant les effets de l'administration d'Ang (1-7) dans le contexte d'un AVC.

Etudes	Effets spécifiques à l'Ang (1-7)
Preuves précliniques	• Diminution de la taille de l'infarctus : Mecca *et al* (Mecca *et al.*, 2011); Jiang *et al* (Jiang *et al.*, 2012, 2014); Regenhardt *et al* (Regenhardt *et al.*, 2013); Bennion *et al* (Bennion *et al.*, 2018) • Améliore la fonction motrice : Zhang *et al* (Y. Zhang *et al.*, 2008); Mecca *et al* (Mecca *et al.*, 2011); Jiang *et al* (Jiang *et al.*, 2012, 2014) • Effets anti-inflammatoires et antioxydants : Jiang *et al* (Jiang *et al.*, 2012); Regenhardt *et al* (Regenhardt *et al.*, 2013) • Effets pro-angiogéniques : Jiang *et al* (Jiang *et al.*, 2014) • Neuroprotection : Regenhardt *et al* (Regenhardt *et al.*, 2014a; Regenhardt *et al.*, 2014b); Fouda *et al* (Fouda *et al.*, 2016); Sumners *et al* (Sumners *et al.*, 2013); Bennion *et al* (Bennion *et al.*, 2015); Tao *et al* (Tao *et al.*, 2018)
Preuves cliniques	• Diminution de l'activité d'ECA2 dans le sérum après un AVC (Bennion *et al.*, 2016)

Ainsi, les actions bénéfiques des ligands biaisés vers la voie des β-arrestines semblent prometteuses bien qu'elles ne soient pas encore complètement comprises. De plus, l'occupation des récepteurs AT_1 par l'agoniste biaisé pourrait favoriser la liaison de l'Ang II aux récepteurs AT_2 afin de rétablir l'équilibre fonctionnel sans bloquer complétement les récepteurs AT_1. Pour finir, ces ligands pourraient se lier aux récepteurs AT_2. En effet, même si cela n'est jamais discuté dans la littérature, lorsque le TRV027 a été caractérisé à l'origine il a été déterminé qu'il a une affinité comparable pour les deux récepteurs AT_1 et AT_2 (Violin *et al.*, 2010), donc sa liaison à AT_2 pourrait contribuer également à contrecarrer les effets néfastes des récepteurs AT_1. Les agonistes biaisés d'AT_1 pourraient potentiellement montrer une meilleure efficacité clinique que les sartans dans les pathologies vasculaires. Cependant, à ce jour, aucune étude approfondie ne peut appuyer cette hypothèse.

IV. Thérapeutique basée sur le monoxyde d'azote

1. Les composés donneurs de NO

Une diminution de la biodisponibilité de NO engendre des situations pathologiques critiques (Tsai & Kass, 2009). Lors d'un AVC, la synthèse et la disponibilité en NO sont fortement perturbées. En effet, dans la phase aiguë de l'AVC ischémique chez des rats adultes, la production de NO augmente fortement

dans les premières heures puis diminue rapidement et de façon prolongée pendant plusieurs semaines (Kader *et al.*, 1993; Malinski *et al.*, 1993). De ce fait, une diminution des mécanismes et signalisations dépendants du NO, comme la *S*-nitrosation ou l'induction de vasodilatation, pourrait être observée suite à un AVC. Il est donc primordial de réguler l'apport de NO pour contrer cette pathologie avec la mise en place d'un apport exogène par des molécules capables de libérer du NO, comme les donneurs de NO.

L'utilisation de S-nitrosothiols (RSNO) semble être une piste thérapeutique sérieuse, cependant il est nécessaire de contrôler finement cet apport exogène de NO car un apport trop important a également des effets délétères.

Différents donneurs de NO sont actuellement utilisés en thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires comme le nitroprussiate de sodium (SNP), les dérivés nitrés, le nicorandil et les sydnonimines. Le SNP, pouvant libérer spontanément le NO à pH physiologique, est utilisé dans le cas d'insuffisance cardiaque aiguë avec bas débit, en complément d'un traitement par diurétiques. En effet, l'administration intraveineuse de SNP chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque décompensée aiguë améliore les signes cliniques (Mullens *et al.*, 2008). Les dérivés nitrés et les sydnonimines sont utilisés dans le traitement de l'angor. Cependant ces donneurs de NO présentent des inconvénients majeurs avec leur faible demi-vie, l'induction de tolérance et une toxicité lors d'un usage au long cours.

Les RSNO peuvent libérer des thiols en plus du NO, ayant des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et n'induisant ni tolérance ni stress oxydant chez le rat (M. R. Miller *et al.*, 2000). Ils ont une demi-vie plus longue (Mathews & Kerr, 1993) et constituent un réservoir physiologique important de NO. Ils ont fait l'objet de nombreuses études précliniques (M. Khan *et al.*, 2006; Heikal *et al.*, 2009; Dahboul *et al.*, 2014; Parent *et al.*, 2015) et cliniques (Kaposzta *et al.*, 2001; Langford *et al.*, 1994; Seabra *et al.*, 2004). Encore aujourd'hui différentes approches sont envisagées pour optimiser la libération de NO (Gaucher et al 2013, Parent et al 2013a, Heikal et al 2016) afin d'augmenter l'apport de NO tout en diminuant la quantité de molécule utilisée.

2. *S*-nitrosation du récepteur AT_1

Le NO a un rôle dans la régulation de l'activité de nombreuses protéines mais également dans l'activité de nombreux récepteurs. En effet des modifications post-traductionnelles peuvent être réalisées, impactant la signalisation du récepteur AT_1.

Les RSNO formés après *S*-nitrosation peuvent à leur tour induire une trans-nitrosation, c'est-à-dire un transfert de NO vers une autre protéine cible et/ou libérer du NO, leur conférant donc des propriétés vasodilatatrices (Ferro *et al.*, 2004).

Des nombreux articles, dont des études de notre équipe, suggèrent que les fonctions de AT_1 pourraient être régulées par la *S*-nitrosation. En effet, suite à une exposition à un donneur de NO, une

diminution de l'affinité de l'Ang II pour le récepteur AT_1 a été observée dans un modèle cellulaire de cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_1 (Leclerc *et al.*, 2006). Par la suite, en induisant des mutations de cystéines en sérines au sein du récepteur AT_1, une perte de sensibilité au NO a été observée, suggérant que le récepteur est la cible directe du NO. La potentielle *S*-nitrosation du résidu cystéine en position 289 dans le 7ème DTM du récepteur, région importante pour l'interaction récepteur/ligand, serait responsable d'une légère perte d'affinité du récepteur AT_1 pour l'Ang II (Leclerc *et al.*, 2006).

Notre équipe a détecté le récepteur AT_1 nitrosé au niveau cellulaire après exposition de lysat de cellules HEK 293 surexprimant AT_1 à du *S*-nitrosoglutathion (GSNO) (Bouressam *et al.*, 2019), un S-nitrosothiol endogène ayant des effets protecteurs dans différents modèles d'ischémie cérébrale (M. Khan *et al.*, 2005, 2012). Le GSNO inhibe l'augmentation de la mobilisation calcique induite par l'Ang II dans ces cellules illustrant l'inhibition de la voie G_q (Pinheiro *et al.*, 2021) tandis qu'un prétraitement avec le SNP diminue la production d'inositol phosphate induit par l'Ang II (Leclerc *et al.*, 2006).

Les conséquences physiologiques de ce phénomène ont été explorées en étudiant l'effet du NO sur des artères cérébrales moyennes isolées et perfusées de rats normotendus (Bouressam *et al.*, 2019). Un prétraitement avec du GSNO a spécifiquement aboli la vasoconstriction induite par l'Ang II. D'autres vasoconstricteurs partageant la même voie de signalisation G_q comme la phényléphrine, ou ciblant les récepteurs couplés $G_{i/o}$ comme la sérotonine ont gardé leur effet vasoconstricteur après le prétraitement au GSNO. Une autre équipe, Pinheiro *et al*, a obtenu des résultats similaires avec des anneaux aortiques de rat en observant une diminution de la contraction vasculaire induite par l'Ang II après un prétraitement au GSNO ou au nitrite de sodium (Pinheiro *et al.*, 2021). Une diminution de la pression artérielle a également été notée après administration orale de nitrite ou de GSNO *in vivo*. Les auteurs ont identifié la PKC comme une des cibles de S-nitrosation et comme un des mécanismes sous-jacents de la diminution des réponses à l'Ang II.

Prises ensemble, ces études suggèrent que la *S*-nitrosation induite par le GSNO réduit les réponses physiologiques de l'Ang II en agissant directement sur le récepteur AT_1 et également sur d'autres protéines promouvant la vasoconstriction telles que la PKC.

Le NO pourrait également avoir d'autres effets sur le récepteur AT_1. En effet, le tonus myogénique dépendant de AT_1 et indépendant de l'Ang II diminue dans les artères cérébrales moyennes suite à un prétraitement au GSNO suggérant une altération directement sur le récepteur AT_1 (Bouressam *et al.*, 2019).

De plus, des études préliminaires suggèrent que la *S*-nitrosation du récepteur n'impacterait pas la voie de signalisation des β-arrestines, le prétraitement de cellules HEK 293 avec du GSNO n'altérant pas la cinétique et l'amplitude de l'internalisation du récepteur AT_1 activé (Bouressam *et al.*, 2019).

D'autres études mettent en avant un lien étroit entre la S-nitrosation et les β-arrestines. En effet, la β-arrestine 2 peut être nitrosée au niveau d'une seule cystéine, la C410, par l'enzyme eNOS et cette *S*-nitrosation est promue par le GSNO endogène (Ozawa *et al.*, 2008). La *S*-nitrosation de la β-arrestine 2 améliore l'interaction de cette dernière avec la clathrine et la β-adaptine du complexe AP-2, augmentant l'internalisation du RCPG β2-AR. Cependant aucune étude sur l'effet de la *S*-nitrosation sur la signalisation dépendante de la β-arrestine n'est connue à l'heure actuelle.

V. Les ligands fluorescents comme traceurs des RCPG

Les RCPG sont présents dans tous les tissus mais différemment selon les types cellulaires et généralement à de faibles niveaux d'expression en condition physiologique. Leur expression peut se voir modulée en condition physiopathologique (Sriram & Insel, 2018). Pour étudier leur distribution tissulaire, leur expression cellulaire et la pharmacologie de ces RCPG, de nombreux outils ont été développés (**Figure 18**).

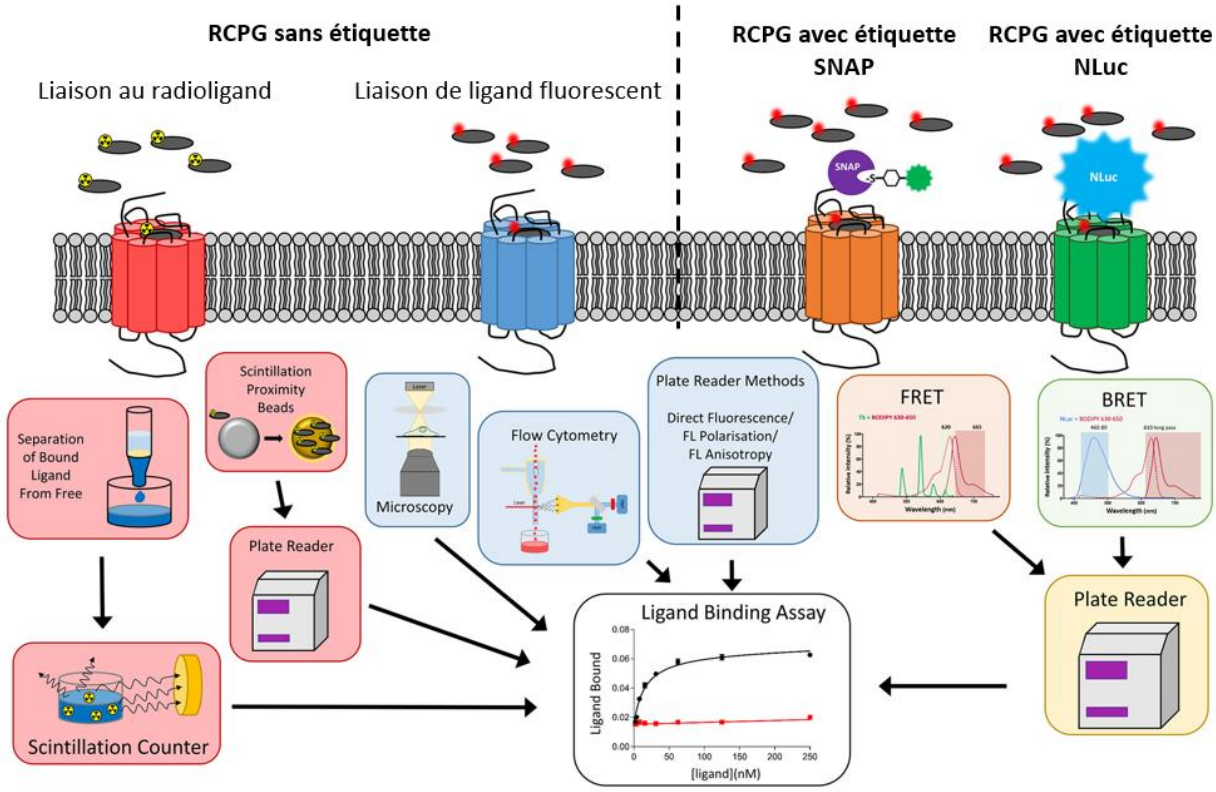


Figure 18 : Mesure de la liaison des ligands à l'aide d'approches basées sur la radioactivité ou la fluorescence adapté de Soave et al (Soave *et al.*, 2019)). Utilisant des récepteurs non marqués, les tests de liaison par radioligands reposent sur la séparation du ligand lié par rapport au ligand libre ou sur des technologies de scintillation de proximité, suivi d'une détection du ligand lié par un compteur à scintillation. La liaison de ligands fluorescents aux récepteurs non marqués peut être suivie par microscopie à l'aide de lecteurs de plaques pour détecter la fluorescence ou par cytométrie en flux. En parallèle, la liaison de ligands fluorescents à des récepteurs marqués d'une étiquette SNAP ou d'une Nanoluciférase peut être détectée par des approches RET. BRET : bioluminescence resonance energy transfer ; FRET : fluorescence resonance energy transfer ; Nluc : nanoluciférase

Les anticorps, qui présentent généralement une grande affinité pour leur cible, peuvent être utilisés dans de nombreuses techniques comprenant l'immunohistochimie, l'immunotransfert ou l'ELISA. Cependant, les RCPG n'ont pas de peptide très immunogène dans les techniques classiques de génération d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux et peu d'anticorps classiques ciblent de manière spécifique ces RCPG. Leur utilisation pour détecter les RCPG exprimés de manière endogène est donc limitée, notamment à cause de leur faible expression à la surface des cellules (Hutchings *et al.*, 2010). Etudier directement les RCPG est complexe donc l'utilisation de ligands de ces récepteurs marqués radioactivement ou par fluorescence a été développée.

Les ligands radiomarqués (radioligands) ont été traditionnellement utilisés notamment dans des tests de liaison pour déterminer les localisations tissulaires, les affinités et les cinétiques de liaison des ligands sur leur RCPG, pour caractériser de nouveaux ligands synthétiques sur des membranes de tissus puis sur des systèmes de surexpression hétérologue de RCPG en culture cellulaire (Sykes *et al.*, 2019). Cependant les techniques d'analyse par radioliaison tendent à être remplacées pour limiter l'usage de la radioactivité dans les laboratoires.

Les tests sur radioligand s'appuient sur des technologies telles que la séparation entre le ligand lié et le ligand libre ou, plus récemment, la scintillation de proximité, suivi d'une détection à l'aide de compteurs à scintillation. Les ligands fluorescents offrent une plus grande flexibilité en termes d'approches possibles. La liaison aux récepteurs non marqués peut être suivie par microscopie, par cytométrie en flux ou par lecture de plaques pour détecter la fluorescence. De plus, il est possible de détecter la liaison de ligands fluorescents à des récepteurs marqués par une étiquette peptidique SNAP ou par un donneur d'énergie pour le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET avec en exemple la GFP) ou de bioluminescence (BRET avec en exemple les nanoluciférases) (*cf.* Partie 2. V. 3 – p51) (Vollmer *et al.*, 1999; Palanche *et al.*, 2001; Lecat *et al.*, 2002). Ces méthodes reposent souvent sur l'utilisation de lecteurs de plaques pour détecter la liaison des ligands, ce qui ouvre la voie à une augmentation potentielle du rythme expérimental et à la miniaturisation des procédures.

1. Les ligands fluorescents

Comme les RCPG peuvent se lier à de petites molécules ou peptides, une méthode alternative pour détecter les récepteurs endogènes se base sur l'utilisation de ligands de RCPG marqués par fluorescence. Ces ligands fluorescents sont composés d'un agoniste ou d'un antagoniste du récepteur d'intérêt qui est chimiquement lié à un fluorophore. Le développement de technologies de microscopie sensible et l'amélioration conceptuelle de ces ligands fluorescents ont permis d'étudier spécifiquement les RCPG endogènes, notamment dans les études de cytométrie en flux (Stoddart *et al.*, 2018; Comeo *et al.*, 2020). De plus, de nombreux ligands fluorescents sont disponibles dans le commerce. En conséquence, leur utilisation a considérablement augmenté.

Les méthodes utilisant des ligands fluorescents pour déterminer l'affinité d'un composé pour son récepteur d'intérêt se divisent en deux catégories : la mesure directe de la fluorescence ou la mesure indirecte utilisant le transfert d'énergie de résonance (Stoddart *et al.*, 2016).

2. Propriété de fluorescence des fluorophores pour l'étude des RCPG

Le choix du fluorophore va dépendre de la technique utilisée mais certaines propriétés générales sont recherchées. Le fluorophore doit avoir un coefficient d'extinction molaire le plus élevé possible, c'est-à-dire une bonne capacité à absorber l'énergie à une longueur d'onde. De plus, le fluorophore doit pouvoir réémettre cette énergie absorbée sous forme de lumière, donc avoir un rendement quantique élevé. Ces deux caractéristiques déterminent la brillance du fluorophore qui doit être élevée afin de le détecter à de faibles concentrations au niveau moléculaire, cellulaire, tissulaire, voire *in vivo*.

Le fluorophore doit également avoir une photostabilité élevée, pour éviter son photoblanchiment, et une durée de vie de fluorescence élevée. Pour finir, le déplacement de Stokes du fluorophore, distance séparant la longueur d'onde d'absorption (ou d'excitation) maximale et la longueur d'onde d'émission maximale, doit être le plus grand possible pour limiter la contamination du signal d'émission due à la source d'excitation.

Afin de former un bon couple de fluorophores donneur / accepteur dans des expériences de transfert d'énergie de résonance, développés dans le prochain paragraphe, il est nécessaire que le donneur et l'accepteur d'énergie aient une bonne compatibilité énergétique et une bonne sélectivité spectrale. En effet, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir au moins partiellement celui de l'accepteur afin d'effectuer le transfert d'énergie. De plus, afin d'éviter que l'accepteur soit directement excité par la source lumineuse d'excitation du donneur il faut que leur spectre d'absorption soit suffisamment séparé. Pour finir, l'accepteur doit émettre à des longueurs d'ondes où le donneur n'émet pas ou peu afin de limiter les biais dans les mesures de fluorescence.

3. Les méthodes de mesure d'interaction récepteur/ligand fluorescent

a. Mesure directe

La liaison des ligands fluorescents aux RCPG peut être étudiée en utilisant l'anisotropie de fluorescence, aussi appelée polarisation de fluorescence. Il s'agit de la mesure de la capacité de la molécule fluorescente à maintenir la polarisation de la lumière. Si le ligand est lié au récepteur et se trouve en position fixe, la polarisation de la lumière sera maintenue alors qu'en solution libre la lumière polarisée du ligand aura des angles différents.

Cette différence de polarisation peut être utilisée pour différencier le ligand lié du ligand libre et ainsi mesurer les paramètres cinétiques de liaison du ligand et faire des tests de compétition avec le ligand fluorescent comme traceur et un ligand non fluorescent augmentant en quantité. Cependant,

l'inconvénient majeur potentiel de cette technique, en plus de l'autofluorescence cellulaire et de la sensibilité de la technique, est la possibilité d'épuisement du ligand fluorescent dans les tests de liaison par compétition. De plus, le ratio signal/bruit pour ces tests est relativement faible et limite son utilisation à de faibles concentrations de ligands.

L'imagerie directe d'un ligand fluorescent est généralement réalisée grâce à l'utilisation de la microscopie confocale qui est un outil puissant pour effectuer des tests de compétition et de liaison cinétique (Stoddart *et al.*, 2016). De plus, la cytométrie en flux, qui mesure l'intensité moyenne de fluorescence de chaque cellule, peut être utilisée pour les études de liaison du ligand. Cette dernière technique utilise un faible nombre de cellules et donc de récepteurs permettant de pallier la possibilité d'épuisement du ligand. Cependant des concentrations élevées de ligands marqués sont nécessaires pour étudier une faible liaison et avoir une quantité de ligands marqués liés au récepteur dont l'intensité de fluorescence est supérieure à celle du bruit de fond pour aboutir à un signal détectable, limitant grandement son utilisation pour une mesure complète de l'affinité du ligand pour son RCPG.

b. Mesure de transfert d'énergie de résonance

Les approches de transfert d'énergie par résonance (RET, resonance energy transfer) se font entre un fluorophore donneur vers un fluorophore accepteur, entrainant la diminution de l'émission du donneur et l'apparition de l'émission de fluorescence depuis l'accepteur (**Figure 19**).

Le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) n'est possible que lorsqu'il y a une proximité entre les deux composés donneur / accepteur inférieure à 100 Angstrom (Å). Contrairement aux méthodes précédentes utilisées dans les tests de liaison du ligand, la liaison non spécifique du ligand à la membrane plasmique ne génère pas un signal suffisant en raison de l'absence de donneur. Ces tests nécessitent le marquage du récepteur avec un fluorophore donneur ou accepteur, généralement par la fusion d'une protéine fluorescente à l'extrémité N-terminale du récepteur.

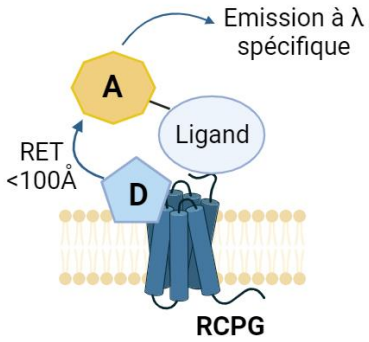


Figure 19 : Représentation schématique du transfert d'énergie par résonance (schéma réalisé *via* BioRender). Le transfert d'énergie (RET) se fait entre un donneur (D) d'énergie et un accepteur (A) d'énergie lorsque ce dernier se trouve à une distance inférieure à 100Å du donneur. Le donneur peut être un fluorophore (FRET) ou une enzyme luciférase (BRET) couplé au récepteur (RCPG).

L'inconvénient majeur de cette technique, dû à de larges plages d'excitation et d'émission, est le faible rapport signal/bruit que peuvent avoir les protéines fluorescentes d'où la nécessité de bien choisir les fluorophores en amont. Pour pallier ces problèmes, des tests FRET résolus dans le temps Time-resolved FRET (TR-FRET) ont été développés, utilisant comme donneurs des fluorophores lanthanidiques qui ont une émission de fluorescence longue, des déplacement pseudo-Stokes et plusieurs longueurs d'ondes d'émission. Ainsi, le rapport signal/bruit est amélioré grâce à une bonne séparation entre les spectres donneur et accepteur permettant de s'affranchir de la fluorescence de fond de courte durée due à l'excitation.

La même méthode peut être utilisée avec une enzyme luciférase agissant comme donneur en oxydant son substrat, il s'agit du transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) (Pfleger & Eidne, 2006). Comme pour la méthode précédente, les propriétés des fluorophores sont importantes.

La NanoLuc est plus petite que d'autres luciférases avec 19kDa (England *et al.*, 2016) et a une haute intensité de luminescence avec un pic d'émission à 460nm et peut être utilisée avec des fluorophores rouges en accepteur (Stoddart *et al.*, 2015). De plus, elle peut être greffée à l'extrémité C-terminale comme à l'extrémité N-terminale des RCPG et fonctionne bien dans le milieu extracellulaire oxydé et non réducteur, contrairement à une autre luciférase qui ne fonctionne qu'en intracellulaire, la Rluc8. Le BRET permet d'étudier la liaison des ligands aux récepteurs dans les cellules vivantes, dont les récepteurs AT_1 (Stoddart *et al.*, 2015). Le BRET permet également d'étudier les effets de l'oligomérisation des RCPG sur la pharmacologie des récepteurs et la transduction du signal (El Khamlichi *et al.*, 2019). L'utilisation de tests basés sur le BRET pour démontrer l'homo ou l'hétéro-dimérisation des RCPG s'est bien développée et est répertoriée dans une base de données (Khelashvili *et al.*, 2010).

L'amélioration de la sélectivité des ligands fluorescents permettra le marquage et le suivi des récepteurs endogènes d'intérêt dans les cellules primaires. Avec l'amélioration des caractéristiques physico-chimiques des ligands fluorescents, notamment une meilleure hydrophilie et une émission de fluorescence accrue, d'autres études apparaissent, comme l'oligomérisation des RCPG mais aussi leur répartition dans leur environnement d'origine et de leur dynamique de diffusion (Lukeš *et al.*, 2017; Planes *et al.*, 2020; Duran-Corbera *et al.*, 2022; Brinkenfeldt *et al.*, 2023). Ces méthodes commencent à être étendues à des applications *in vivo* (Jones-Tabah *et al.*, 2017; Soave *et al.*, 2021).

Hypothèse et objectif de la thèse

I. Hypothèse et objectif

L'activation du récepteur AT_1 joue un rôle important dans la physiopathologie de l'AVC ischémique notamment par une vasoconstriction accrue qui réduit la perfusion sanguine dans la zone de pénombre. De plus, la diminution de la teneur en NO au niveau cérébral qui en résulte réduit la probabilité de *S*-nitrosation du récepteur AT_1. Or, cette nitrosation pourrait être bénéfique dans le cas d'un AVC en ayant le même impact que l'utilisation d'agonistes biaisés. En effet, la littérature suggère que la *S*-nitrosation abolit la vasoconstriction AT_1-dépendante. Ceci pourrait être dû à une perturbation de l'équilibre dynamique entre les différents états conformationnels du récepteur AT_1 plutôt que par une baisse d'affinité pour l'Ang II. Ce mécanisme perturberait l'interaction entre le récepteur AT_1 et son effecteur $G_{q/11}$ et semble jouer un rôle important dans le contrôle de la réactivité vasculaire.

Notre hypothèse est qu'en nitrosant la C289 du 7ème DTM du récepteur AT_1, celui-ci adopterait la conformation active alternative. Ainsi lors d'une stimulation par l'Ang II, le récepteur AT_1 activerait uniquement la voie des β-arrestines potentiellement bénéfique et inhiberait la voie des protéines G délétère. Les résultats préliminaires de Bouressam sur les cellules HEK 293 cités précédemment étayent cette hypothèse (Bouressam *et al.*, 2019).

Sur la base de la littérature et de l'ensemble des données exposées, l'objectif à long terme de ce projet de thèse est de valider la *S*-nitrosation du récepteur AT_1 comme une cible thérapeutique d'intérêt pour réguler la circulation cérébrale. L'identification et la compréhension des mécanismes moléculaires consécutifs à la *S*-nitrosation, ainsi que l'étude de son impact physiopathologique et ses conséquences fonctionnelles, pourraient permettre l'émergence de nouvelles opportunités thérapeutiques dans les situations où la circulation cérébrale est altérée.

II. Problématique : outils d'étude inadaptés

En pratique, déterminer le biais d'un agoniste ou l'impact de la *S*-nitrosation sur la signalisation du récepteur AT_1 en aval nécessite de nombreux outils. Pour mettre en évidence l'activation de la protéine G, de nombreux tests fonctionnels *in vitro* sont établis avec une sensibilité et une spécificité élevées, notamment pour le récepteur AT_1. Cependant, il existe beaucoup moins de méthodes robustes pour évaluer l'activation et l'efficacité de la voie des β-arrestines sur AT_1. La désensibilisation et l'internalisation des récepteurs pouvant se produire indépendamment des β-arrestines et l'activation de la voie $ERK_{1/2}$ n'étant pas spécifiques de la voie des β-arrestines, de nombreux contrôles sont nécessaires pour s'assurer de la fiabilité des résultats.

Les mesures pharmacologiques pour caractériser la capacité d'un ligand à induire la voie des β-arrestines ont été utilisées par les compagnies pharmaceutiques. Tous les tests sont basés sur l'expression

hétérologue en cellule modèle des différents partenaires sous forme de protéine de fusion permettant par exemple de détecter les interactions AT_1/β-arrestine avec des méthodes de transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur, comme les tests de FRET ou BRET (Bertrand *et al.*, 2002; Vilardaga *et al.*, 2003). Cependant, ces techniques sont limitées au niveau cellulaire.

Dans les tissus, un suivi des récepteurs AT_1 endogènes avec des traceurs fluorescents permettrait d'étudier leur localisation après un prétraitement nitrosant et leur activation. Ainsi, il serait possible d'étudier l'impact de la *S*-nitrosation sur l'internalisation des récepteurs au niveau tissulaire et l'activation de la voie des β-arrestines, en utilisant en contrôle des inhibiteurs des β-arrestines comme la barbadine (Beautrait *et al.*, 2017) permettant d'affirmer le rôle des β-arrestines dans l'internalisation étudiée. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe aucun traceur sélectif du récepteur AT_1 par rapport à AT_2. En effet, plusieurs équipes de recherche, dont la nôtre, ont montré que les anticorps anti-AT_1 sur le marché n'ont pas montré de spécificité adéquate vis-à-vis du récepteur (Benicky *et al.*, 2012; Bouressam *et al.*, 2018). Une sonde fluorescente d'Ang II couplée à la fluorescéine est également disponible sur le marché pour marquer les récepteurs AT_1. Cependant la fluorescence de cette sonde se superpose à l'autofluorescence des tissus, dont les artères, due au collagène et à l'élastine présents dans la paroi artérielle. Durant ma thèse, un autre traceur fluorescent, le ligand TAMRA-Ang II, a été mis sur le marché mais n'a pas encore été caractérisé pharmacologiquement et sa sélectivité vis-à-vis de AT_2 et sa sélectivité vis-à-vis des différents états conformationnels actifs de AT_1 ne sont pas déterminées.

De par l'absence de traceur spécifique permettant de monitorer les récepteurs AT_1, il nous est apparu nécessaire de développer de nouveaux outils fluorescents pour suivre ce récepteur dans les tissus.

III. Stratégie d'étude

Sur la base de ces réflexions, et afin d'atteindre l'objectif de suivi des récepteurs endogènes *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, de nouvelles sondes fluorescentes ont été dessinées et synthétisées. En collaboration avec le Dr. Samir Acherar du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM – UMR 7375 CNRS, Université de Lorraine) et le Dr. Michel BOISBRUN du Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (L2CM – UMR 7053 CNRS, Université de Lorraine), de nouveaux ligands pour AT_1 et AT_2 ont été synthétisés. Il s'agit de dérivés de l'agoniste Ang II, de l'agoniste biaisé β-arrestines TRV027 et de l'antagoniste Losartan sélectif de AT_1, couplés à un fluorophore, la Cyanine 3 présentant un spectre de fluorescence éloignée de l'autofluorescence tissulaire.

Dans un deuxième temps, un espaceur entre le fluorophore et les peptides a également été utilisé pour prévenir/réduire un éventuel encombrement stérique dû à l'ajout de la Cyanine 3 (**Figure 20**). Pour finir, un peptide blanc a également été synthétisé sur le même principe que les autres peptides. Il s'agit d'un peptide ayant les mêmes acides aminés que l'Ang II mais dans un ordre aléatoire afin de servir de contrôle négatif.

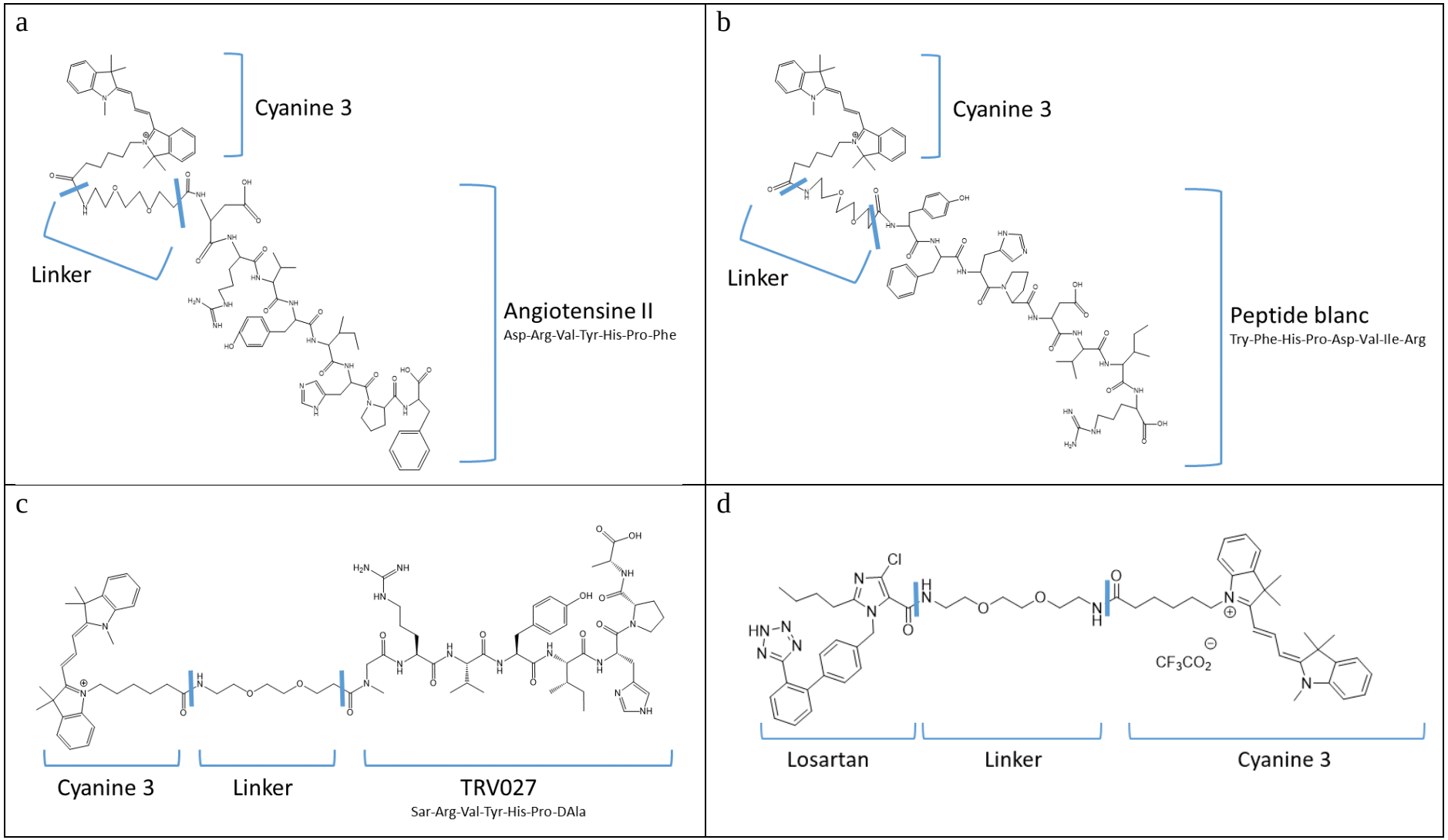


Figure 20 : Structure des sondes fluorescentes synthétisées couplées à la Cyanine 3 : (a) l'agoniste Ang II, (b) le peptide blanc servant de contrôle négatif, (c) l'agoniste biaisé envers les β-arrestines TRV027 et (d) l'antagoniste Losartan. Les traits bleus encadrent le linker, qui est ajouté ou non entre le peptide et la Cyanine 3 dans les différentes sondes fluorescentes.

Dans ce contexte, l'objectif premier de ce projet, et des travaux présentés, a donc été de caractériser pharmacologiquement ces nouveaux ligands traceurs fluorescents *in vitro* à l'aide de lignées cellulaires surexprimant le récepteur AT_1 ou AT_2 et *ex vivo* sur le modèle tissulaire d'artère cérébrale moyenne (ACM) isolée de rats.

Dans un premier temps nous discuterons de l'optimisation des différentes techniques nous permettant par la suite de caractériser ces nouveaux traceurs. En effet, de nombreux tests *in vitro* ont nécessité des mises au point ainsi que le clonage d'ADN et la génération de lignées cellulaires stables (détaillés dans les travaux expérimentaux).

Ensuite, la caractérisation pharmacologique et la sélectivité des ligands fluorescents au niveau cellulaire, comprenant des techniques variées, seront détaillées et discutées. Puis, les résultats de ces ligands caractérisés au niveau tissulaire, *ex vivo*, sur des artères cérébrales moyennes de rat isolées, seront analysés.

Enfin, dans la dernière partie, les résultats préliminaires obtenus illustrant l'impact de la *S*-nitrosation au niveau cellulaire et tissulaire seront introduits.

Travaux expérimentaux

Partie 1

Caractérisation pharmacologique de nouveaux ligands fluorescents traceurs des récepteurs de l'angiotensine

Objectifs

L'objectif à long terme de ce projet de thèse est d'étudier l'impact de la *S*-nitrosation par un donneur de NO sur le récepteur AT_1 et d'explorer la voie potentiellement bénéfique de la β-arrestine qui peut être mesurée par le suivi de l'internalisation du récepteur AT_1 consécutive à son activation.

Le manque d'outils sélectifs pour tracer le récepteur AT_1 endogène a été discuté précédemment et rend obligatoire la synthèse et la caractérisation de nouveaux traceurs fluorescents.

En collaboration avec deux laboratoires, le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire LCPM avec le Dr Samir ACHERAR et le Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (L2CM) avec le Dr Michel BOISBRUN, un premier lot de ligands ciblant AT_1 rendus fluorescents et leur homologue non fluorescent a été dessiné et synthétisé. Le fluorophore Cyanine 3 (+/- l'ajout d'un linker) a été greffé sur un peptide agoniste d'AT_1 (Ang II), un peptide blanc, un peptide agoniste biaisé vers la voie β-arrestine d'AT_1 (TVR027) et un antagoniste d'AT_1 (Losartan).

Il est nécessaire de caractériser pharmacologiquement ces nouvelles sondes fluorescentes car l'ajout du fluorophore sur les peptides fait qu'il s'agit de nouveaux ligands. Il faut donc déterminer si la modification chimique des ligands d'origine par l'ajout de ce fluorophore impacte leurs propriétés pharmacologiques et, si oui, en quel sens. Ces ligands fluorescents seront également comparés à un agoniste fluorescent (TAMRA-Ang II) commercialisé durant le déroulement de ma thèse et qui n'est pas caractérisé au niveau pharmacologique.

Ainsi l'objectif de la première partie de ces travaux expérimentaux est de déterminer l'affinité et la sélectivité des ligands fluorescents, synthétisés ou commerciaux, pour les récepteurs AT_1 et les récepteurs AT_2 de l'Ang II. Les tests fonctionnels qui seront réalisés sur les récepteurs AT_1 permettront de déterminer l'état de conformation du récepteur que les ligands pourront lier.

L'affinité d'un ligand pour son récepteur est la force d'interaction entre le ligand et son récepteur. La sélectivité d'un ligand correspond à la capacité d'un ligand à faire la distinction entre des récepteurs apparentés, montrant une affinité plus élevée pour l'un par rapport à d'autres. Ainsi nous pourrons observer des ligands sélectifs pours les récepteurs AT_1 par rapport aux récepteurs AT_2, et inversement. La sélectivité des nouveaux ligands fluorescents synthétisés a été testée par l'intermédiaire de la technique de cytométrie en flux.

La spécificité des ligands fait référence à leur capacité à identifier et se lier à un récepteur d'intérêt avec une affinité appropriée et avoir une réactivité croisée faible ou nulle avec d'autres récepteurs (Salomone & Waeber, 2011). Même si nous pourrions supposer que ces ligands fluorescents conservent la même spécificité que les peptides natifs envers leurs récepteurs cibles, la spécificité des ligands

fluorescents synthétisés pour les récepteurs de l'Ang II n'a pas été établie de manière précise ici car l'étude sur des récepteurs différents de ceux de l'Ang II n'a pas été menée. Par la suite nous parlerons de spécificité de liaison des ligands fluorescents lorsque ceux-ci se lieront aux récepteurs de l'Ang II en opposition à la liaison non spécifique de ces mêmes ligands déterminée soit par liaison des ligands fluorescents aux récepteurs endogènes des cellules contrôles négatifs (en cytométrie en flux, c*f.* protocole p70 et résultats p83) soit par la quantité de liaison chassée par un ligand non fluorescent en excès (en microscopie confocale, c*f.* protocole p71 et résultats p100).

Afin d'étudier l'affinité et la sélectivité des ligands fluorescents, plusieurs tests cellulaires *in vitro* ont été établis, dans lesquels le récepteur AT_1 est exprimé de manière hétérologue en tant que protéine de fusion, soit avec la protéine fluorescente GFP soit avec une luciférase, la nanoluciférase Nluc. La sélectivité des différents ligands a été mesurée à l'aide d'une analyse originale de trieur de cellules activées par fluorescence (FACS), la cytométrie en flux. L'activation de la voie AT_1/G_q a été déterminée par la mesure de la libération de calcium intracellulaire et le recrutement de G_q au récepteur par BRET. Le recrutement des β-arrestines a été mesuré par BRET et l'internalisation de AT_1 a été évaluée en microscopie par épifluorescence. Pour tester leur sélectivité, nous avons comparé les propriétés des ligands sur le deuxième récepteur de l'Ang II, AT_2.

Les ligands fluorescents ont également été caractérisés *ex vivo* sur des artères cérébrales moyennes de rat isolées. Ces dernières ont été exposées aux différents ligands afin de déterminer leur effet vasoactif.

De nombreuses optimisations de protocoles ont été nécessaires afin d'étudier au mieux les différents comportements des ligands fluorescents. En effet, il s'agit de nouveaux outils pharmacologiques et les conditions expérimentales ont dû être adaptées. Ces optimisations seront synthétisées dans un tableau récapitulatif avant la description des résultats de la caractérisation des ligands fluorescents proprement dite.

Ces travaux ont été réunis dans un article qui est soumis au Journal of Medicinal Chemistry intitulé « Synthesis and pharmacological characterization of fluorescent ligands targeting the angiotensin II receptors derived from agonist, β-arrestin biased agonist and antagonist ». Cet article est ajouté en annexe à ce manuscrit.

Matériels et méthode

I. Matériels

Sondes fluorescentes

Les fluorophores choisis pour le greffage aux différents ligands doivent respecter plusieurs critères : avoir un spectre dans le rouge pour sortir de l'autofluorescence des tissus, être brillants, être capables de faire du transfert d'énergie avec la GFP, voire avec la Nluc, et avoir de bonnes propriétés de fluorescence (**Tableau 4**). Ainsi la Cyanine 3 (Chemforase, Mont Saint-Aignan, France) a été couplée aux différents ligands. La TAMRA (Tetramethylrhodamine), retrouvée dans la sonde fluorescente commerciale, a un spectre d'émission proche de la Cy3 (**Figure 21 A**), des propriétés de fluorescence similaires à la Cyanine 3 (**Tableau 4**) et a été greffée sur l'Ang II de la même manière que la Cyanine 3 (**Figure 21 B et C**).

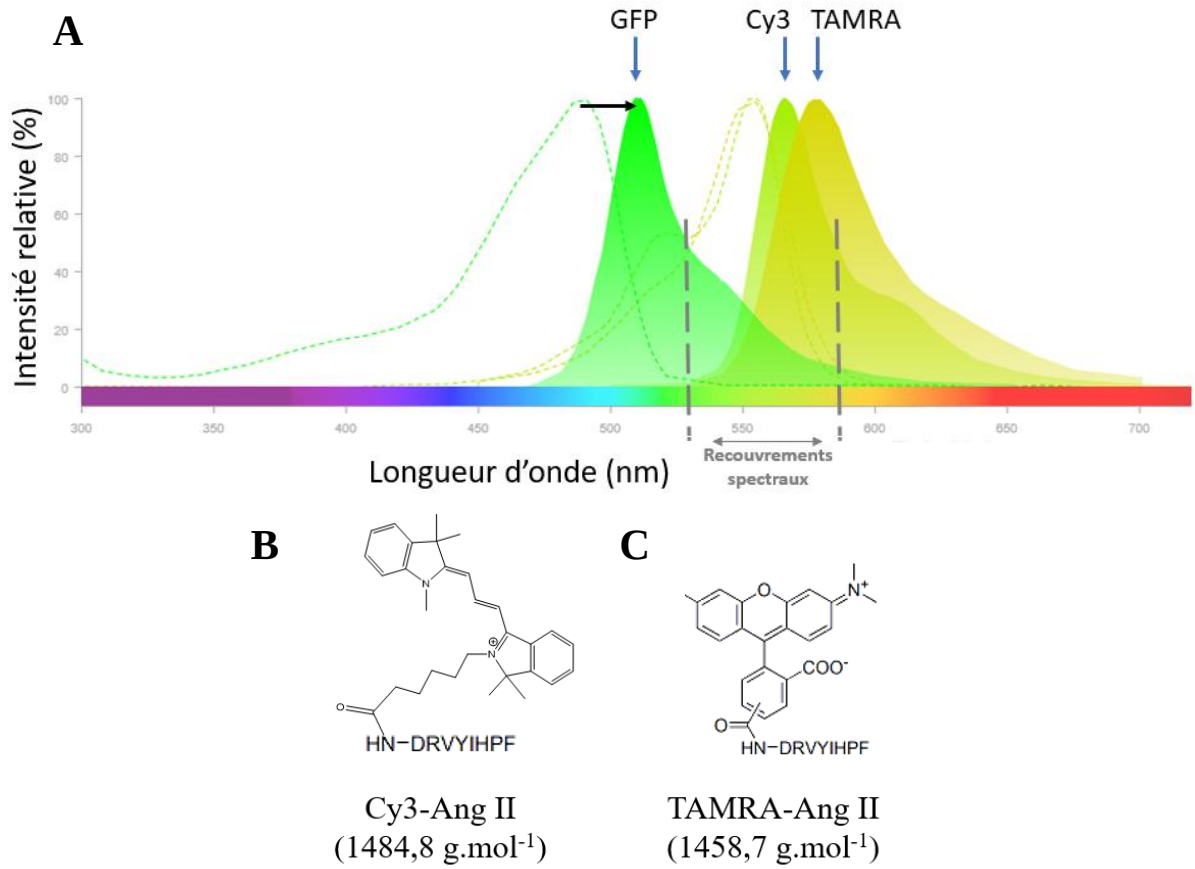


Figure 21 : **Spectres de fluorescence et formules chimiques des différents fluorophores utilisés** (d'après ThermoFisher Scientific). (A) Spectres de fluorescence des différents fluorophores. Les spectres d'excitation sont représentés en pointillés et les spectres d'émission ont une courbe pleine. Les recouvrements spectraux correspondent au chevauchement entre l'émission de la GFP et l'excitation de la Cy3 et de la TAMRA. La flèche noire représente le déplacement de Stokes de la GFP. (B) Formule chimique du ligand Cy3-Ang II. (C) formule chimique du ligand TAMRA-Ang II. Cy3 : Cyanine 3 ; GFP : green fluorescent protein ; TAMRA : Tetramethylrhodamine

Tableau 4 : Comparaison des propriétés photo-physiques des trois fluorophores utilisés : GFP, Cy3 et TAMRA.
Cy3 : Cyanine 3 ; GFP : green fluorescent protein ; TAMRA : Tetramethylrhodamine

	Coefficient d'extinction molaire ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Rendement quantique φ	Brillance ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Déplacement de Stokes (nm)	Photo-stabilité
GFP	56 000	0,6	$3,36 \times 10^4$	21	+
Cy3	150 000	0,31	$4,65 \times 10^4$	12	++
TAMRA	90 000	0,1	$0,9 \times 10^4$	26	++

D'après la structure tridimensionnelle d'AT_1 lié à l'Ang II, l'extrémité C-terminale du peptide est dans la poche formée par les DTMs de AT_1 et son extrémité N-terminale est dirigée vers la surface du récepteur. La Cyanine 3 a été couplée à l'Ang II, au TRV027 ainsi qu'au peptide blanc à l'extrémité N-terminale de ces différents peptides afin d'éviter d'altérer la liaison aux récepteurs. Pour le Losartan, le fluorophore Cy3 a été ajouté sur sa fonction alcool. D'après des données précédentes du laboratoire du Dr M. Boisbrun, un espaceur séparant le fluorophore des ligands a été choisi, le groupement 2,2'-(éthane-1,2-diylbis(oxy))bis(éthane-1-amine). Les modifications chimiques et le greffage sur la fonction alcool primaire du losartan modifient peu la reconnaissance de la molécule par le récepteur AT_1 (M. Meyer *et al.*, 2018). Cet espaceur (appelé linker) a également été utilisé en deuxième intention sur les peptides fluorescents précédents afin d'éloigner la Cyanine 3 du peptide dans le but de limiter l'encombrement stérique que peut provoquer ce greffage et éventuellement rapprocher donneur/accepteur dans le cas d'une mesure de liaison par FRET entre le récepteur GFP-AT_1 et les ligands fluorescents.

Le peptide de l'Ang II et la sonde TAMRA-Ang II (ajoutée au cours de la thèse car non disponible au début) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Louis, USA) et Eurogentec (Seraing, Belgique) respectivement. Les autres ligands ont été synthétisés par nos collaborateurs chimistes et Melissa Colin, doctorante du laboratoire.

Tableau 5 : Liste des différents ligands fluorescents étudiés en tant que potentiel ligand traceur des récepteurs AT_1/AT_2.
Ang II : angiotensine II ; Cy3 : Cyanine 3 ; L : linker ; PB : peptide blanc ; TAMRA : Tetramethylrhodamine

Ligands fluorescents	Formule en acides aminés	Effets sur AT_1 **attendus**	Masse Molaire ($g.mol^{-1}$)	Pureté (%)
Cy3-Ang II	Cy3-DRVYIHPF	Agoniste	1484,8	95,2
Cy3-L-Ang II	Cy3-linker- DRVYIHPF	Agoniste	1645	94
TRV027	Sarcosine-RVYIHPa	Agoniste biaisé	926	96,5
Cy3-TRV027	Cy3- Sarcosine-RVYIHPa	Agoniste biaisé	1370	96,9
Cy3-L-TRV027	Cy3-linker- Sarcosine-RVYIHPa	Agoniste biaisé	1525	93
Peptide blanc (PB)	YFHPDVIR	Aucun effet	1046	99,2
Cy3-PB	Cy3- YFHPDVIR	Aucun effet	1484,8	92,5
Cy3-L-PB	Cy3-linker- YFHPDVIR	Aucun effet	1645	95,2
Los-L-Cy3	-	Antagoniste	1120	99,5
Ang II	DRVYIHPF	Agoniste	1045,5	> 95
TAMRA-Ang II	TAMRA- DRVYIHPF	Agoniste	1458,7	> 95

Lignées cellulaires

Une seule lignée cellulaire a été utilisée, les cellules embryonnaires rénales humaines immortalisées HEK 293 (ATCC Cat# CRL-1573, RRID :CVCL_0045), mais modifiée génétiquement avec différents plasmides suivant les différentes expériences.

Des transfections stables ont été établies pour surexprimer les récepteurs humains AT_1 ou AT_2 marqués par une étiquette Flag ou par la protéine fluorescente EGFP (notée GFP par la suite) sur leur extrémité N-terminale extracellulaire dont les vecteurs sont cités ci-après.

Vecteurs d'expression disponibles

Le vecteur Flag-AT_1 codant pour le récepteur humain étiqueté Flag-AT_1 était un don de l'équipe de Leclerc. Les vecteurs d'expression pIRES (Clontech) codant pour le récepteur humain fluorescent EGFP-AT_1 ou le récepteur humain fluorescent EGFP-AT_2 étaient un don du Pr. Haiech et Pr. Kilhoffer (Université de Strasbourg) et de PCBIS (UMS3286, CNRS, Université de Strasbourg). Le vecteur GFP-AT_1 est publié dans un article de notre équipe (Bouressam *et al.*, 2019). Succinctement, le récepteur est exprimé avec, à son extrémité N-terminale extracellulaire, le fluorophore précédé d'un peptide signal pour la translocation de la protéine de fusion vers la membrane du réticulum endoplasmique (Vollmer *et al.*, 1999). La construction a été vérifiée par séquençage d'ADN avant la transfection.

D'autres vecteurs d'expression sont utilisés pour exprimer transitoirement différents gènes dans les cellules lors de nos expériences. Ainsi, des biosenseurs ont été développés pour les expériences de BRET décrites dans la méthodologie. Les plasmides codant les protéines d'intérêt utilisés pour ces expériences sont : pcDNA3-YPET-ARRB2 ; pcDNA3-YPET-ARRB1 ; pcDNA3-Venus-miniG ; pcDNA3-Venus-MP et pcDNA3-hindIII-FlagAT1Rh-Nluc.

Le vecteur pcDNA3-YPET-ARRB2 code pour la β-arrestine 2 couplée à la protéine fluorescente YPET (don du Dr. Séverine Morisset (El Khamlichi *et al.*, 2019)). Le vecteur pcDNA3-YPET-ARRB1 codant pour la β-arrestine 1 couplée à la protéine fluorescente YPET a été cloné au laboratoire. Les vecteurs pcDNA3-Venus-miniG codent pour différentes protéines G couplées à la protéine fluorescente Venus dérivée de la YFP (yellow fluorescent protein) (miniGq, miniGi, miniG_{12} et miniGs). Les plasmides pour les miniG ont été gracieusement fournis par le Dr. Nevin Lambert (Université d'Augusta, Etats-Unis (Wan *et al.*, 2018)). Ces miniG sont des protéines Gα modifiées, dépourvues d'ancrage membranaire et de site de fixation aux sous-unités Gβγ et ne permettant pas la libération du GDP. Ainsi, la stabilité du complexe formé avec le récepteur sera augmentée. Ces miniG sont fusionnées avec le fluorophore Venus. Le vecteur pcDNA3-Venus-MP code pour un traceur fluorescent de la face interne de la membrane plasmique développé également par le Dr. Nevin Lambert. La protéine fluorescente Venus a été fusionnée avec le fragment C-terminal de KRas4B chargé positivement qui code pour 25 acides aminés riches en lysines RKHKEKMSKDGKKKKKKSKTKCVIM (Kuravi *et al.*, 2010).

Pour finir, j'ai réalisé le clonage du vecteur pcDNA3-hindIII-FlagAT1Rh-Nluc codant pour le récepteur AT_1 couplé à une nanoluciférase Nluc intracellulaire sur son extrémité C-terminale. pcDNA3 porte le gène de résistance à l'ampicilline.

II. Méthodes

1. Caractérisation pharmacologique des ligands fluorescents de AT_1 *in vitro*

Clonage

Pour le clonage du plasmide pcDNA3-hindIII-FlagAT1Rh-Nluc (**Figure 22**), nécessaire lors des expériences de BRET, le système de clonage In-fusion de Takara a été utilisé. Les séquences oligonucléotidiques des amorces ont été déterminées avec le site de Takara Bio et synthétisées par Eurofins Genomics. Le récepteur AT_1 est exprimé avec, à son extrémité N-terminale, un Flag (DYKDDDDK) précédé d'une séquence Kozak accacc permettant une traduction optimale du gène d'intérêt. Un peptide espaceur de 6 acides aminés (LSNENE) se situe entre le gène codant le récepteur (sans le codon stop) et celui codant la Nano luciférase (NanoLuc® luciférase).

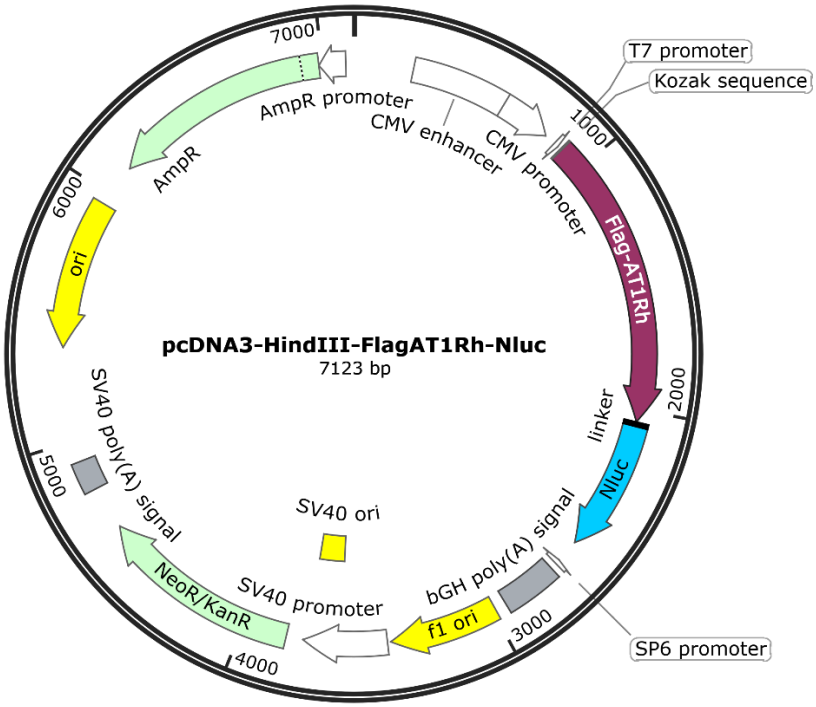


Figure 22 : Carte génétique du plasmide utilisé pour surexprimer le récepteur AT_1 couplé à la Nano luciférase dans les cellules HEK 293 (créé *via* SnapGene). Cette carte illustre le récepteur AT_1 exprimé avec, à son extrémité N-terminale, un Flag suivi d'un peptide espaceur de 6 acides aminés puis du gène codant la Nano luciférase. En amont du gène codant AT_1, une séquence Kozak est ajoutée permettant une traduction optimale du gène d'intérêt.

Culture cellulaire

Les cellules HEK 293 ont été cultivées en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) dans des flasques de 75cm^2 dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium, référence P30-3306 NGlowBiotech) complémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (référence P30-3306 PAN Biotech), 2mM de glutamine (référence 25030-024 GIBCO) et 1% d'antibiotiques (pénicilline à 100unités/mL et streptomycine 100µg/mL, référence 15140-122 GIBCO). Lorsqu'elles atteignent environ 80% de confluence, le milieu est éliminé, les cellules sont rincées au PBS puis 1,5mL de trypsine est ajouté dans chaque boite. Après incubation 5 minutes à 37°C, du milieu complet est ajouté pour inhiber l'action de la trypsine puis un petit volume de cellules est prélevé puis ajouté dans une nouvelle boite contenant 15mL de milieu complet. Les passages cellulaires s'effectuent à une fréquence de 2 par semaine. Tous les réactifs ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

J'ai réalisé le clonage de la lignée HEK 293 GFP-AT_2 en transfection stable. Les cellules ont été étalées sur des boites de culture de 10cm pendant un jour, puis transfectées avec 18µg de plasmide en utilisant la méthode de précipitation au phosphate de calcium (Vollmer *et al.*, 1999). La sélection avec antibiotique a commencé deux jours plus tard avec 600µg.mL^{-1} d'antibiotique G418 (Invitrogen). Des clones cellulaires isolés ont été collectés après 3 semaines de sélection.

Mesure de la libération calcique intracellulaire

Principe :

Le principe de cette méthode est de mesurer la libération calcique intracellulaire dépendante de l'activation des protéines hétéromériques de type G_q. La sonde calcique utilisée pour étudier la dynamique de la signalisation calcique est la sonde fluorescente Fluo-4-acetoxymethyl (AM) (Gee *et al.*, 2000).

Après avoir traversé la membrane plasmique des cellules, cette sonde sera hydrolysée sous sa forme carboxylée active imperméable à la membrane, le Fluo-4 dont les caractéristiques sont résumées dans le **tableau 6**. Elle deviendra donc sensible aux ions calcium qu'elle pourra lier, augmentant ainsi son intensité de fluorescence.

Tableau 6 : Caractéristiques du Fluo-4

	λ excitation	λ émission	K_D (Ca^{2+})	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Rendement quantique φ
Fluo-4	494 nm	516 nm	345 nM	88 000	0,14

Ainsi, des cellules HEK 293 surexprimant le récepteur AT_1 seront incubées avec cette sonde et il sera possible de suivre en temps réel la libération calcique dépendante de la signalisation G_q suite à l'activation du récepteur AT_1 par les différents traceurs testés. Ainsi les réponses fonctionnelles ou la puissance antagoniste des traceurs seront mesurées.

Protocole expérimental :

Des cellules HEK 293 surexprimant de manière stable les récepteurs Flag-AT_1 ont été cultivées à 600 000 cellules/mL pendant deux jours dans du milieu MEM complet en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) en T10. Elles ont ensuite été chargées avec 2,5µM de Fluo-4-AM (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) en présence de 2,5mM de probénécide (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) pendant une heure. Les cellules ont ensuite été rincées et collectées dans du PBS et mises en suspension dans 12mL de tampon HEPES (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, 0,4mM NaH2PO4). Les cellules ont été distribuées dans une plaque 96-puits (Greiner 655090, 100µL/puits) et centrifugées pendant 5 minutes à 800 rpm. Les composés testés ont été dilués en série dans le tampon physiologique HEPES. Les antagonistes utilisés ont été pré-incubés avec les cellules pendant 30 minutes avant l'activation par le composé testé.

Les augmentations de calcium intracellulaire provoquées par les agonistes, injectés après 30 secondes de mesure, ont été enregistrées à l'aide d'un lecteur de microplaques Flexstation III (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) avec une mesure toutes les 3 secondes pendant 220 secondes à 25°C, par émission de fluorescence à 520nm (excitation à 485nm). Les amplitudes de réponse maximales ont été normalisées au niveau de fluorescence de base. Pour chaque concentration de l'agoniste, la valeur maximale de l'augmentation de la concentration en calcium a été déterminée afin de construire des courbes concentration-réponse. Chaque condition est réalisée en duplicat. Le logiciel d'analyse utilisé est KaleidaGraph 4.0.

Localisation subcellulaire par imagerie de fluorescence

Des cellules HEK 293 surexprimant de manière stable les récepteurs humains GFP-AT_1 ou GFP-AT_2 ont été cultivées à 80 000 cellules/puits pendant 48h en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) dans des plaques 24-puits contenant du milieu MEM complet sur des lamelles de 12 mm de diamètre pré-recouvertes de collagène de rat de type I (60 µg/mL, référence 11179179001). Les différents ligands testés ont été dilués dans du tampon physiologique HEPES (0,1% BSA) et ajoutés aux cellules pendant 30 minutes à 37°C. Après incubation, les cellules sur lamelles ont été fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 15 minutes, rincées deux fois avec du PBS et exposées 15 minutes à 50mM de NH_4Cl afin d'éteindre la fluorescence restante du paraformaldéhyde. Après deux autres rinçages dans du PBS, les lamelles ont été collées sur des lames à l'aide d'un agent de montage (Mowiol, Calbiochem). L'acquisition des images a été réalisée avec un microscope à épifluorescence LEICA (microscope motorisé LEICA DM5500B avec caméra froide Leica CTR 6000). Les figures ont été créées avec le logiciel ImageJ.

Mesure des interactions récepteur/effecteur par transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET)

Principe :

La technique de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) est basée sur l'expression hétérologue de deux protéines de fusion, l'une couplée à un donneur d'énergie luminescent (la luciférase) et l'autre couplée à un fluorophore. Lorsque ces deux protéines se retrouvent à une distance inférieure à 100 Å, l'énergie produite par la réaction de la luciférase avec son substrat peut être utilisée pour exciter un fluorophore. Cette technologie consiste à fusionner la luciférase (le donneur) et la molécule fluorescente (l'accepteur) aux protéines d'intérêt. Ainsi le récepteur est couplé au donneur, en fusion sur son extrémité C-terminale, et les effecteurs sont couplés à l'accepteur d'énergie. Lorsque ces constructions de fusion sont coexprimées dans des cellules, elles permettent d'étudier de manière quantitative leur interaction en temps réel, se traduisant par l'émission de fluorescence de l'accepteur lorsqu'il est à une distance inférieure à 100 Å du donneur. Le signal BRET, ou le rapport BRET, correspond à l'énergie émise par l'accepteur par rapport à celle émise par le donneur.

Ainsi, le récepteur AT_1 fusionné à la NLuc luciférase sera le donneur d'énergie et les différents accepteurs seront les fluorophores couplés aux protéines effectrices dont le recrutement à la membrane est étudié : β-arrestine 1, β-arrestine 2, miniGq, miniGi, $miniG_{12}$ et miniGs. Il est possible d'étudier le BRET de proximité d'interaction de complexe protéique (**Figure 23**). Un autre accepteur, la Venus-MP, a été exprimé en excès dans les cellules afin de recouvrir la face interne de la membrane plasmique (MP). Le récepteur fusionné au donneur produira un signal BRET, nommé BRET de collision, lorsqu'il se localise à la membrane plasmique. Si ce récepteur est internalisé après son activation, la distance entre le donneur et l'accepteur augmentera, diminuant le transfert d'énergie.

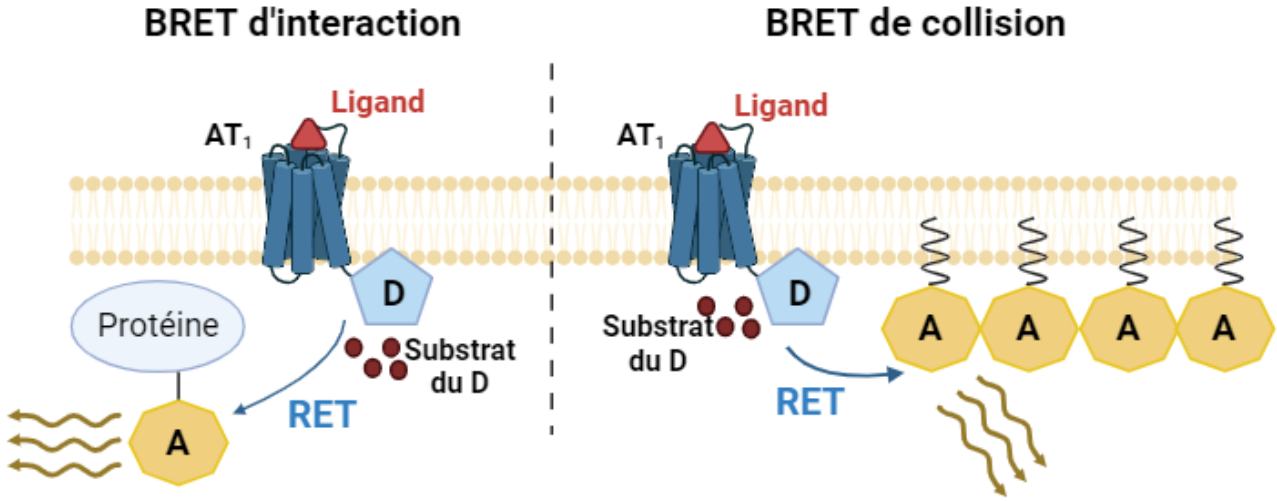


Figure 23 : Schéma représentatif du BRET d'interaction et du BRET de collision (schéma réalisé *via* BioRender). Le transfert d'énergie (RET) se fait entre le donneur (D) d'énergie et l'accepteur (A) couplé à la protéine d'intérêt dans le cas d'un BRET d'interaction. Dans le cas du BRET de collision, les accepteurs sont en excès couplés à une ancre lipidique. A : accepteur ; D : donneur ; RET : transfert d'énergie par résonance

Protocole expérimental :

Les cellules HEK 293 ont été ensemencées à 500 000 cellules/mL pendant 24h en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) dans des plaques 6-puits (référence 353046, Falcon) contenant 5mL de milieu MEM complet. La transfection transitoire des cellules est effectuée le lendemain.

2h avant la transfection, le milieu MEM complet est éliminé et remplacé par 3mL de milieu MEM complémenté avec 10% de SVF et 2mM de glutamine. La quantité de plasmide utilisée par puits pour la transfection est de 3µg d'ADN des différents plasmides au total (**Tableau 7 / Figure 24**). Cette quantité est diluée dans 300µL de milieu MEM puis l'agent transfectant contenant 120µL de milieu MEM et 9µL de Polyethyleneimine (PEI) max (Référence 24765-2, Polysciences) est ajouté à la solution. Après homogénéisation, le mélange est incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Pour finir 430µL du mélange (plasmides + PEI max) est ajouté par puits. La plaque est de nouveau incubée pendant 24h à 37°C, 5% CO_2.

Tableau 7 : Quantité des différents plasmides utilisés pour la transfection transitoire des cellules HEK 293 dans les expériences de BRET. ARRB : arrestine ; AT_1 : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; Nluc : nanoluciférase ; YPET : yellow fluorescent protein

	Donneur Flag-AT1Rh-Nluc	Accepteur	Plasmide vide pcDNA3
AT1-Nluc / Venus-miniG	0,1µg	0,8 µg	2,1 µg
AT1-Nluc / YPET ARRB	0,1µg	0,4 µg	2,5 µg
AT1-Nluc / Venus-MP	0,1µg	0,5 µg	2,4 µg

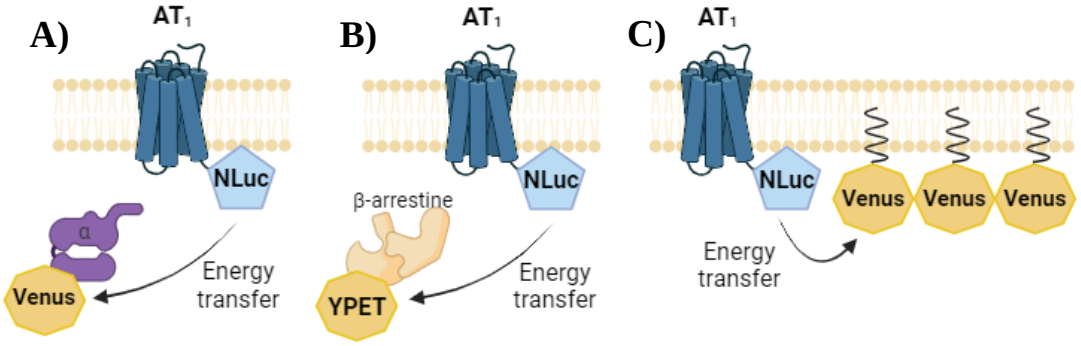


Figure 24 : Schéma représentatif des protéines de fusion utilisées pour déterminer les interactions récepteur/effecteur et l'internalisation des récepteurs AT_1 (schéma réalisé *via* BioRender). (A) transfert d'énergie entre AT1-Nluc et Venus-miniG illustrant le recrutement des miniG par les récepteurs AT_1 activés par un agoniste. (B) transfert d'énergie entre AT1-Nluc et YPET-ARRB illustrant le recrutement des β-arrestines 1 ou 2 par les récepteurs AT_1 activés par un agoniste. (C) transfert d'énergie entre AT1-Nluc et Venus-MP illustrant les récepteurs AT_1 à la surface de la membrane plasmique.

Le lendemain, une plaque 96-puits blanche à fond blanc opaque (référence 655073, Greiner) est pré-coatée avec 100µL de collagène de rat de type I (60 µg/mL) pendant 15 minutes à température ambiante. Le collagène en excès est aspiré et la plaque sèche pendant 10 minutes. En attendant, les cellules transfectées dans la plaque 6-puits sont resuspendues dans 1,3mL/puits de milieu MEM complet frais. Les cellules sont décollées par une série d'aspirations/refoulements douces avec la pipette puis 100µL de cellules transfectées/puits sont ajoutées à la plaque 96-puits pré-coatée. Les cellules sont incubées 24h en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C).

Le lendemain, le milieu de culture des cellules est éliminé puis remplacé par 80µL/puits de tampon physiologique HEPES (0,2% BSA au lieu de 0,1%). Les composés testés ont été dilués en série dans le tampon HEPES (0,2% BSA). Les antagonistes utilisés ont été pré-incubés avec les cellules pendant 30 minutes avant l'activation par le composé testé. Dans la plaque 96-puits, 10µL des composés à tester ont été ajoutés suivi du substrat NLuc Glow (dilué au 1/80 dans du tampon HEPES (0,2% BSA) (Interchim, Montluçon, France) 10 minutes avant l'enregistrement du point final BRET. Les signaux ont été acquis dans un appareil VictorLight (Pekin Elmer) à 37°C. Pour chaque puits, la lumière émise est mesurée de manière consécutive à la longueur d'onde d'émission du donneur (Nluc, filtre d'émission 435-385nm) et à la longueur d'onde d'émission de l'accepteur (YPET ou venus, filtre d'émission à 510-560nm).

Un « ratio BRET » correspondant au signal dans le « canal accepteur » (filtre bande passante 510-560nm) divisé par le signal dans le « canal donneur » (filtre bande passante 435-385nm) a été calculé. La valeur de « netBRET » est ensuite calculée en soustrayant le « ratio BRET » des cellules exprimant uniquement le donneur d'énergie au « ratio BRET » des cellules exprimant le donneur et l'accepteur d'énergie (pour le même temps d'activation). Pour finir, les signaux BRET modulés par un agoniste sont calculés en soustrayant le signal netBRET obtenu sans activation des récepteurs aux autres signaux netBRET.

Un minimum de 3 expériences indépendantes a été réalisé en 2 réplicats et les données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0.2.

Mesure de la sélectivité des ligands fluorescents pour AT_1 par cytométrie en flux

Principe de la cytométrie en flux :

Cette technique permet d'évaluer les caractéristiques individuelles de chaque particule présente dans une suspension, qu'il s'agisse de cellules, de bactéries, de parasites ou de billes. Elle permet de mesurer des aspects tels que la taille, la forme, la granulosité ainsi que la présence de composants ou de fonctions détectables par des molécules fluorescentes.

Les particules en suspension passeront devant un ou plusieurs faisceaux laser, tandis que des détecteurs enregistrent les signaux émis par chaque particule comprenant :

- La lumière diffusée à de faibles angles (Forward Scatter, FSC), qui renseigne sur la taille des particules
- La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter, SSC), qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules
- Les signaux de fluorescence comprenant : la fluorescence émise par la particule elle-même (autofluorescence) et la fluorescence émise par une molécule fluorescente qui se lie spécifiquement à la particule

Les données collectées sont ensuite présentées sous forme de graphiques ou d'histogrammes, accompagnés de statistiques relatives aux populations cellulaires et aux paramètres étudiés.

Cette méthode est utilisée pour visualiser et quantifier la liaison des différents ligands fluorescents aux cellules surexprimant les récepteurs AT_1 ou AT_2.

Protocole expérimental :

Les cellules HEK 293 exprimant de manière stable les récepteurs GFP-AT_1 ou GFP-AT_2 ou les cellules HEK 293, servant de contrôle négatif, ont été cultivées en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) dans du milieu MEM complet pendant deux jours en T10. Les cellules ont ensuite été rincées dans du PBS et recueillies dans du PBS-EDTA 5mM. Après une centrifugation des cellules à 1000g pendant 5 minutes, elles ont été resuspendues dans du tampon HEPES (0,2% BSA).

Les cellules ont ensuite été préincubées à 37°C avec les différents ligands testés pendant 15 minutes, avec 6 concentrations différentes par ligand afin d'obtenir une courbe concentration-réponse. Après une première centrifugation à 2000g à 4°C pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 200µL de tampon HEPES (0,2% BSA), puis une seconde centrifugation est faite dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant est de nouveau éliminé, les cellules sont resuspendues dans 750µL de PBS-EDTA et conservées dans la glace jusqu'à l'analyse au cytomètre. Afin de séparer les éventuels agrégats cellulaires, la suspension cellulaire est filtrée (toile NITEX 80µm, référence 074008 Dutscher) avant d'être analysée. La fluorescence GFP et la fluorescence de la Cy3 ont été détectées par analyse de 10 000 cellules par échantillon sur un cytomètre Celesta Sorp comprenant 4 lasers (BD, Biosciences, San Diego, CA, USA). La GFP a été excitée par un laser à 488nm, l'émission a été capturée entre 530 et 560nm. La Cy3 ou la TAMRA ont été excitées par un laser à 561nm, l'émission a été capturée entre 585 et 600nm.

Microscopie confocale

Principe :

Cette étude par microscopie confocale à fluorescence est combinée à une nouvelle méthode quantitative d'analyse d'images mise en place dans le laboratoire de Karen Martinez (Brinkenfeldt *et al.*, 2023) (Short-Term Scientific Mission CA18133 – Université de Copenhague). Cette expérience a pour objectif d'étudier et de quantifier la liaison spécifique des différents ligands fluorescents synthétisés au récepteur AT_1.

L'équipe de Karen Martinez a développé deux logiciels, HiTIAN et RevCell. Le premier logiciel permet de déterminer de manière automatisée l'intensité de fluorescence de la membrane plasmique à environ 300 emplacements distincts de chaque cellule imagée et ainsi créer un grand ensemble de données à partir de ces images. Ensuite le deuxième logiciel permet de déterminer le K_D d'un ligand pour son récepteur en fonction de la densité de récepteurs dans un pixel de la membrane plasmique.

Protocole de détermination du K_D du Losartan-Cy3 :

Les cellules HEK 293 ont été ensemencées à 50 000 cellules/puits pendant 24h en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) dans du milieu DMEM (DMEM/F-12(1 :1)1X + GlutaMAX, référence 31331-028 Gibco) complémenté de 10% de SVF et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) dans des lamelles à 8-puits d'ibidi pré-recouvertes de poly-L-lysine (0,01% ; CAS 25988-63-0, Sigma). La transfection transitoire des cellules est effectuée le lendemain.

La quantité de plasmide utilisée par puits pour la transfection est résumée dans le **tableau 8**. Cette quantité est diluée dans 200µL de milieu OptiMem puis la lipofectamine 2000 (référence 11668-027 Invitrogen) est ajoutée. Après homogénéisation, le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Pour finir, 200µL du mélange (plasmides + Lipofectamine) sont ajoutés par puits de chambre ibidi où le milieu a été préalablement éliminé. La plaque est de nouveau incubée pendant 24h à 37°C, 5% CO_2.

Tableau 8 : Quantité des différents plasmides utilisés pour la transfection transitoire des cellules HEK 293 dans les expériences de microscopie confocale

	GFP-AT_1	GFP-AT_2	GFP-Mas
Plasmide	2µg	2µg	1µg
Lipofectamine	6µL	4µL	5µL
OptiMem	200µL	200µL	200µL

24 h après la transfection, les cellules sont incubées pendant 15 minutes à 20°C avec différentes concentrations du ligand d'intérêt étudié. Les antagonistes utilisés en excès (Losartan ou PD123319 à 10^{-5}mol.L^{-1}) ont été pré-incubés à 37°C avec les cellules pendant 15 minutes avant l'activation par le composé testé. Après incubation, les cellules ont été rincées avec du tampon HEPES (0,2% BSA) avant d'être fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 5 minutes, puis rincées deux fois avec le tampon HEPES (0,2% BSA).

Les échantillons ont été imagés avec un microscope confocal à balayage laser Olympus IX81 utilisant un objectif à immersion dans l'huile x100, 1,4 NA. Les échantillons ont été éclairés simultanément avec un laser de 480nm et un laser de 559nm, et 3 canaux ont été acquis en parallèle : lumière d'émission à 500-545nm pour GFP ; émission de lumière à 570-670nm pour Cy3 ; et la lumière de transmission. Chaque échantillon a été photographié dans cinq champs de vision différents.

L'intensité de fluorescence de la Cy3 de la membrane plasmique a été mesurée pour toutes les images de chaque échantillon et analysée à l'aide d'un script automatique développé en interne, les logiciels MATLAB HiTIAN et RevCell. Succinctement, les balayages linéaires perpendiculaires le long de la membrane plasmique ont été automatiquement dessinés et le signal lié a été extrait du canal

correspondant *via* un ajustement gaussien du profil d'intensité. Toutes les mesures au sein du même échantillon ont été regroupées en un seul point décrivant cet échantillon.

Les données ont été ajustées dans Graphpad Prism 10 à l'aide d'un modèle « Un site – Liaison totale et non spécifique » dans un ajustement commun : liaison totale sur les cellules surexprimant les récepteurs puis liaison non spécifique avec un excès d'antagoniste des récepteurs.

Protocole de l'étude de l'état d'oligomérisation des récepteurs AT_1 :

Les cellules HEK 293 ont été ensemencées à 50 000 cellules/puits pendant 24h en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) dans du milieu DMEM (DMEM/F-12(1 :1)1X + GlutaMAX, référence 31331-028 Gibco) complémenté de 10% de SVF et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) dans des lamelles à 8-puits d'ibidi pré-recouvertes de poly-L-lysine (0,01% ; CAS 25988-63-0, Sigma). La transfection transitoire des cellules est effectuée le lendemain.

Les cellules ont été transfectées avec le plasmide SNAP-AT_1 (Cisbio) dans 200µL de milieu OptiMem puis la lipofectamine 2000 (référence 11668-027 Invitrogen) est ajoutée. Après homogénéisation, le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Pour finir, 200µL du mélange (plasmides + Lipofectamine) sont ajoutés par puits de chambre ibidi où le milieu a été préalablement éliminé. La plaque est de nouveau incubée pendant 24h à 37°C, 5% CO_2.

Le lendemain, les cellules exprimant SNAP-AT_1 ont été marquées avec un mélange de ligand Alexa Fluor 546 (BG-546) et de ligand Alexa Fluor 647 (BG-647) (New England Biolabs). Il s'agit de deux ligands SNAP-surface. Les substrats ont d'abord été mélangés au rapport souhaité jusqu'à une concentration totale de 2,5µM dans du milieu DMEM, puis ajoutés à la culture cellulaire. Le couplage covalent SNAP-tag a été réalisé à 37°C, 5% CO_2 en atmosphère humide pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec un tampon d'imagerie puis fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 5 minutes, puis rincées deux fois avec le tampon HEPES (0,2% BSA).

La microscopie confocale à balayage laser a été réalisée sur une configuration confocale Olympus IX81 à l'aide d'un objectif d'immersion dans l'huile UPLSAPO 100x avec une ouverture numérique de 1,4. Le ligand BG-546 a été excité par un laser à 559nm, l'émission a été capturée entre 600 et 630nm. Le ligand BG-647 a été excité par un laser à 635nm, l'émission a été capturée entre 655 et 755nm. Chaque échantillon a été photographié dans cinq champs de vision différents.

Toutes les intensités de fluorescence mesurées ont été extraites des images brutes à l'aide d'un script MATLAB (The Mathworks, Inc., Natick, MA) développé en interne et expliqué dans le protocole précédent. Les données ont été ajustées dans Graphpad Prism 9.

2. Caractérisation pharmacologique des ligands fluorescents de AT_1 *ex vivo*

Animaux et déclaration éthique

Toutes les expériences sont effectuées en conformité avec les recommandations de la Communauté Européenne (directive 2010/63/UE) pour l'utilisation des animaux de laboratoire. Les protocoles et les procédures expérimentales ont été approuvés par le comité d'éthique régional sur l'expérimentation animale (saisine BisNitroVivo APAFIS #15598) et les procédures expérimentales hors champ ont été contrôlées par la SBEA (Structure en charge du Bien-Être Animal, n° du projet ACBS17-MCAIA) de l'Animalerie centrale du Campus Brabois Santé ACBS dont le numéro d'agrément est C54-547-30.

Les expériences sont réalisées sur des rats Wistar mâles normo-tendus, non consanguins, âgés de 4 à 8 mois (Rj/Han : WI, Janvier, Le Genest-Saint-Isles, France). Les procédures sont réalisées en zone EOPS (exempt d'Organismes pathogènes Spécifiques) à l'ACBS.

Préparation des artères cérébrales moyennes de rat

Les rats sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (4% dans l'O_2 à 2L.min^{-1}) et mis à mort par décapitation. Le cerveau prélevé est placé dans une solution saline physiologique (PSS) (119 mM NaCl, 24 mM $NaHCO_3$, 4,7 mM KCl, 1,17 mM $MgSO_4$, 1,18 mM KH_2PO_4, 1,6 mM $CaCl_2$, 6 mM glucose, pH 7,4) à 4°C. Les artères cérébrales moyennes (ACM) sont choisies comme modèle classique de vaisseaux cérébraux isolés. Le segment d'ACM le plus proximal au polygone de Willis, dépourvu de tissu conjonctif et d'artères collatérales, est isolé sous loupe binoculaire et monté entre deux pipettes en verre d'environ 100µm de diamètre, fixé avec du fil de soie (diameter 20µm, Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France) dans un artériographe d'Halpern (modèle CH-1-LIN-SH, Living System Instrumentation, Burlington, VT, USA). Par l'intermédiaire du circuit intraluminal, l'artère est mise sous pression et perfusée avec du PSS à 37°C filtré (filtre de 0,22 µm ; pression de 80 mmHg et débit intraluminal de 100 µL.min^{-1}). L'artère est immergée dans une solution de PSS oxygénée (95% O_2, 5% CO_2) à 37°C (débit extraluminal de 10 mL.min^{-1}) pendant une heure afin de stabiliser le tissu, pour qu'il récupère son tonus myogénique.

L'artériographe est placé sous un microscope à fluorescence inversé (Axio Vert A1, Zeiss) relié à un ordinateur par une caméra (Jenoptik, Optical Systems GmbH, D-07729 Jena) permettant ainsi d'observer l'artère en temps réel en contraste de phase avec le logiciel ProgRes Capture.

Le diamètre interne (DI) de base est mesuré à l'aveugle par deux opérateurs différents. Les signaux ont été numérisés et stockés avec le logiciel d'acquisition de données WinDataq DI 720 (Dataq Instruments, Akron, OH, USA).

La viabilité de l'ACM a ensuite été évaluée avec du chlorure de potassium KCl à 4.10^{-2} mol.L^{-1} ajouté au bain extraluminal. La réponse contractile atteint un équilibre et est mesurée après une exposition de 5 minutes. La réponse est exprimée en pourcentage de variation du DI par rapport au DI initial. La perfusion avec du KCl est suivie d'une période de rinçage au PSS de 5 minutes afin que l'artère retrouve son DI basal.

Pour s'assurer de la viabilité de l'ACM tout au long de l'expérience, une solution de sérotonine à deux concentrations différentes (10^{-8} mol.L^{-1} et 10^{-6} mol.L^{-1}) est ajoutée au bain extraluminal à la fin de la manipulation. La réponse contractile est mesurée après une exposition de 5 minutes pour chaque concentration et la réponse contractile est exprimée en pourcentage de variation du DI par rapport au DI initial. Les artères présentant moins de 20% de contraction pour ces trois solutions (KCl et deux concentrations de sérotonine) sont exclues des résultats car leur intégrité est remise en cause.

Etude de la réactivité artérielle suite à l'application de ligands AT_1

a. Prétraitement au Losartan

Après l'évaluation de la viabilité au KCl, les artères ont été exposées pendant 30 minutes à du Losartan 1.10^{-5} mol.L^{-1} ou au PSS. Cette condition permettra de s'assurer que les variations de diamètre qui pourront être observées sont dépendantes des récepteurs AT_1.

b. Réponse des différents peptides

Les artères ont ensuite été exposées aux différents peptides étudiés à des concentrations allant de 1.10^{-12} mol.L^{-1} à 1.10^{-6} mol.L^{-1} avec 5 minutes d'exposition par concentration de peptide. Les temps d'exposition étaient réalisés à l'obscurité lorsque les peptides testés présentaient de la fluorescence. Les courbes concentration-réponse aux peptides natifs (Ang II, TRV027 et peptide blanc) ont été comparées aux courbes concentration-réponse des peptides fluorescents. L'ensemble de ces courbes a été comparé après un prétraitement au PSS ou au Losartan. Afin d'exclure tout effet dépendant du temps et de l'âge des animaux, les différentes conditions ont été réalisées dans un ordre aléatoire.

Analyses statistiques

Les valeurs de DI ont été mesurées à l'aveugle par deux opérateurs différents, garantissant des mesures fiables et objectives. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de Graphpad Prism version 8.0.2.

Les réponses vasoactives des artères cérébrales moyennes sont exprimées en pourcentage de changement de DI par rapport à la valeur mesurée lors du prétraitement. Cette normalisation permet de limiter les sources de variation indésirables comme les différences anatomiques des artères. Pour chaque condition, la taille de l'échantillon est d'au moins n = 4, avec un effectif plus petit pour les groupes prétraités au Losartan (compte tenu de la faible variabilité dans ces groupes témoins et afin d'éviter des morts inutiles d'animaux).

Des courbes concentration-réponse aux peptides ont été construites pour chaque ACM et la moitié de la concentration efficace maximale (EC50) a été calculée à l'aide de l'équation de Hill : %changement DI = E_{min} + (E_{max} + E_{min}) / (1+10 $^{(logEC50 - log(concentration)*pente\ de\ Hill)}$), où E_{min} et E_{max} sont respectivement la réponse minimale et maximale atteinte dans chaque courbe concentration-réponse. Les différences dans les réponses vasoactives ont été déterminées par deux tests statistiques : une ANOVA à deux facteurs (nature du peptide et présence ou non du fluorophore) suivi d'un test post-hoc de Tukey ($P < 0,05$). Avec la sonde TAMRA-Ang II, la différence de réponse vasoactive a été déterminée par un test ANOVA à un facteur (nature du peptide) suivi d'un test post-hoc de Bonferroni ($P < 0,05$).

Résultats et discussion

I. Paramètres testés et optimisés pour chaque expérience *in vitro*

L'optimisation de protocoles déjà établis au sein des différents laboratoires et la mise au point de nouveaux outils permettant d'étudier le récepteur AT_1, son interaction et sa signalisation induits par les différents ligands fluorescents ont été nécessaires afin d'améliorer l'efficacité, la fiabilité et la reproductibilité des expériences.

Ainsi, plusieurs paramètres tels que les cellules utilisées, le tampon physiologique, la température et le temps d'incubation des composés testés ont été comparés dans les différentes méthodes. Les critères optimaux pour étudier ces différents composés sont récapitulés dans le **tableau 9**.

Tableau 9 : Conditions optimales d'expérimentation suivant les différentes méthodes *in vitro*. BRET : transfert d'énergie par résonance de bioluminescence ; BSA : albumine de sérum bovin ; GFP : green fluorescent protein

Méthode	Cellules utilisées	Tampon physiologique	Temps d'incubation / d'activation	Température	Fixation des cellules
Cytométrie en flux	HEK 293 HEK 293 Flag-AT_1 HEK 293 EGFP-AT_2	HEPES 0,2% BSA	15 minutes	37°C	Non
Réponse calcique	HEK 293 Flag-AT_1	HEPES ss BSA	Cinétique / Antagoniste 30 minutes avant	25°C	Non
BRET	HEK 293 + transfection transitoire	HEPES 0,2% BSA	10 minutes / Antagoniste 30 minutes avant	37°C	Non
Imagerie en épifluorescence	HEK 293 EGFP-AT_1 HEK 293EGFP-AT_2	HEPES 0,1% BSA	30 minutes / Antagoniste 30 minutes avant	37°C	Oui
Microscopie confocale	HEK 293 + transfection transitoire	HEPES 0,2% BSA	15 minutes / Antagoniste 15 minutes avant	20°C	Oui

La température

Le contrôle de la température d'incubation permet d'inhiber ou non l'internalisation des récepteurs selon l'objet de l'étude. En effet, l'internalisation n'a pas lieu à 20°C mais a lieu à 25°C et 37°C (Cézanne *et al.*, 2004; Gicquiaux *et al.*, 2002).

Les études de la réponse calcique induite par les récepteurs AT_1 suite à leur activation par les composés testés sont réalisées à 25°C et non 37°C. En effet, les résultats sont ainsi plus reproductibles car le temps de lecture d'une plaque 96-puits entière dure plus de 45 minutes et la sonde fluorescente calcique perd de son intégrité plus rapidement à 37°C qu'à 25°C. A 25°C les canaux calciques à la membrane des cellules ne marchent plus, de ce fait seul le calcium du réticulum endoplasmique est mesuré.

L'albumine de sérum bovin (BSA)

L'utilisation de l'albumine de sérum bovin (BSA) dans le tampon physiologique HEPES permet d'assurer une meilleure disponibilité des ligands de AT1, une meilleure reproductibilité et une meilleure mesure en stabilisant et fluidifiant le tampon physiologique. De plus, la BSA, à une certaine concentration, améliore la biodisponibilité des peptides comme nous pouvons le constater avec la mesure de la réponse calcique des récepteurs AT_1 induite par l'Ang II (**Figure 25, tableau 10**). En effet, la BSA à faible concentration semble améliorer la biodisponibilité du peptide Ang II avec une EC_{50} qui diminue et une amplitude maximale plus importante en utilisant le tampon HEPES contenant 0,1% de BSA. Cependant, les conditions concordant avec l'EC_{50} retrouvée dans la littérature sont les expériences avec un tampon sans BSA, avec une EC_{50} de l'Ang II pour les récepteurs AT_1 de l'ordre du nanomolaire.

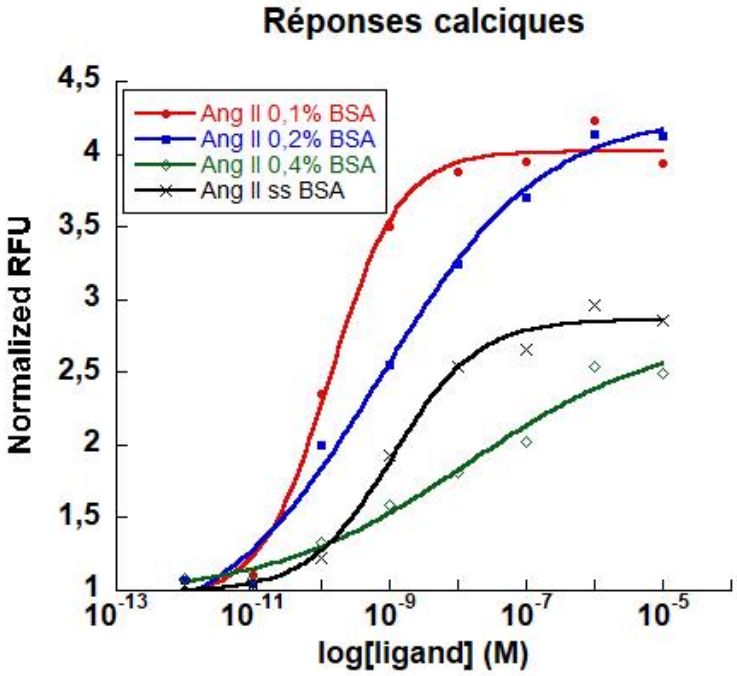


Figure 25 : Effet de la BSA sur la mobilisation calcique intracellulaire après activation par l'Ang II. Effet de la BSA sur la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs Flag-AT_1 activés par l'Ang II. Le graphique est représentatif d'une expérience distincte, avec un duplicat pour chaque condition, hormis l'Ang II ss BSA qui est représentatif de n = 7. Chaque point de données représente les valeurs moyennes (KaleidaGraph 4.0).

Tableau 10 : Valeurs d'EC_{50} de l'Ang II suivant la concentration de BSA dans le tampon. Ang II : angiotensine II ; BSA : albumine de sérum bovin

Ang II	EC_{50} (M)	n
Sans BSA	$1,07 \pm 0,2 \times 10^{-9}$	7
0,1% BSA	$1,36 \pm 0,37 \times 10^{-10}$	1
0,2% BSA	$7,45 \pm 5 \times 10^{-10}$	1
0,4% BSA	$1,4 \pm 1,8 \times 10^{-8}$	1

Concernant les expériences en cytométrie en flux, les cellules dont les clones surexpriment le plus les récepteurs AT_1 ou AT_2 ont été choisies préférentiellement. Les cellules HEK 293 servent de contrôle négatif et permettent d'étudier la liaison non spécifique des différents composés testés. Plusieurs températures et temps d'incubation ont été testés afin de limiter le bruit de fond de l'expérience. Les cellules étudiées n'ont pas été fixées pour ces expériences car cela compromettait l'intégrité des cellules et engendrait une augmentation des débris cellulaires.

Le temps d'incubation

La signalisation du récepteur AT_1 étudiée par la méthode de BRET est réalisée à température physiologique, soit 37°C. Pour cette méthode, le clonage du plasmide Flag-AT_1-Nluc était nécessaire et de nombreuses mises au point concernant la transfection des cellules ont été réalisées, notamment la quantité de plasmide nécessaire pour chaque protéine effectrice. Des cinétiques d'activation ont été réalisées avec les différents accepteurs testés (Venus-miniG, YPET-arrestines et Venus-MP), permettant de confirmer une stabilisation du signal maximal mesuré à partir de 10 minutes d'activation des récepteurs AT_1 par les différents composés (**Figure 26**). Il a donc été décidé que les mesures prises pour chaque condition se feraient dans ce laps de temps, avec une pré-incubation éventuelle par des antagonistes non fluorescents. En effet, le blocage des signaux par les antagonistes permet de montrer l'effet AT_1-dépendant des composés fluorescents.

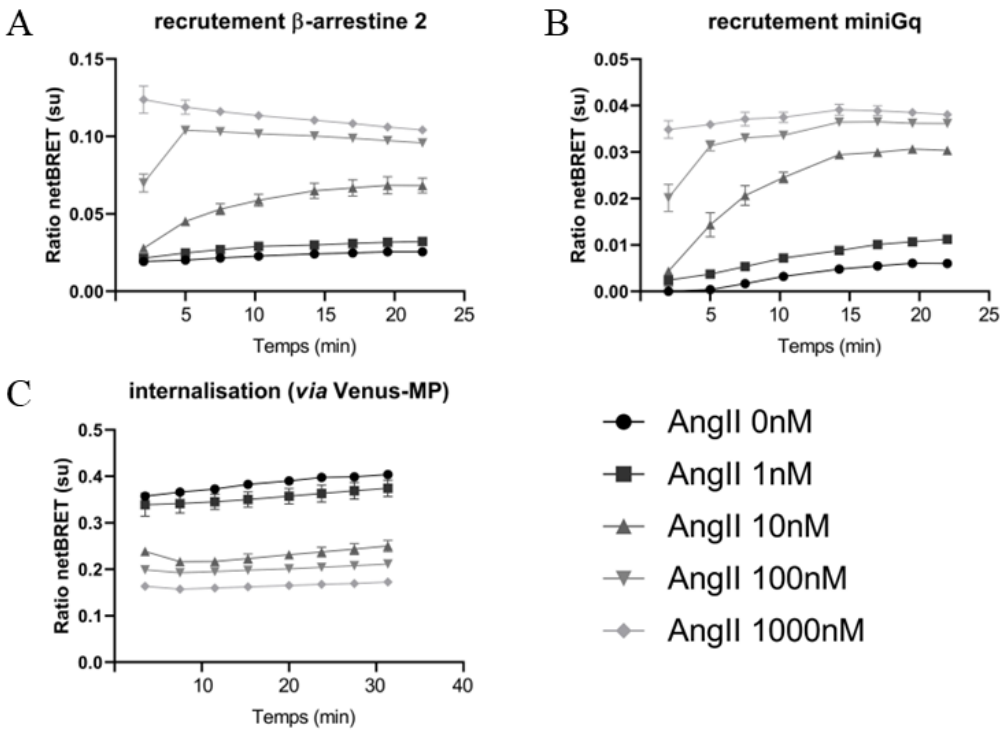


Figure 26 : Cinétique d'activation des différents effecteurs du récepteur AT_1 après activation par l'Ang II. Cinétique des courbes de recrutement des protéines par NanoBRET mesurées dans des cellules HEK 293 exprimant de manière transitoire le récepteur FlagAT1-Nluc et (A) YPET ARRB2, (B)Venus-miniGq ou (C) Venus-MP après activation des récepteurs par l'Ang II. Les graphiques sont représentatifs d'une expérience distincte, avec un duplicat pour chaque condition (n = 1). Chaque point de données représente les valeurs moyennes ± SEM (Graphpad Prism 8.0.2)

La mise au point de protocoles rigoureux et fiables assure l'obtention de résultats reproductibles et de mesures justes. En utilisant ces méthodes expérimentales optimisées, les biais et erreurs potentielles sont minimisés. Les meilleures conditions sont réunies pour observer et mesurer l'impact des différents traceurs fluorescents afin de les tester sur les récepteurs AT_1 et également sur les récepteurs AT_2.

Tous les tests suivants ont été réalisés sur le peptide blanc (PB), construit avec les mêmes acides aminés que l'Ang II mais dans un ordre aléatoire, servant de contrôle négatif. Ce peptide, avec ou sans fluorophore, n'induit pas de réponse de la part du récepteur AT_1. En effet, nous n'observons pas de réponse calcique après l'ajout de ces peptides contrôles aux récepteurs AT_1. Il n'y a pas de recrutement des protéines Gq, des β-arrestines, ni d'internalisation observés. De plus, sur différentes lignées cellulaires, nous observons une absence de marquage des cellules à la Cy3 que ce soit avec les lamelles en immunofluorescence ou en cytométrie en flux. De ce fait, les variations que nous observerons avec les autres ligands fluorescents seront bien spécifiques, dues à la séquence spécifique en acides aminés et non à la Cyanine 3 ajoutée.

II. Sélectivité des ligands fluorescents pour AT_1

Trois lignées cellulaires ont servi pour ces expériences : des cellules HEK 293 contrôles négatifs, des HEK 293 surexprimant les récepteurs Flag-AT_1 et des HEK 293 surexprimant les récepteurs GFP-AT_2. La fluorescence des cellules dans le canal de détection rouge de la Cy3 et TAMRA qui sera observée sur les cellules HEK 293 contrôles représente le bruit de fond de la manipulation, la liaison non spécifique des ligands fluorescents. Ce bruit de fond est soustrait à la fluorescence Cy3/TAMRA des autres lignées cellulaires. Ainsi, une augmentation du pourcentage de cellules marquées par la Cy3/TAMRA est observée lorsque les ligands fluorescents couplés à la Cy3 se lient de manière spécifique à leur récepteur (**Figure 27**).

Les dérivés fluorescents de l'Ang II

Les cellules HEK 293 ne surexprimant ni les récepteurs AT_1 ni les récepteurs AT_2 ont un marquage à la Cy3 de l'ordre de 42,8% lorsque les cellules sont incubées 15 minutes avec 300nM de Cy3-Ang II (**Figure 27 A**). La liaison non spécifique de ce ligand est donc déterminée à 42% pour cette concentration de ligand.

A cette même concentration de Cy3-Ang II, la population cellulaire des HEK 293 surexprimant les récepteurs Flag-AT_1 est marquée à 79% par la Cy3 (**Figure 27 B**) et la population cellulaire des HEK 293 surexprimant les récepteurs GFP-AT_2 a un marquage à la Cy3 de 92% (**Figure 27 C**). En enlevant le pourcentage de liaison non spécifique dans ces deux populations cellulaires la liaison spécifique aux récepteurs est déterminée. Ainsi le ligand Cy3-Ang II à 300nM se lie de manière spécifique aux

récepteurs AT_1 et aux récepteurs AT_2. Le même raisonnement s'applique pour le ligand TAMRA-Ang II à 300nM avec une liaison spécifique aux récepteurs AT_1 (**Figure 27 E**) et aux récepteurs AT_2 (**Figure 27 F**). Il est intéressant de noter que le peptide TAMRA-Ang II donne un bruit de fond moins important que le peptide Cy3-Ang II (**Figure 27 A vs D**). Des résultats similaires sont observés avec le ligand Cy3-L-Ang II dont les résultats ne sont pas montrés ici.

Les dérivés fluorescents de l'Ang II couplés à la Cyanine 3 ou celui couplé à la TAMRA ont une spécificité pour les récepteurs AT_1 et pour les récepteurs AT_2 similaire pour une concentration donnée. La liaison envers les récepteurs AT_2 semble plus important alors que l'Ang II est décrite comme ayant une affinité similaire pour ses deux types de récepteurs. Ceci peut s'expliquer par une quantité plus importante de récepteurs AT_2 à la membrane plasmique.

A des concentrations plus importantes de ligands fluorescents la liaison non spécifique sur les cellules contrôles HEK 293 masque la liaison spécifique des ligands aux récepteurs AT_1 et AT_2 observée précédemment. Ainsi les résultats présentés se cantonnent à des concentrations déterminées où la liaison spécifique est mesurable. Nous n'avons pas pu réaliser une courbe complète de liaison afin de déterminer les affinités de ces ligands fluorescents.

Les dérivés fluorescents de TRV027

Les cellules contrôles HEK 293 ont un marquage à la Cy3 de l'ordre de 6% lorsque les cellules sont incubées 15 minutes avec 100nM de Cy3-TRV027 (**Figure 27 G**). A cette même concentration de Cy3-TRV027, la population cellulaire des HEK 293 surexprimant les récepteurs Flag-AT_1 est marquée à 2,8% par la Cy3 (**Figure 27 H**) et la population cellulaire des HEK 293 surexprimant les récepteurs GFP-AT_2 a un marquage à la Cy3 de 79% (**Figure 27 I**). Le pourcentage de cellules marquées à la Cy3 dans la population de cellules surexprimant AT_1 est similaire au pourcentage de la liaison non spécifique, ainsi ce ligand TRV027 à 100nM n'est pas spécifique des récepteurs AT_1.

Le traceur Cy3-TRV027 est donc sélectif pour les récepteurs AT_2 par rapport aux récepteurs AT_1. Le peptide TRV027 est décrit comme ayant une affinité de l'ordre du nanomolaire pour AT_1 et AT_2. L'ajout du fluorophore a donc modifié la spécificité de ce peptide qui ne se fixe pas aux récepteurs AT_1 lorsqu'il est utilisé jusqu'à une concentration de 100nM. Il est possible qu'à plus fortes concentrations nous retrouvions la spécificité du TRV027 natif mais les limites de détection de cette technique ne nous permettent pas de l'assurer.

De manière inattendue, nous obtenons ainsi pour la première fois un traceur fluorescent sélectif des récepteurs AT_2 par rapport aux récepteurs AT_1.

Le dérivé fluorescent de Losartan

Les cellules contrôles HEK 293 ont un marquage à la Cy3 de l'ordre de 37% lorsque les cellules sont incubées 15 minutes avec 30nM de Losartan-Cy3 (**Figure 27 J**). A cette même concentration de ligand fluorescent, la population cellulaire des HEK 293 surexprimant les récepteurs Flag-AT_1 est marquée à 76% par la Cy3 (**Figure 27 K**) et la population cellulaire des HEK 293 surexprimant les récepteurs GFP-AT_2 a un marquage à la Cy3 de 10% (**Figure 27 L**). Le pourcentage de cellules marquées à la Cy3 dans la population de cellules surexprimant AT_2 est similaire au pourcentage de la liaison non spécifique, ainsi le Losartan-Cy3 à 30nM n'est pas spécifique des récepteurs AT_2.

Le Losartan-Cy3 a une spécificité et sélectivité pour les récepteurs AT_1 par rapport aux récepteurs AT_2, tout comme le Losartan natif. Ce traceur fluorescent montre une spécificité importante dès les concentrations plus faibles (30nM). Ceci pourrait illustrer une affinité pour les récepteurs AT_1 plus importante comparé aux peptides fluorescents précédents.

Pour la première fois, nous décrivons un traceur fluorescent sélectif des récepteurs AT_1 par rapport aux récepteurs AT_2.

Cette première étude de sélectivité nous a permis de constater que les nouveaux traceurs fluorescents peuvent se lier aux récepteurs AT_1 et/ou AT_2, avec un ligand sélectif pour les récepteurs AT_1 par rapport à AT_2 et un autre ligand sélectif pour les récepteurs AT_2 par rapport aux récepteurs AT_1.

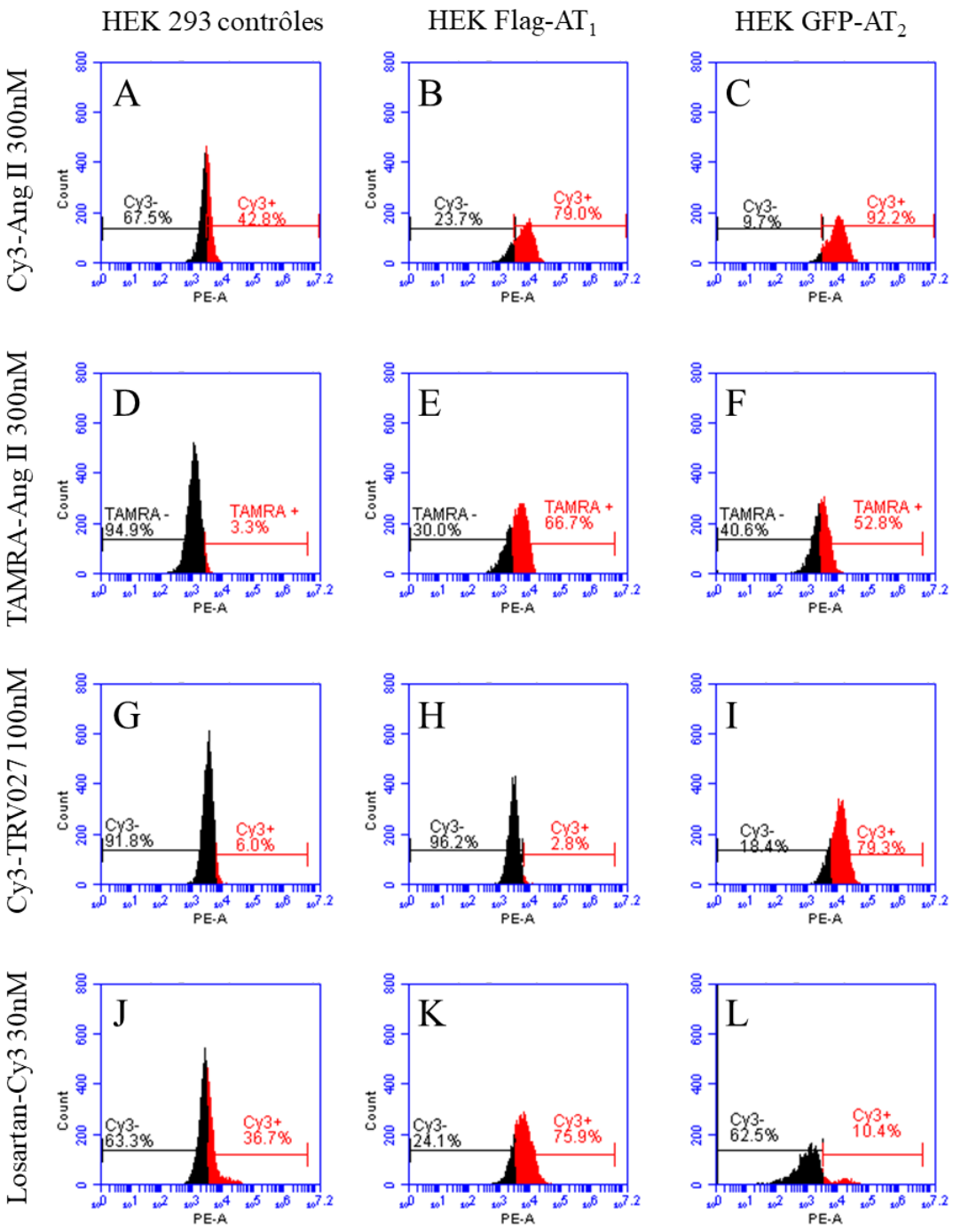


Figure 27 : Liaison des nouveaux ligands fluorescents sur cellules surexprimant ou non les récepteurs AT_1 ou AT_2. Mesure du marquage à la surface des cellules de la Cyanine 3 ou de la TAMRA par cytométrie en flux sur une population de cellules HEK 293 (A/D/G/J), une population de cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs Flag-AT_1 (B/E/H/K) et une population surexprimant les récepteurs GFP-AT_2 (C/F/I/L). Les cellules sont traitées pendant 15 minutes avec 300 nM de Cy3-Ang II (A/B/C), 300nM de TAMRA-Ang II (D/E/F), 100nM de Cy3-TRV027 (G/H/I) ou 30nM de Losartan-Cy3 (J/K/L) puis rincées avant lecture au cytomètre. Les cellules marquées dans le canal PE-A, mesurant la Cy3 et la TAMRA, apparaissent en rouge et les non marquées en noir. Les résultats sont représentatifs de n = 3 expériences distinctes. (Kaluza 2.2.1)

III. Etude fonctionnelle des ligands fluorescents sur AT_1

1. Analyse de la voie G_q par mesure de la réponse calcique et du recrutement de la protéine G_q

a. Les dérivés fluorescents de l'Ang II et de TRV027

Des tests de réponse fonctionnelle permettant de mesurer la réponse calcique intracellulaire induite par la liaison des différents ligands fluorescents aux récepteurs AT_1 surexprimés dans les cellules ont été réalisés (**Figure 28 A et C**).

La signalisation des ligands fluorescents a été étudiée par l'intermédiaire du BRET dont le principe a été expliqué précédemment. Par cette méthode de transfert d'énergie, les interactions entre les récepteurs AT_1 et les différentes protéines G sont déterminées (**Figure 28 B et D**).

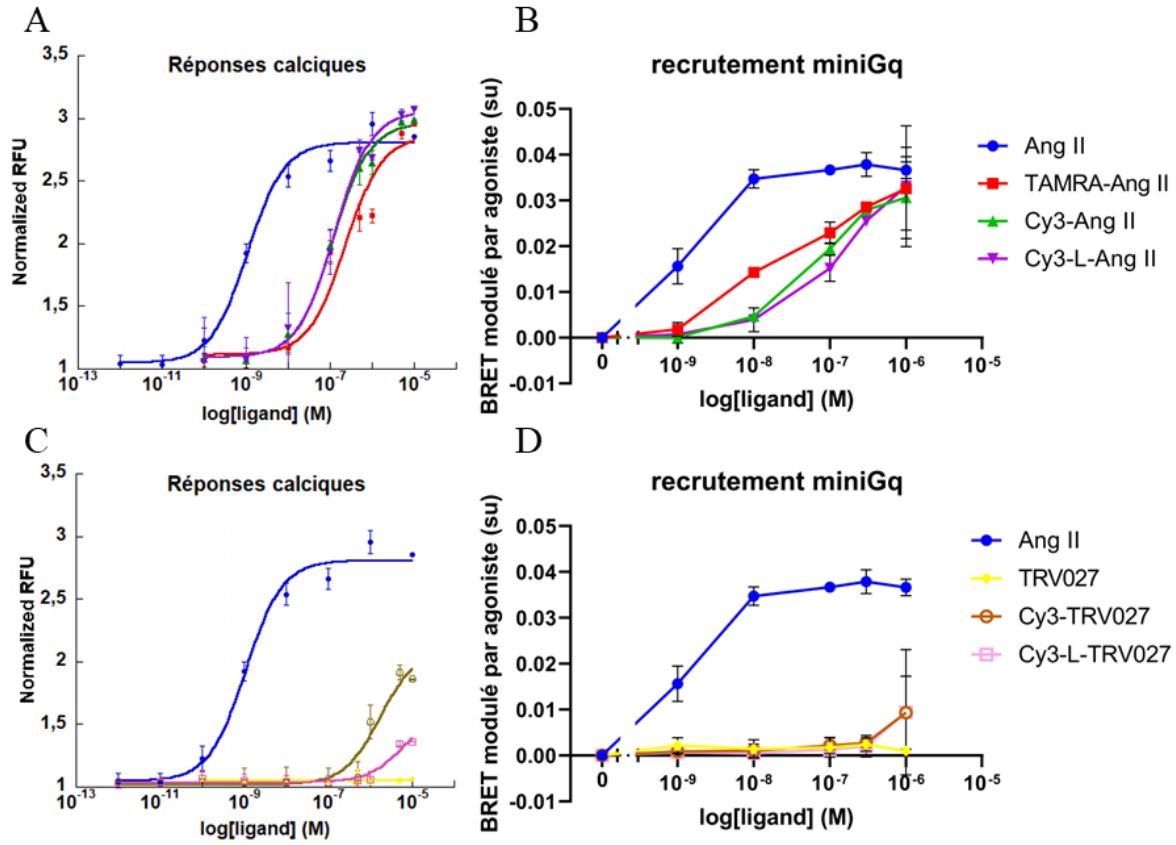


Figure 28 : Effets des nouveaux ligands fluorescents sur la voie G_q de cellules surexprimant les récepteurs AT_1. (A/C) Courbes de réponse calcique mesurées dans les cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_1 activés par (A) Ang II et ses dérivés fluorescents ou (C) TRV027 et ses dérivés fluorescents. Les graphiques sont représentatifs de n = 7 (Ang II), n = 4 (Cy3-Ang II) ou n = 3 expériences distinctes avec un duplicat. Chaque point de données représente les valeurs moyennes ± SEM (KaleidaGraph 4.0). (B/D) Courbes dose/réponse de recrutement des protéines par le récepteur AT_1 mesurées dans des cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire AT1R-NanoLuc et Venus-miniGq. Les récepteurs AT_1 ont été activés par (B) Ang II et ses dérivés fluorescents ou (D) TRV027 et ses dérivés fluorescents. Les graphiques sont représentatifs de n = 4 expériences distinctes avec un duplicat. Chaque point de données représente les valeurs moyennes ± SEM (Graphpad Prism 8.0.2).

Tableau 11 : Valeurs d'EC_{50} des dérivés fluorescents d'Ang II et de TRV027 déterminés par la mesure de la réponse calcique

Composé	EC_{50} (M)	n
Ang II	$1,1 \pm 0,2 \times 10^{-9}$	7
TAMRA-Ang II	$2,3 \pm 1 \times 10^{-7}$	3
Cy3-Ang II	$1,2 \pm 0,2 \times 10^{-7}$	4
Cy3-L-Ang II	$1,3 \pm 0,3 \times 10^{-7}$	3
TRV027	Indéterminé	3
Cy3-TRV027	Indéterminé	3
Cy3-L-TRV027	Indéterminé	3

Les nouveaux ligands fluorescents, basés sur l'Ang II, stimulent de manière dose dépendante la réponse calcique *via* les récepteur AT_1 avec une EC_{50} avoisinant les 100nM. Cependant, les valeurs d'EC_{50} sont supérieures à celles de l'Ang II qui est de 1nM (**Tableau 11**). De plus, l'EC_{50} des ligands fluorescents pour les récepteurs AT_1 est similaire avec les deux fluorophores différents testés. Bien que la TAMRA-Ang II donne un bruit de fond moins important dans les expériences de liaison par cytométrie en flux, elle a une EC_{50} similaire à la sonde couplée à la Cyanine 3. Il est possible que le greffage à l'extrémité N-terminale du fluorophore à l'Ang II ne permette pas une liaison optimale dans la poche de liaison du récepteur, cependant ces ligands sont bien des agonistes complets pour les récepteurs AT_1 avec une efficacité E_{max} similaire à l'Ang II.

L'activation de la voie calcique induite par les protéines G_q a aussi été vérifiée par le recrutement direct de la protéine G_q au récepteur AT_1 de manière dose dépendante par des mesures de BRET. Une augmentation dose dépendante du signal BRET est observée lors du recrutement des protéines G_q après activation des récepteurs AT_1 par l'Ang II (**Figure 28 B** courbe bleue).

Après activation des récepteurs AT_1 par les ligands fluorescents basés sur l'Ang II, une augmentation du signal BRET de manière dose dépendante est observée (**Figure 28 B**). Il est intéressant de noter le même décalage vers la droite des courbes dose/réponse des ligands fluorescents par rapport à la courbe d'Ang II, montrant de nouveau une augmentation d'EC_{50} pour le récepteur après greffage du fluorophore. Les EC_{50} sont comparables à celles obtenues en mesurant la réponse calcique.

Le TRV027 synthétisé par Melissa Colin, Mathilde Achard et le Dr. Samir Acherar du LCPM, n'induit pas de réponse calcique ni de recrutement de la protéine G_q (**Figure 28 C et D**, courbe jaune). Cette observation était attendue car il s'agit d'un agoniste AT_1 biaisé vers la voie des β-arrestines. Les nouveaux ligands fluorescents basés sur le TRV027, n'induisent pas de réponse calcique car ils n'activent pas la voie de la protéine G_q responsable de cette réponse, sauf aux fortes concentrations de ligands, à partir de 1µM. A ces fortes concentrations, une augmentation du calcium intracellulaire est

observée en parallèle du recrutement des protéines G_q, illustrant une perte du caractère biaisé du peptide. Cette augmentation de calcium est bien dépendante des récepteurs AT_1 car avec un prétraitement des cellules avec un excès de Losartan cette augmentation n'est plus observée (**Figure 29**). Les peptides fluorescents Cy3-TRV027 et Cy3-L-TRV027, à partir de 1µM induisent la signalisation des protéines G_q, mais cette liaison n'était pas visible avec les données de cytométrie en flux dont la limite de détection est plus basse que la liaison spécifique à AT_1 (300nM).

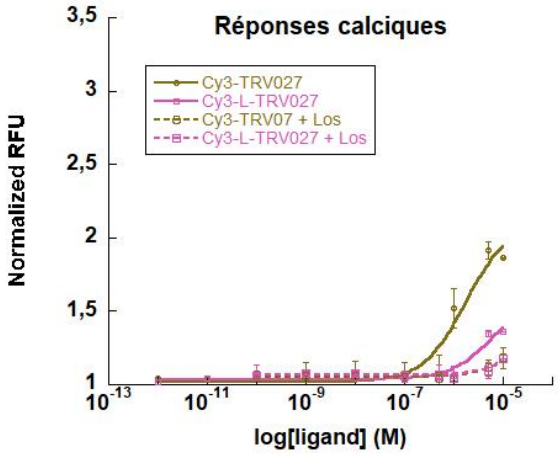


Figure 29 : Effets des nouveaux dérivés fluorescents basés sur le TRV027 sur la voie G_q de cellules surexprimant les récepteurs AT_1. Courbes de réponse calcique mesurées dans les cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_1 activés par les sondes agonistes biaisées après prétraitement des cellules au tampon (courbes pleines) ou au Losartan 10^{-5}M (courbes en pointillés). Les graphiques sont représentatifs de n = 3 expériences distinctes avec un duplicat. Chaque point de données représente les valeurs moyennes ± SEM (KaleidaGraph 4.0).

Les nouveaux traceurs fluorescents basés sur le TRV027 sont donc sélectifs des récepteurs AT_2 par rapport aux récepteurs AT_1 sauf à des concentrations de l'ordre du micromolaire où ils perdent leur biais β-arrestine sur AT_1 et activent la voie G_q. La signalisation G_q des récepteurs AT_1 après activation par les dérivés fluorescents d'Ang II est bien induite.

Cependant, les autres miniG testées, à savoir G_i, $G_{12/13}$ et G_s, n'ont pas été recrutées à la membrane lorsque le récepteur est activé par l'Ang II alors qu'il est connu que le récepteur AT_1 induit une signalisation à travers ces protéines G_i et $G_{12/13}$ (**Figure 30**). D'autres analyses ont été réalisées en utilisant cette fois ci les minniG testées couplées au donneur NanoLuc avec l'accepteur correspondant au Venus-MP en excès à la surface interne de la membrane plasmique. Aucune fluorescence illustrant le transfert d'énergie entre donneur et accepteur n'a été observée. L'éventuel recrutement de ces miniG par les récepteurs AT_1 activés par l'Ang II, retrouvé dans certains articles de la littérature, n'est donc pas visible ici (Wan *et al*., 2018). Cela dépend peut-être de la sensibilité de la technique ou du fait que l'on ne travaille pas sur les protéines entières. Il ne sera donc pas possible de conclure sur le recrutement de ces deux dernières miniG avec les autres sondes testées.

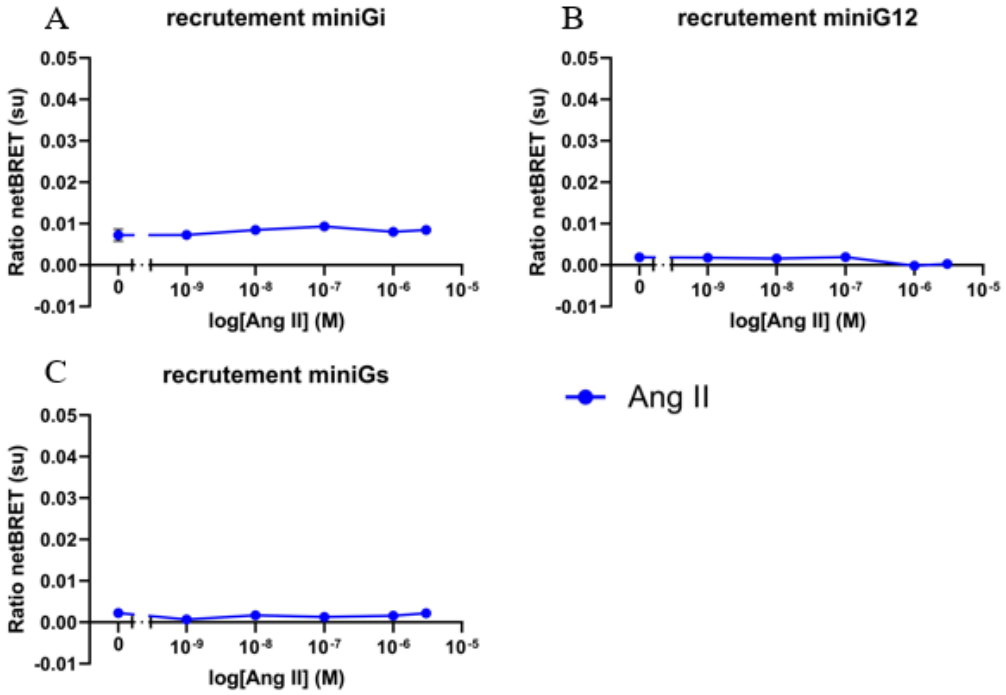


Figure 30 : Courbes de recrutement des différents effecteurs du récepteur AT_1 après activation par l'Ang II de cellules surexprimant les récepteurs AT_1. Courbes dose/réponse de recrutement des protéines par le récepteur AT_1 mesurées dans des cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire NanoLuc-AT1R et (A) Venus-miniGi, (B) Venus-miniG12 ou (C) Venus-miniGs. Les récepteurs AT_1 ont été activés par l'Ang II. Les graphiques représentés sont représentatifs de n = 2 expériences distinctes, avec un duplicat. Chaque point de données représente les valeurs moyennes ± SEM (Graphpad Prism 8.0.2).

b. Le dérivé fluorescent de Losartan

La puissance antagoniste (pA2) et la constante d'inhibition (Ki) du Losartan-Cy3 ont été obtenues par l'intermédiaire de la mesure de réponses calciques cellulaires suite à l'activation des récepteurs AT_1 par l'Ang II après un prétraitement des cellules au Losartan ou Losartan-Cy3 à différentes concentrations pendant 30 minutes (**Figure 31 A et B**). A chaque augmentation de la concentration d'antagoniste Losartan non fluorescent et fluorescent, un décalage vers la droite de la courbe effet-concentration de l'Ang II est observé. Le Losartan-Cy3 conserve bien le caractère antagoniste du Losartan natif envers les récepteurs AT_1, avec un pA2 et un K_i similaires (**Tableau 12**) mais deux phases distinctes sont observables pour ce dérivé fluorescent de Losartan contrairement au Losartan. En effet, le déplacement de la courbe vers la droite est plus faible pour les cellules prétraitées au Losartan-Cy3 comparées à celles prétraitées au Losartan jusqu'à 100nM. De plus, l'E_{max} ne diminue pas au fur et à mesure avec un prétraitement avec du Losartan-Cy3 alors que c'est le cas avec le Losartan. Cependant, à une concentration de Losartan-Cy3 plus élevée, une abolition de la réponse calcique est observée alors que la libération calcique est encore présente pour les cellules prétraitées au Losartan. Le Losartan-Cy3 a un effet beaucoup plus fort que le Losartan à partir de 1µM.

Le Losartan-Cy3 est bien sélectif de ces récepteurs par rapport aux récepteurs AT_2 avec une puissance antagoniste et une constante d'inhibition similaires malgré les différences de phases décrites précédemment.

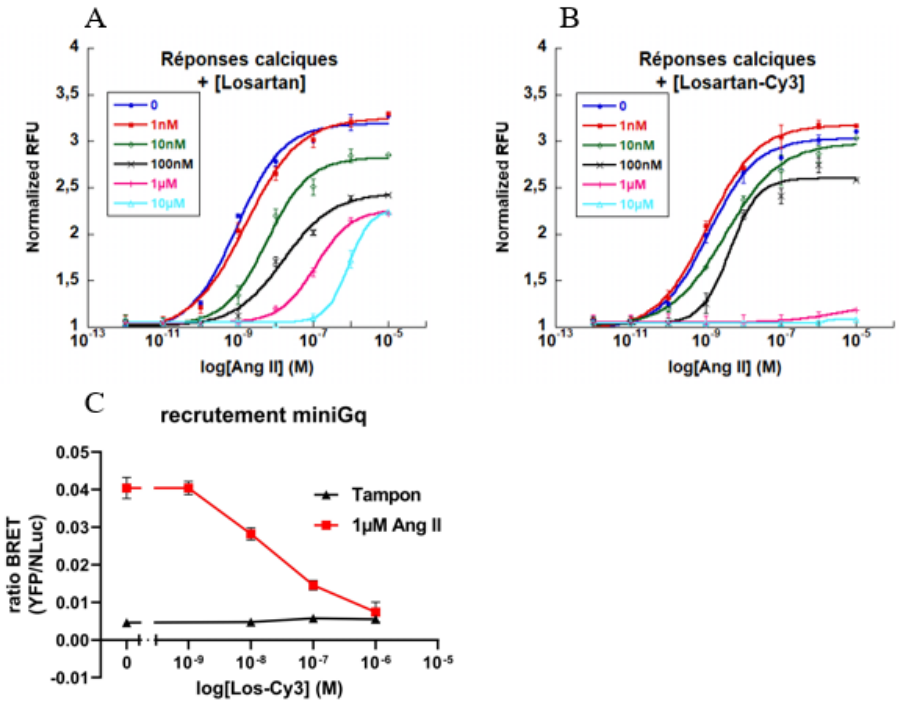


Figure 31 : Effets du dérivé fluorescent de Losartan sur la voie G_q de cellules surexprimant les récepteurs AT_1. (A/B) Courbes de réponse calcique mesurées dans les cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_1 activés par l'Ang II (A) en présence de Losartan et (B) en présence de Losartan-Cy3. Les graphiques sont représentatifs de n = 3 expériences distinctes. Chaque point de données représente les valeurs moyennes ± SEM (KaleidaGraph 4.0). (C) Courbe dose/réponse de recrutement des protéines G_q par le récepteur AT_1 mesurée dans des cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire AT1R-NanoLuc et Venus-miniGq. Les récepteurs AT_1 prétraitées pendant 30 minutes avec du Losartan-Cy3 ont été activés ou non par 1µM d'Ang II. Le graphique est représentatif de n = 2 expériences distinctes avec un duplicat pour chaque condition. Chaque point de données représente les valeurs moyennes ± SEM (Graphpad Prism 8.0.2).

Tableau 12 : Valeurs de pA2 et de Ki du dérivé fluorescent Losartan-Cy3

Composé	pA2	Ki (M)	n
Losartan	8,806	$1{,}56 \times 10^{-9}$	3
Losartan-Cy3	8,531	$2{,}95 \times 10^{-9}$	4

Le Losartan-Cy3 conserve bien son caractère antagoniste de la voie des protéines G_q des récepteurs AT_1. En effet, une diminution du signal BRET entre le récepteur AT1-Nluc et Venus-miniGq est observée lorsque la concentration de Losartan-Cy3, utilisée pour prétraiter les cellules, augmente (**Figure 31 C**). Cela illustre l'inhibition du recrutement des protéines G_q par les récepteurs AT_1 activés par 1µM d'Ang II. Ainsi, en plus de la puissance antagoniste similaire au Losartan, le Losartan-Cy3 est un antagoniste de la signalisation G_q des récepteurs AT_1. Il reste à confirmer qu'il s'agisse bien d'un antagoniste bloquant les récepteurs AT_1 en étudiant la voie de signalisation des β-arrestines par l'intermédiaire du recrutement des β-arrestines 1 et β-arrestines 2 et de l'internalisation des récepteurs consécutive de cette voie.

2. Analyse de la voie β-arrestine par mesure du recrutement des β-arrestines 1 et 2 et mesure de l'internalisation des récepteurs AT_1

c. Les dérivés fluorescents de l'Ang II et de TRV027

La signalisation β-arrestine du récepteur AT_1 activé par les ligands fluorescents a été étudiée par l'intermédiaire du BRET. Les interactions des β-arrestines 1 et β-arrestines 2 avec les récepteurs AT_1 sont suivies sur le même principe que pour les protéines G. L'étude de l'internalisation des récepteurs AT_1 suite à leur activation par ces ligands fluorescents suit le principe du BRET de collision expliqué précédemment.

Une augmentation du signal BRET est observée lors du recrutement des β-arrestines 1 et 2 après activation des récepteurs AT_1 par l'Ang II (**Figure 32 A et C**, courbe bleue) de manière dose dépendante. Après activation des récepteurs AT_1 par les dérivés fluorescents basés sur l'Ang II, une augmentation du signal BRET est mesurée illustrant également le recrutement des β-arrestines 1 (**Figure 32 A**) et des β-arrestines 2 (**Figure 32 C**). Nous observons un décalage vers la droite des courbes dose/réponse pour les dérivés fluorescents illustrant de nouveau une augmentation d'EC_{50} des ligands fluorescents dérivés de l'Ang II pour le récepteur AT_1.

Le TRV027 permet le recrutement des deux types de β-arrestines en se liant aux récepteurs AT_1 (**Figure 32 B et D**, courbe jaune). Nous constatons de nouveau que le TRV027 est un agoniste partiel des récepteurs AT_1 avec un maximum de BRET de recrutement des β-arrestines induit par le TRV027 plus faible que pour l'Ang II. En ajoutant le fluorophore au TRV027, le recrutement des différentes protéines est décalé vers la droite. En effet, le recrutement des β-arrestines est observé uniquement aux plus fortes concentrations de TRV027 fluorescent. Il semblerait qu'il y ait le même décalage vers la droite des courbes dose/réponse des ligands fluorescents basés sur le TRV027 que des ligands fluorescents basés sur l'Ang II, illustrant la même perte d'affinité lorsque les fluorophores sont ajoutés. Ainsi les dérivés fluorescents de TRV027 perdent le biais de signalisation du TRV027 en induisant la voie des protéines G_q et la voie des β-arrestines des récepteurs AT_1 à des concentrations de l'ordre du micromolaire.

Le BRET de collision permet, ici, de mesurer les récepteurs AT_1 présents à la membrane plasmique et de détecter leur internalisation suite à leur activation du fait de la proximité ou de l'éloignement entre le récepteur AT1-NanoLuc donneur d'énergie internalisé et le traceur fluorescent accepteur d'énergie tapissant la face interne de la membrane plasmique.

De ce fait, une diminution du signal BRET est observée lorsque les récepteurs AT_1 sont activés par l'Ang II et internalisés, jusqu'à atteindre un plateau à partir de 10nM (**Figure 32 E**, courbe bleue). Lorsque les récepteurs AT_1 sont activés par les dérivés fluorescents de l'Ang II, une diminution du signal BRET est également constatée à partir de 100nM de ligands, illustrant l'internalisation des récepteurs AT_1. Un décalage vers la droite des courbes dose/réponse des dérivés fluorescents de l'Ang II comparées à celle de l'Ang II est détecté dans ces expériences.

Le TRV027 permet l'internalisation des récepteurs AT_1 (**Figure 32 F**) mais avec une efficacité plus faible qu'avec l'Ang II. Nous constatons que le TRV027 est un agoniste partiel de la voie β-arrestine des récepteurs AT_1. L'ajout du fluorophore Cy3 au TRV027 le rend moins puissant. Un signal BRET d'internalisation est détecté à la concentration de 1µM. Le TRV027 est donc confirmé comme ligand biaisé β-arrestines des récepteurs AT_1. Les dérivés fluorescents de TRV027 perdent leur capacité d'être un ligand biaisé strict.

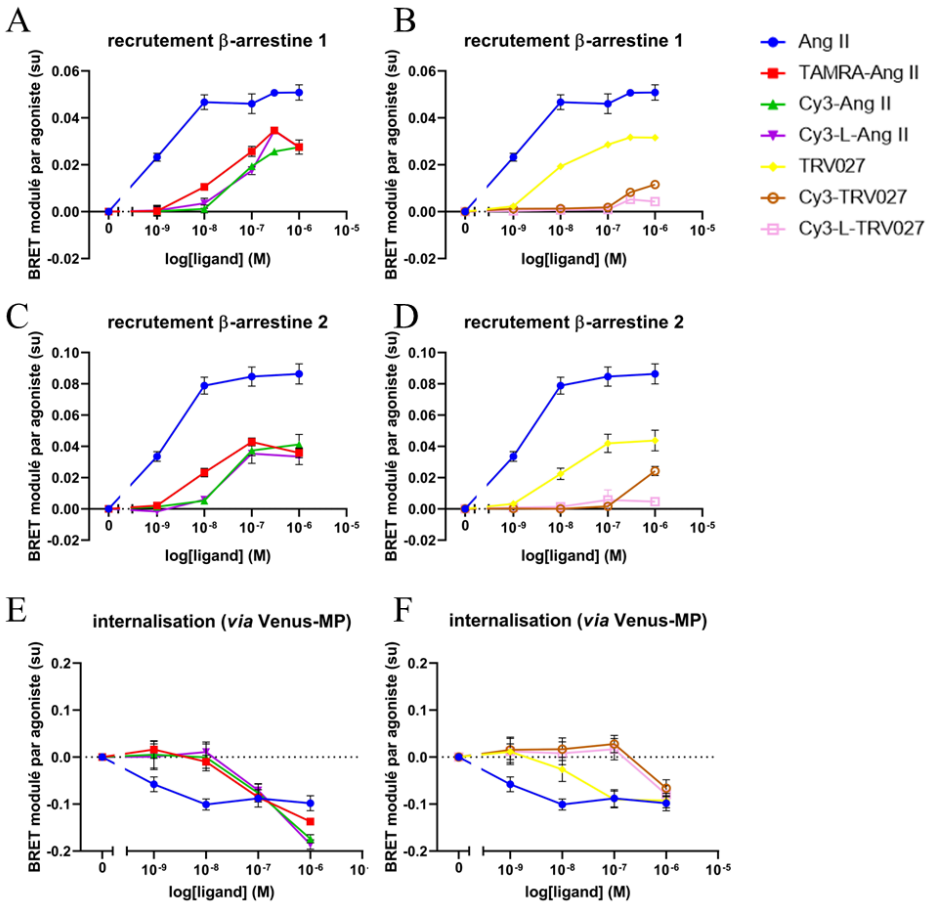


Figure 32 : Effets des nouveaux ligands fluorescents sur la voie β-arrestine et l'internalisation de cellules surexprimant les récepteurs AT_1. Courbes dose/réponse de recrutement des protéines par le récepteur AT_1 mesurées dans des cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire AT1R-NanoLuc et (A/B) YPET-ARRB1, (C/D) YPET-ARRB2 ou (E/F) Venus-MP. Les récepteurs AT_1 ont été activés par (A/C/E) des dérivés fluorescents de l'Ang II ou (B/D/F) des dérivés fluorescents de TRV027. Les graphiques sont représentatifs de n = 4 expériences distinctes avec un duplicat pour chaque condition. Chaque point de données représente les valeurs moyennes ± SEM (Graphpad Prism 8.0.2).

Les mesures de BRET ont été limitées en termes de concentration car aux plus fortes concentrations de ligands fluorescents, une diminution de la fluorescence est observée, due à un artefact de la Cyanine 3 qui induit un photoblanchiment (appelé également « quenching ») de l'accepteur de fluorescence dans les mesures. En mesurant directement la fluorescence de l'accepteur après une excitation directe, une diminution de la fluorescence est observée, illustrant ce phénomène de photoblanchiment. De ce fait, au-delà de 1µM, tous les ligands fluorescents fusionnés aux fluorophores TAMRA ou Cy3 ont montré une baisse du signal BRET mesuré car l'accepteur émet moins de fluorescence. Les efficacités maximales et EC_{50} du signal BRET des courbes dose/réponse du recrutement des β-arrestines et protéines G et de l'internalisation des récepteurs ne peuvent pas être calculées. Cependant les EC_{50} observées entre les différentes courbes dose/réponse, du recrutement β-arrestines, du recrutement G_q, de la libération calcique et de l'internalisation des récepteurs AT_1, semblent similaires. La signalisation et l'internalisation des récepteurs AT_1 après activation par les différents dérivés fluorescents est bien observée.

d. Le dérivé fluorescent de Losartan

Le Losartan-Cy3 conserve bien son caractère antagoniste des récepteurs AT_1. En effet, une diminution du signal BRET, entre les récepteurs AT1-Nluc donneurs d'énergie et les β-arrestines 2-YPET accepteurs d'énergie, est observée lorsque la concentration de Losartan-Cy3, utilisée pour prétraiter les cellules, augmente (**Figure 33 A**). Lorsque les cellules sont prétraitées à 1nM de Losartan-Cy3 avant l'activation des récepteurs AT_1 avec 1µM d'Ang II, le signal BRET mesuré est similaire à celui des cellules non traitées activées par l'Ang II. A de plus fortes concentrations de Losartan-Cy3 en prétraitement, le signal BRET diminue, illustrant l'inhibition du recrutement des β-arrestines 2 par les récepteurs AT_1 activés par 1µM d'Ang II. Ainsi, en plus de la puissance antagoniste et de la constante d'inhibition similaires au Losartan, le comportement du Losartan-Cy3 est semblable en inhibant non seulement la voie G_q mais aussi la voie β-arrestine des récepteurs AT_1.

Pour l'étude de l'internalisation, le signal BRET mesuré augmente lorsque la concentration de Losartan-Cy3, utilisé pour prétraiter les cellules, augmente (**Figure 33 B**). Cela illustre l'augmentation de la quantité de récepteurs AT_1 à la surface de la membrane plasmique. Le Losartan-Cy3 a un effet chaperon pharmacologique (René *et al.*, 2021), aidant au repliement des récepteurs AT_1 pour retrouver leur structure native, qui seront retrouvés à la surface de la membrane, d'où l'augmentation du signal BRET sans activation des récepteurs par de l'Ang II, jusqu'à atteindre un plateau à partir de 10nM de Losartan-Cy3 (**Figure 33 B**, courbe noire). Enfin, nous retrouvons la même augmentation de signal BRET lorsque les cellules prétraitées au Losatran-Cy3 sont activées par 1µM d'Ang II (**Figure 33 B**, courbe verte). Cependant, à partir de 100nM de Losartan-Cy3, le signal BRET continue d'augmenter illustrant qu'en plus de l'effet chaperon du Losartan-Cy3 s'ajoute l'effet d'inhibition de l'internalisation des récepteurs AT_1 qui resteront à la surface et ne seront pas activés par l'Ang II et internalisés.

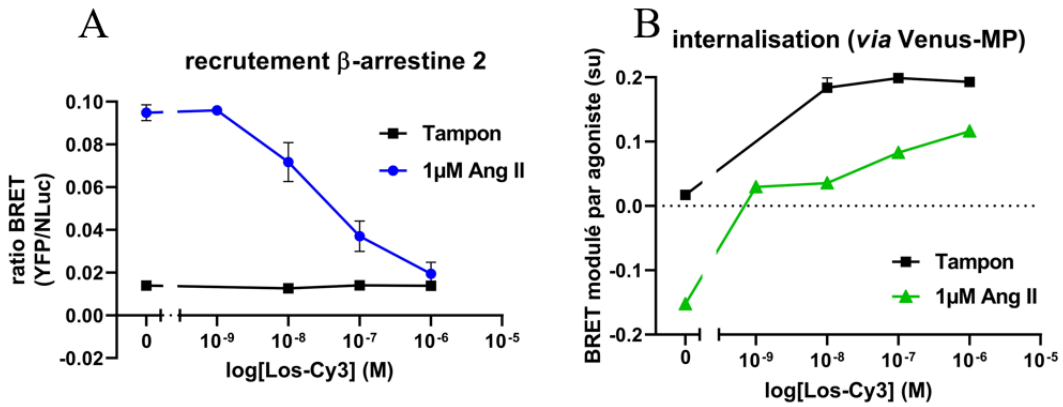


Figure 33 : Effets du dérivé fluorescent de Losartan sur la voie β-arrestine et l'internalisation de cellules surexprimant les récepteurs AT_1. Courbe effet/dose du signal BRET entre AT1R-NanoLuc et (A) YPET-ARRB2 ou (B) Venus-MP mesuré dans les cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire ces protéines de fusion. Les récepteurs AT_1 prétraitées pendant 30 minutes avec des concentrations croissantes de Losartan-Cy3 ou du tampon ont été activés ou non par 1µM d'Ang II. Le graphique est représentatif de n = 2 expériences distinctes, avec un duplicat pour chaque condition. Chaque point de données représente les valeurs moyennes ± SEM (Graphpad Prism 8.0.2).

Pour finir, les ligands fluorescents ont été testés comme traceurs de localisation subcellulaire des récepteurs AT_1 et AT_2.

3. Localisation subcellulaire des récepteurs AT_1 et AT_2 activés par les ligands fluorescents

Les expériences de localisation subcellulaire par l'intermédiaire de la microscopie en épifluorescence ont été réalisées sur des cellules HEK 293 surexprimant le récepteur GFP-AT_1 ou le récepteur GFP-AT_2 de manière stable.

Les récepteurs AT_1 et les récepteurs AT_2, détectés par la fluorescence directe de la GFP, sont localisés à la membrane plasmique avec également un marquage non négligeable dans les cellules en absence d'activation (**Figure 34**, première ligne). La localisation dans le cytoplasme reflète sans doute une portion de récepteurs dans la voie d'exocytose en route vers la membrane plasmique.

Après leur activation par 30nM d'Ang II pendant 30 minutes, une nette diminution de la fluorescence GFP des récepteurs AT_1 est observée à la membrane plasmique en parallèle d'une augmentation de fluorescence dans le cytoplasme dans des vésicules endosomales (**Figure 34**, deuxième ligne). Les récepteurs AT_2 restent à la membrane plasmique. En effet les récepteurs AT_2 sont décrits comme n'internalisant pas (Johnstone *et al.*, 2022). Dans le canal rouge, il n'y a pas de signal de fluorescence détecté.

Les ligands Cy3-Ang II ont été utilisés à une concentration de 300nM pendant 30 minutes. On retrouve un marquage rouge de ces ligands, colocalisés au niveau des récepteurs internalisés dans les endosomes dans le cas des récepteurs AT_1. Le signal GFP des récepteurs AT_2 persiste à la membrane plasmique où le signal de la Cy3-Ang II colocalise également.

Les ligands fluorescents TAMRA-Ang II, utilisés à 300nM pendant 30 minutes, ont un marquage rouge dans le cytoplasme, au niveau des endosomes où les récepteurs AT_1 sont localisés. Le marquage rouge de TAMRA-Ang II est situé à la membrane plasmique où l'on retrouve les récepteurs AT_2.

A la surface, le fluorophore Cy3 semble plus fort que le fluorophore TAMRA car le marquage du ligand Cy3-Ang II est plus fort que celui de TAMRA-Ang II en colocalisation avec les récepteurs AT_2. Inversement, dans les endosomes la TAMRA semble plus forte que la Cy3 et donne moins de bruit de fond. Cependant la colocalisation du marquage TAMRA avec le marquage GFP des récepteurs AT_1 est moins bonne qu'avec le marquage Cy3.

Le Losartan-Cy3, utilisé à 10nM pendant 30 minutes, a un marquage rouge dans le cytoplasme en parallèle d'une augmentation du marquage à la membrane plasmique, colocalisé avec les récepteurs GFP-AT_1 (**Figure 34**). Le marquage rouge retrouvé dans les cellules montre que le Losartan-Cy3 pénètre dans les cellules. L'augmentation de fluorescence à la membrane plasmique de la GFP et de la Cy3 montre une augmentation du nombre de récepteurs GFP-AT_1 à la membrane due à l'effet de chaperon pharmacologique du Losartan-Cy3. Un très faible marquage rouge résiduel de la Cyanine 3 est retrouvé dans les cellules surexprimant GFP-AT_2 après 30 minutes d'exposition à 30nM de Losartan-Cy3. Ce faible bruit de fond peut être dû au Losartan-Cy3 qui pénètre dans les cellules. Hormis ce bruit de fond résiduel, aucun marquage rouge n'est observé. Les récepteurs GFP-AT_2 sont localisés à la membrane plasmique. Le losartan-Cy3 ne se lie pas aux récepteurs AT_2 et se lie sélectivement aux récepteurs AT_1. Cela confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. La colocalisation des récepteurs GFP-AT_1 avec le Losartan-Cy3 atteste que ce ligand fluorescent est un bon traceur des récepteurs AT_1.

Après leur activation par 100nM de TRV027 pendant 30 minutes, une diminution de la fluorescence GFP des récepteurs AT_1 est observée à la membrane plasmique avec une augmentation de fluorescence dans le cytoplasme, illustrant l'internalisation des récepteurs dans les vésicules endocytaires (**Figure 34**). Les récepteurs AT_2 restent à la membrane plasmique. Dans le canal rouge, il n'y a pas de signal de fluorescence détecté. Le Cy3-TRV027 utilisé à 100nM pendant 30 minutes semble pénétrer dans les cellules, où l'on retrouve un marquage rouge pour les deux types cellulaires. Cependant, ce ligand se colocalise bien avec le récepteur AT_2 au niveau de la membrane plasmique avec une intensité de signal Cy3 similaire aux ligands fluorescents dérivés de l'Ang II. Sa colocalisation avec le récepteur AT_1 est rare, en accord avec la sélectivité du Cy3-TRV027 pour le récepteur AT_2 à cette concentration. Les récepteurs AT_1 sont retrouvés à la membrane plasmique et au niveau intracellulaire tandis que des traces du ligand sont retrouvées uniquement au niveau intracellulaire. Avec la présence du linker, aucune colocalisation du ligand Cy3-L-TRV027 avec les récepteurs AT_1 ou AT_2 n'a été trouvée. Parallèlement à la diminution du marquage du récepteur AT_2 observée en cytométrie en flux, cela suggère que seul le Cy3-TRV027 sera un bon traceur du récepteur AT_2.

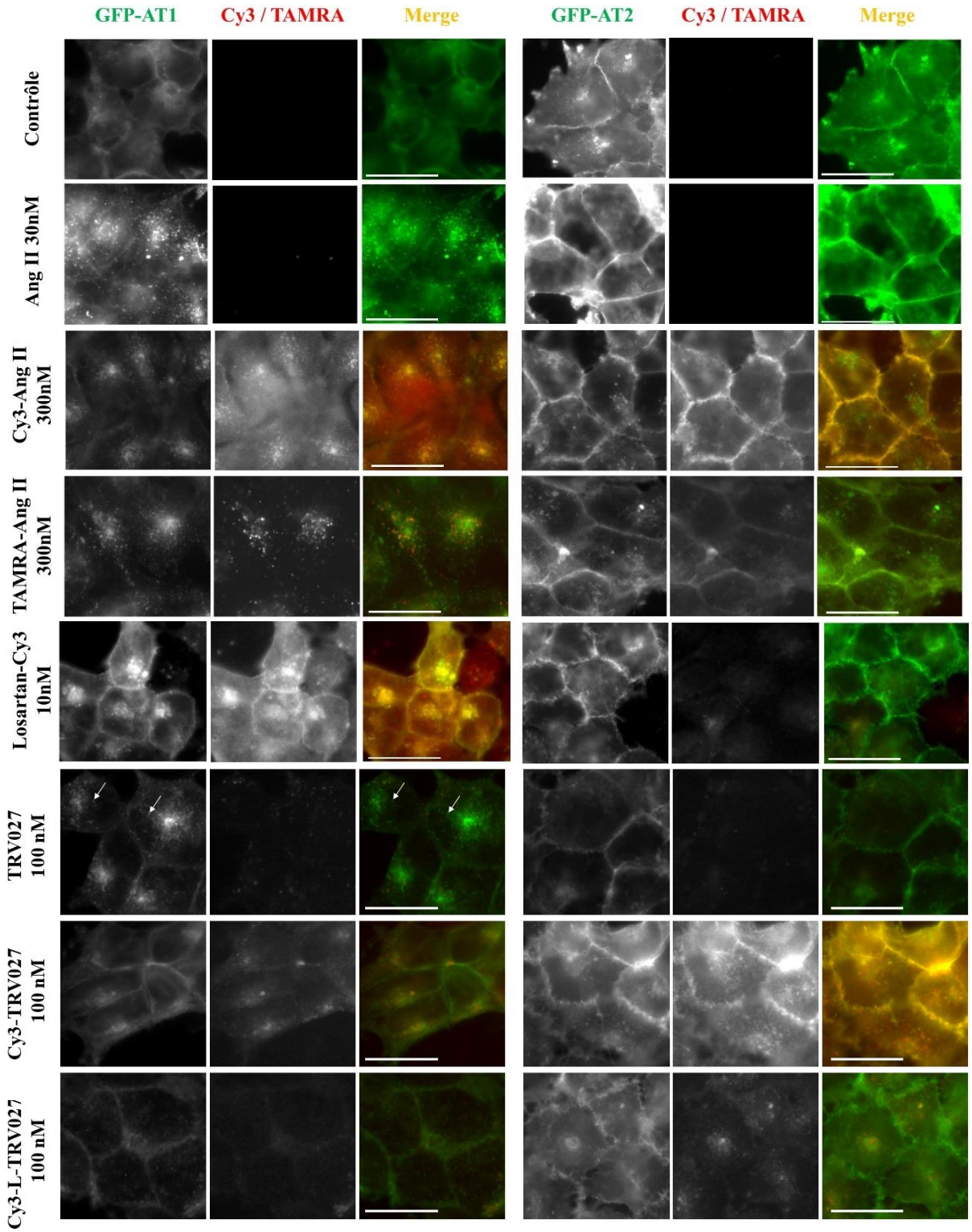


Figure 34 : Images de microscopie en épifluorescence représentatives des nouveaux ligands fluorescents se liant aux récepteurs GFP-AT$_1$ ou GFP-AT$_2$. Images de microscopie en épifluorescence des cellules HEK 293 surexprimant GFP-AT$_1$ ou GFP-AT$_2$ fixées non stimulées (panel du haut) ou après 30 minutes d'activation par l'Ang II (30nM), les dérivés fluorescents d'Ang II (300nM), le Losartan-Cy3 (10nM) ou le TRV027 et ses dérivés fluorescents (100nM). Les récepteurs sont visibles dans le canal GFP, les ligands fluorescents, dans le canal Cy3/TAMRA et une fusion des images est faite en Merge. Images représentatives de 3 expériences distinctes. Barre d'échelle dans les images, 10 µm.

IV. Etude de la vasoréactivité de l'artère des ligands fluorescents sur AT_1

Les ligands fluorescents, dérivés de l'Ang II ou de TRV027, ont été testés *ex vivo* sur des artères cérébrales moyennes de rats. Une fois les artères cérébrales isolées et perfusées dans un artériographe d'Halpern, elles sont stabilisées pendant une heure dans un tampon salin physiologique qui mime le liquide céphalorachidien. Par la suite, les différents ligands sont ajoutés à concentration croissante de 1pM à 1µM et la contraction artérielle est mesurée afin d'établir des courbes dose-réponse (**Figure 35 et 36**).

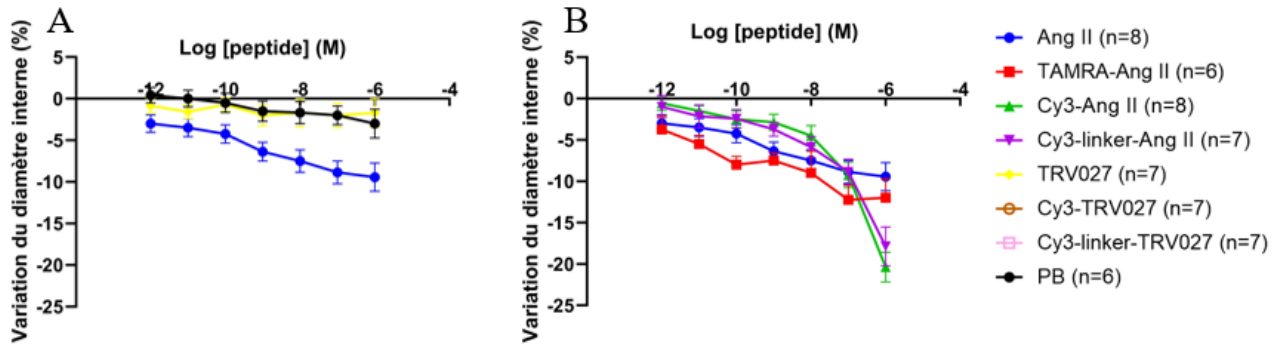


Figure 35 : Mesures des réponses contractiles des artères cérébrales moyennes de rat isolées et perfusées à différents ligands. Les courbes concentration-réponse des (A) peptides natifs et des (B) dérivés fluorescents de l'Ang II ont été obtenues après exposition (30min) à une solution saline physiologique et 5 minutes d'exposition par concentration de peptide au cumul. Les changements de diamètre interne (%) sont exprimés en moyenne ± SEM. Les graphiques sont représentatifs de minimum n = 6 expériences distinctes. L'ajustement à l'équation de Hill a été utilisé (Graphpad Prism 8.0.2).

Dans un premier temps, l'Ang II induit une contraction artérielle avec une EC50 de $1{,}2.10^{-9}$M et un E_{max} de -10% alors que le peptide blanc, servant de contrôle négatif en ayant les mêmes acides aminés que l'Ang II mais dans un ordre aléatoire, n'induit pas de réponse artérielle (**Figure 35 A**). De plus, le TRV027 seul n'induit pas de contraction artérielle, consécutive de la voie des protéines G_q des récepteurs AT_1. Il s'agit donc bien, sur tissus, d'un agoniste biaisé n'activant pas la voie des protéines G des récepteurs AT_1.

Une contraction artérielle est également observée pour les ligands fluorescents basés sur l'Ang II à partir de 10nM. Une contraction plus importante est observée à 100nM et 1µM pour les ligands couplés à la Cyanine 3 alors que le ligand TAMRA-Ang II semble conserver le même comportement que l'Ang II (**Figure 35 B**).

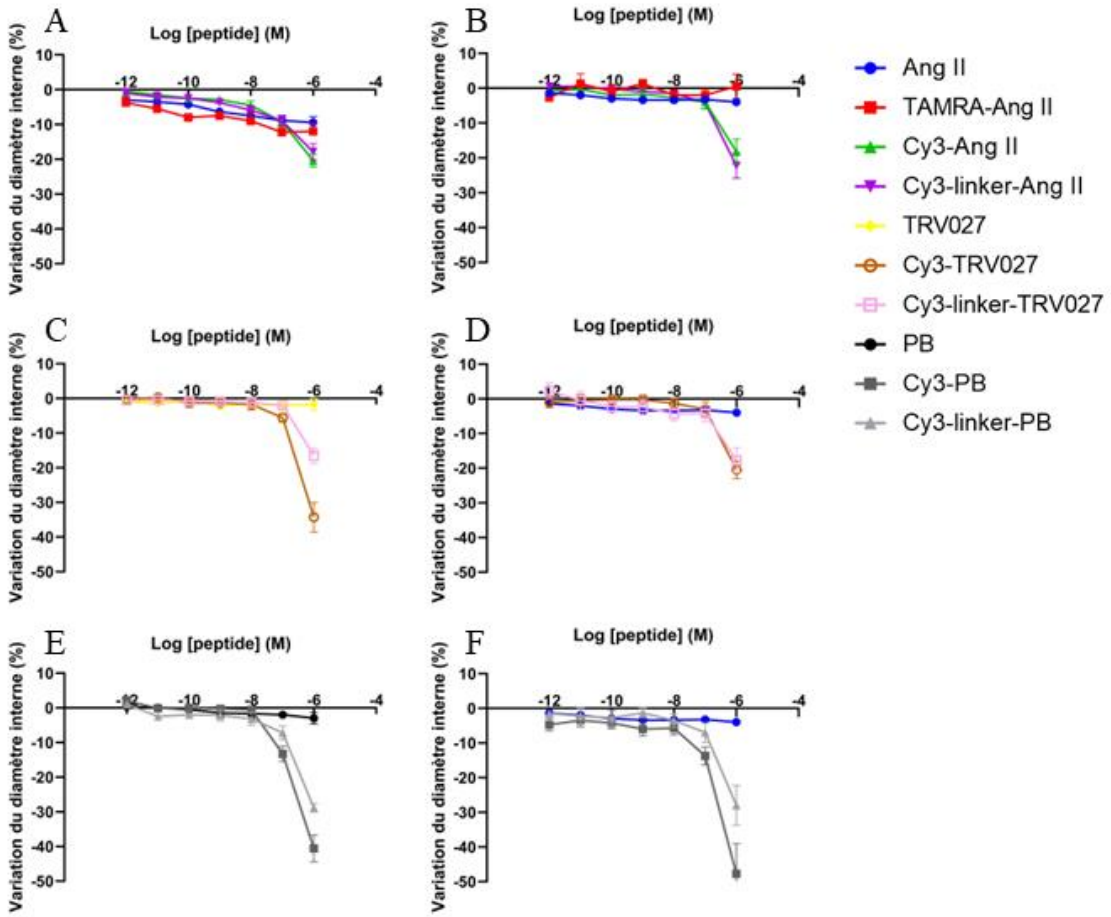


Figure 36 : Mesures des réponses contractiles des artères cérébrales moyennes de rat isolées et perfusées à différents ligands avant et après blocage des récepteurs AT_1. Les courbes concentration-réponse des (A/B) dérivés fluorescents de l'Ang II, (C/D) dérivés fluorescents de TRV027 et (E/F) peptides blancs fluorescents ont été obtenues après exposition (30min) à une solution saline physiologique (A/E/C) ou à du Losartan (10^{-6}M ; B/D/F). Le diamètre interne est mesuré après 5 minutes d'exposition à chaque concentration de peptide (concentrations cumulatives). Les variations de diamètre interne (%) sont exprimées en moyenne ± SEM. Les graphiques sont représentatifs de minimum n = 6 (sans Losartan) et n = 3 (avec Losartan) expériences distinctes. La modélisation à l'équation de Hill a été utilisée (Graphpad Prism 8.0.2).

Cette même contraction artérielle est observée pour les ligands fluorescents Cy3 dérivés de TRV027 et du peptide blanc à partir de 100nM (**Figure 36 C et** E), alors qu'aucune contraction n'est observée à de plus faibles concentrations. Cette contraction artérielle à partir de 100nM de Cy3 semble donc être un effet artéfactuel de la Cyanine 3 sur les artères, indépendant des récepteurs AT_1. En effet, la même réponse est observée sur les artères prétraitées préalablement pendant 30 minutes avec un excès d'antagoniste AT_1, du Losartan à 10^{-6}M (**Figure 36 B, D et F**).

De ce fait, l'étude des ligands fluorescents sur les artères cérébrales doit se limiter à une concentration de 10nM. A cette concentration, la réponse contractile est significativement différente entre les dérivés fluorescents de l'Ang II et les autres ligands fluorescents. En effet, l'Ang II et les trois dérivés fluorescents donnent une réponse contractile similaire entre eux (**Figure 37 A**), qui est significativement distincte des autres ligands fluorescents (**Figure 37 B**). Cependant aucune EC_{50} ne peut être établie due à la limitation dans les concentrations de ligands fluorescents.

Ainsi les ligands fluorescents dérivés de l'Ang induisent la même réponse contractile des artères cérébrales moyennes de rat que les peptides natifs jusqu'à 10nM. Les ligands fluorescents dérivés de TRV027 n'induisent pas de réponse contractile. Le fluorophore Cy3 donne une réponse fonctionnelle des artères cérébrales indépendante des récepteurs AT_1 à partir de 100nM de Cy3.

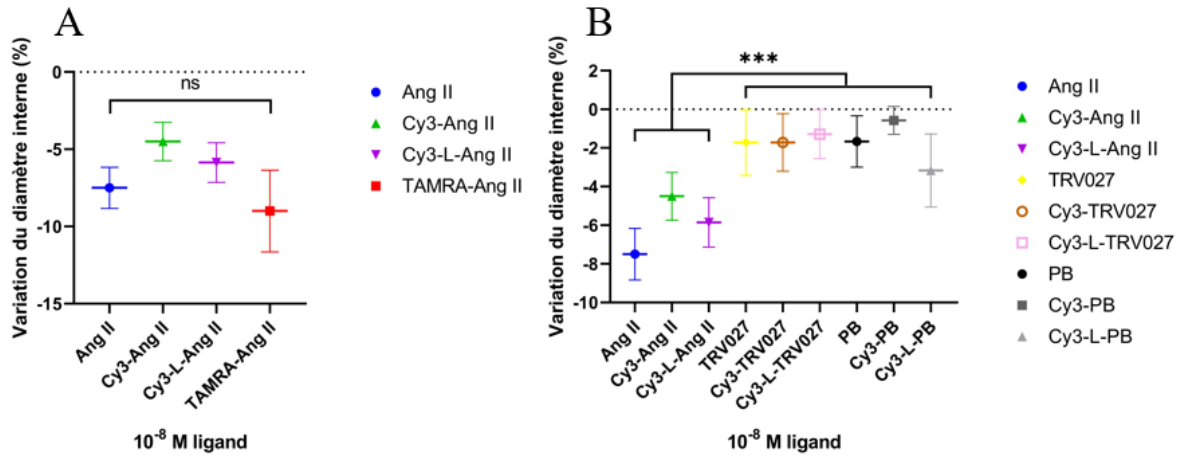


Figure 37 : Mesures des réponses contractiles des artères cérébrales moyennes de rat isolées et perfusées à différents ligands à 10^{-8}M. (A) Les dérivés fluorescents de l'Ang II sont comparés à l'Ang II et (B) les ligands couplés à la Cyanine 3 sont comparés entre eux. Les changements de diamètre interne (%) sont exprimés en moyenne ± SEM. (A) Une ANOVA un facteur et (B) une ANOVA deux facteurs (nature du peptide, présence ou non du fluorophore) ont été utilisées pour calculer les valeurs P, *P < 0,05 (P fluorophore = 0,42 ; P peptide = 0,0002 ; P interaction = 0,65) (test post-hoc de Tukey) (Graphpad Prism 8.0.2).

V. Analyse de l'état d'oligomérisation du récepteur AT1 dans des cellules modèles

1. Détermination du K_D du Losartan-Cy3 en fonction de la densité de récepteurs AT_1

La nouvelle technique développée dans le laboratoire de Karen Martinez permet de déterminer de manière automatisée l'intensité de fluorescence à la membrane plasmique à de nombreux emplacements distincts de chaque cellule.

L'analyse quantitative des images brutes de microscopie confocale permet l'estimation précise des signaux fluorescents provenant de la membrane plasmique dans le volume confocal. Ces signaux ont été extraits à l'aide d'un script MATLAB développé pour segmenter automatiquement chaque cellule individuelle et mesurer l'intensité de fluorescence perpendiculairement à la membrane plasmique pour chaque pixel (environ 200nm). Dans des cellules qui expriment un récepteur fluorescent à la membrane, cela permet d'étudier la densité de récepteurs comme dans l'exemple des récepteurs β1AR (**Figure 38**).

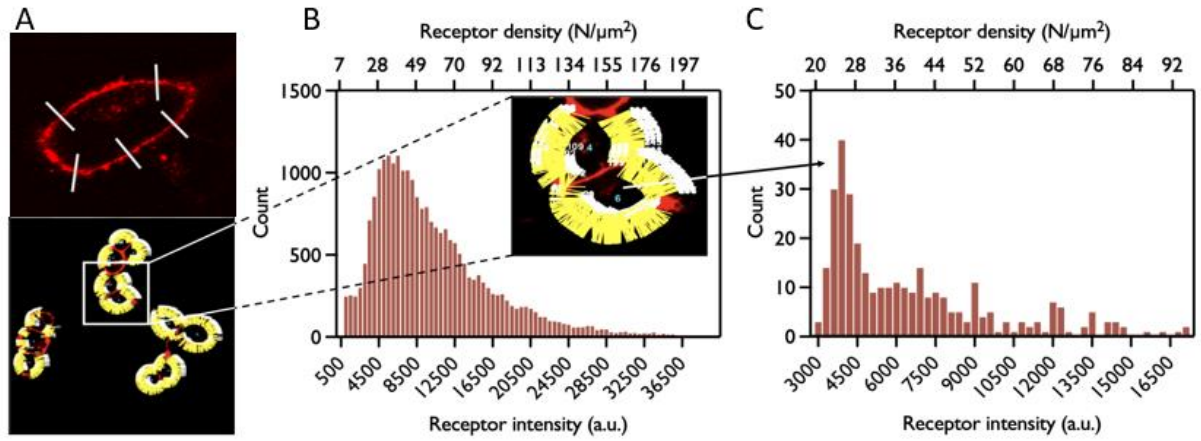


Figure 38 : Densité de récepteur β1AR à la membrane plasmique exprimée dans la lignée cellulaire stable HEK 293. (A) Images de microscopie confocale à balayage laser représentatives de cellules HEK 293 exprimant le récepteur β1AR avec une étiquette SNAP sur son extrémité N-terminale extracellulaire marqué avec le ligand fluorescent du SNAP, le SNAP-Surface Alexa Fluor 647 (BG-647). Image schématisant quelques mesures à la membrane plasmique d'une cellule (en haut) et image de fluorescence analysée par le script MATLAB (en bas). (B) Distribution de la densité SNAP-β1AR dans la membrane plasmique d'une population représentative de 75 cellules. Chaque point de données correspond à une analyse d'une seule ligne. Un zoom avant sur deux cellules représentatives est présenté dans l'encadré. N = 24 245 balayages de lignes. (C) Distribution de la densité SNAP-β1AR dans la membrane plasmique d'une seule cellule. La densité de SNAP-β1AR varie de plus de 5 fois au sein d'une seule cellule. N = 327 balayages de lignes.

Généralement les techniques qui reposent sur des mesures d'ensemble, comme la mesure de l'intensité de fluorescence totale d'une cellule (en cytométrie en flux), de l'image (en microscopie) ou la mesure de l'intensité totale de fluorescence d'un puit pour les études en microplaques, fournissent une lecture moyenne du signal de fluorescence. Ici, cette analyse par pixel de membrane plasmique permet l'acquisition de signaux provenant uniquement du segment membranaire couvert par des analyses de lignes individuelles. Cette méthode est en cours de publication (Ma. *et al*, en cours)

Cet outil d'analyse d'images à haut débit entièrement automatisé donne accès à des informations sur la distribution hétérogène des protéines membranaires plasmiques à la fois au sein d'une seule cellule et au sein d'une population cellulaire entière.

Le Losartan-Cy3 a été étudié dans une gamme de concentration de 0,1 nM à 1µM sur des cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs GFP-AT_1 ou GFP-AT_2. Certains échantillons ont été réalisés avec 10µM de losartan non fluorescent pour analyser le signal non spécifique. Après avoir analysé quantitativement les images *via* le logiciel d'analyse présenté ci-dessus, l'intensité du signal de fluorescence du Losartan-Cy3 à la membrane plasmique a été collectivement ajustée en fonction de la densité de récepteurs mesurée dans le canal détectant la GFP.

La courbe de liaison récepteur/ligand résultante de l'analyse est ensuite déterminée en utilisant à la fois la liaison totale du ligand et la liaison non spécifique (NSB) correspondant à la liaison du Losartan-Cy3 en présence d'un excès de Losartan non fluorescent (**Figure 39 A**). Cela permet d'effectuer un ajustement collectif des deux courbes, en utilisant les deux ensembles de données afin d'améliorer la précision des résultats. Le K_D du Losartan-Cy3 pour les récepteurs AT_1, mesuré par le logiciel, est de 29,4 ± 89,2 nM et un B_{max} ajusté de 4500 ±925,3 A.U, avec un R^2 global de 0,92. La courbe de liaison spécifique peut ensuite être déterminée sur la base des paramètres ajustés (**Figure 39 B**) et les résultats peuvent être représentés en échelle linéaire (**Figure 39 C**) illustrant l'augmentation régulière de la liaison spécifique du Losartan-Cy3 aux récepteurs AT_1.

Les données en cytométrie en flux pour le Losartan-Cy3 sont confirmées, avec une liaison sélective aux récepteurs AT_1 (**Figure 39 A et E**) et une absence de liaison pour les récepteurs AT_2 (**Figure 39 B et E**). En effet, pour les récepteurs AT_2 aucune intensité de fluorescence n'est mesurée, alors que pour les récepteurs AT_1 l'intensité de fluorescence augmente avec la concentration de Losartan-Cy3 et la liaison non spécifique reste faible jusqu'à 100nM.

Le plateau de saturation n'est pas atteint à 100nM de Losartan-Cy3, il faut donc ajouter quelques concentrations plus importantes. Des mesures ont donc été réalisées jusqu'à 3µM de Losartan-Cy3, cependant à cette dernière concentration le signal non spécifique est trop élevé pour analyser correctement les images (**Figure 40**). En effet, les cellules, notamment la membrane plasmique, sont saturées de Losartan-Cy3 à 3µM avec ou sans excès de Losartan non marqué (**Figure 40 C et D**) contrairement à une concentration en Losartan-Cy3 de 300nM (**Figure 40 A et B).**

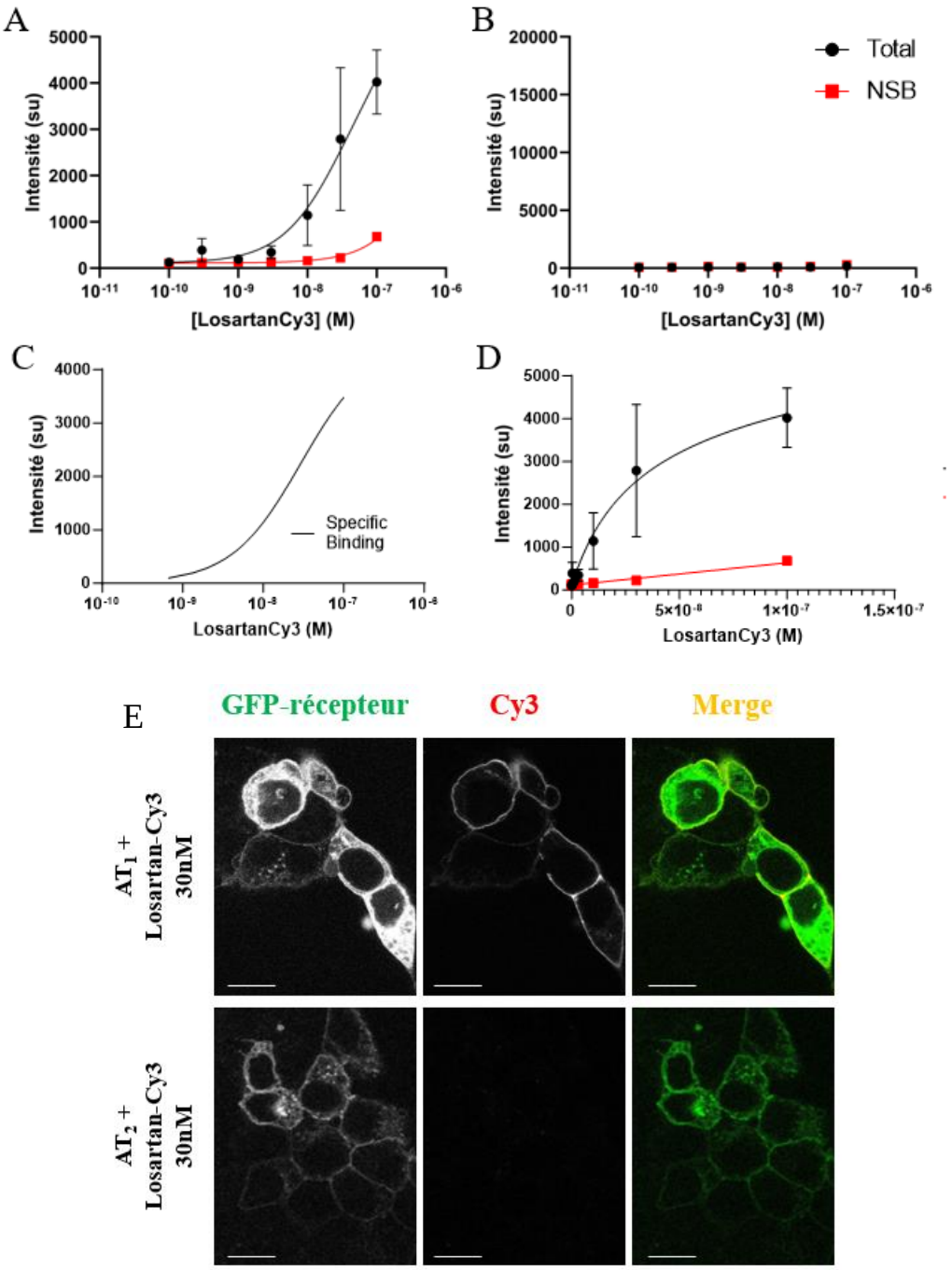


Figure 39 : Mesure de la liaison du losartan-Cy3 aux récepteurs AT_1 et aux récepteurs AT_2 par microscopie confocale. Les courbes effet/dose d'intensité de fluorescence à la membrane plasmique du Losartan-Cy3 mesurées dans les cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs GFP-AT_1 ou GFP-AT_2 ont été obtenues après exposition (15min) à (courbe noire) du tampon ou à (courbe rouge) un excès d'antagoniste (Losartan ou PD 123319 à 10^{-5}M) et incubation 15 minutes avec du Losartan-Cy3 à des concentrations croissantes jusqu'à 100nM. (A) Mesures indépendantes de la liaison totale du Losartan-Cy3 et de la liaison non spécifique (NSB) assemblés pour les cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs GFP-AT_1. (B) Mesures indépendantes de la liaison totale et de la liaison non spécifique (NSB) assemblés pour les cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs GFP-AT_2. Les barres d'erreur correspondent au SEM parmi 3 échantillons indépendants. (C) Courbe de liaison spécifique basée sur les paramètres ajustés de A. (D) Données représentées en A tracées sur une échelle de concentration linéaire. (E) Images de microscopie confocale de cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs GFP-AT_1 ou GFP-AT_2 après 15 minutes d'exposition à du tampon et incubation 15 minutes avec du Losartan-Cy3 30nM. Les récepteurs sont visibles dans le canal GFP, les ligands fluorescents, dans le canal Cy3 et une fusion des images est faite en Merge. Images représentatives de 3 expériences distinctes avec acquisition de 5 images par condition. Barre d'échelle dans les images, 10 µm.

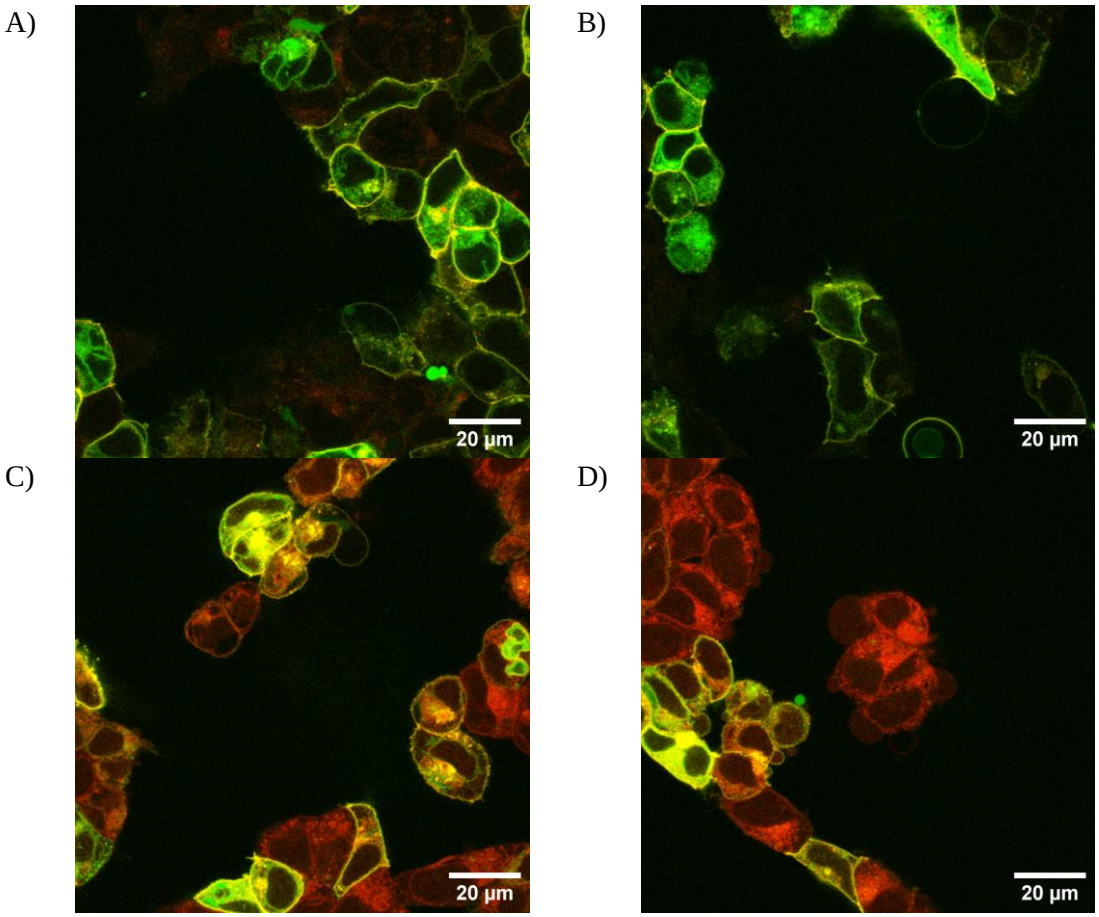


Figure 40 : Exemple d'images de cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs GFP-AT_1 en présence de fortes concentrations de Losartan-Cy3. Les cellules sont incubées avec (A/B) 300nM ou (C/D) 3µM de Losartan-Cy3 en l'absence (A/C) et en présence (B/D) de losartan non marqué en excès. Le signal du récepteur GFP-AT_1 est affiché en vert tandis que le Losartan-Cy3 est affiché en rouge. Le marquage en jaune correspond aux cellules segmentées par le logiciel dont l'intensité de fluorescence à la membrane sera mesurée.

La gamme de concentration étudiée a donc été limitée de 0,1nM à 1µM de Losartan-Cy3 et la même analyse que sur les points de données jusqu'à 100nM (**Figure 39**) a été réalisée (**Figure 41**).

Le K_D du losartan-Cy3 pour les récepteurs AT_1 est de 48,7 ± 81,2 nM et le B_{max} est de 4578 ± 998 A.U, avec un R^2 global de 0,73 (**Figure 41 A**). La courbe de liaison spécifique déterminée sur la base des paramètres ajustés collectivement a également été obtenue (**Figure 41 B**). Une évaluation plus approfondie des courbes montre qu'il existe un écart du modèle à des concentrations supérieures à 300nM, avec une liaison non spécifique du ligand très importante. Cette méthode, qui n'analyse que la liaison du ligand fluorescent au niveau de la membrane plasmique, nous permet de monter en concentration de ligand dans nos analyses par rapport à la cytométrie en flux. En effet, les données obtenues en montant en concentration de Losartan-Cy3 et en prenant en compte l'importante liaison non spécifique sont cohérentes avec les mesures précédentes, avec un K_D calculé similaire dans les deux cas.

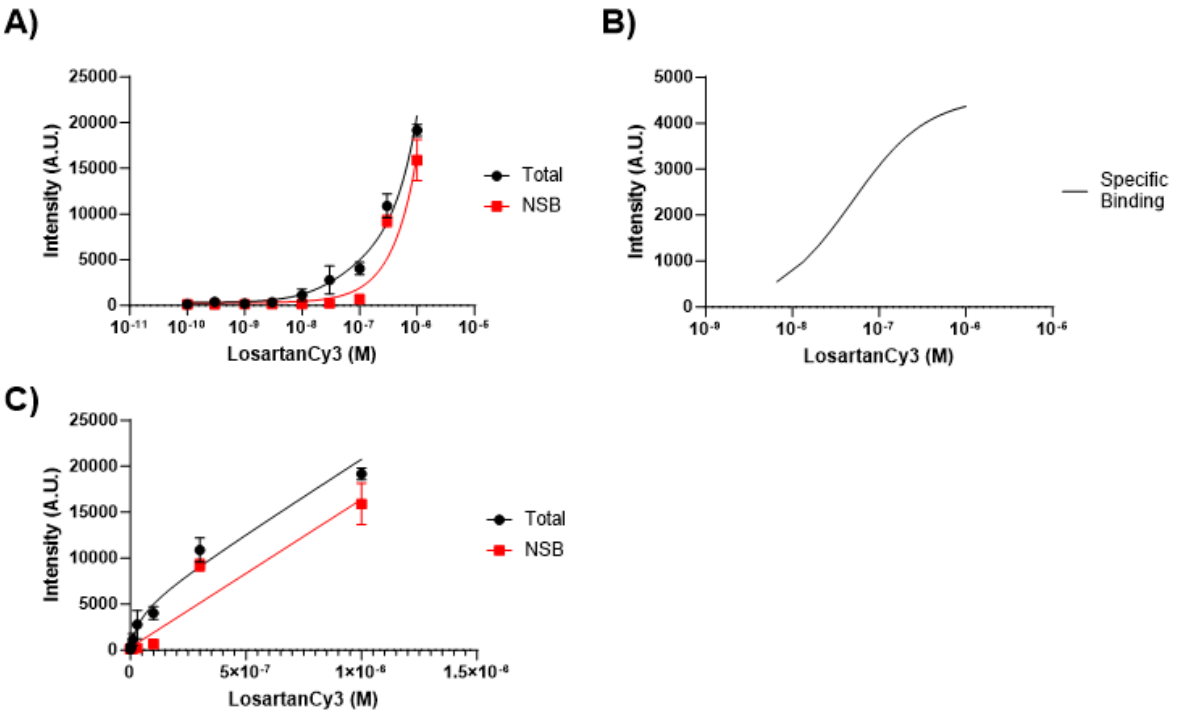


Figure 41 : Mesure de la liaison du losartan-Cy3 aux récepteurs GFP-AT$_1$ par microscopie confocale. Les courbes d'intensité de fluorescence à la membrane plasmique du Losartan-Cy3 à des concentrations croissantes mesurées dans les cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs GFP-AT$_1$ ont été obtenues après exposition (15min) à (courbe noire) du tampon ou à (courbe rouge) un excès d'antagoniste (Losartan ou PD 123319 à 10^{-5}M) et incubation 15 minutes avec du Losartan-Cy3 jusqu'à 1µM. (A) mesures indépendantes de la liaison totale et de la liaison non spécifique (NSB). Les barres d'erreur correspondent au SEM parmi 3 échantillons indépendants. (B) Courbe de liaison spécifique basée sur les paramètres ajustés de A. (C) Données représentées en A tracées sur une échelle linéaire.

L'analyse à haut débit des images a généré des ensembles de données représentant plus de 1 000 000 mesures individuelles de segments de membrane cellulaire par condition. Chacune de ces intensités de fluorescence correspond à la densité moyenne de récepteurs présents et de ligands liés dans un segment de membrane plasmique d'environ 200nm.

L'étude statistique de ces nombreuses données, avec le logiciel RevCell développé dans le groupe de K. Martinez, permet de déterminer le K_D d'un ligand pour son récepteur en fonction de la densité de récepteurs dans un pixel de la membrane plasmique. En triant les mesures de ligands fluorescent en fonction de plages de densités de récepteurs correspondant à 200 UA, l'analyse préliminaire des résultats obtenus révèle des K_D différents en fonction de la densité de récepteurs à la surface des cellules (**Figure 42**). En effet, l'intensité de fluorescence (B_{max}), reflétant la liaison spécifique, du Losartan-Cy3 mesurée est plus importante à haute densité de récepteurs (**Figure 42 A**). L'affinité du traceur fluorescent serait également plus élevée pour les récepteurs présents en haute densité, avec un K_D plus faible (**Figure 42 B**).

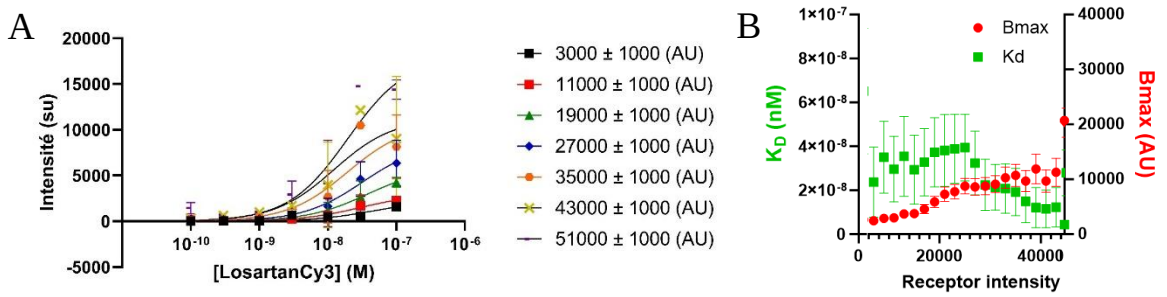


Figure 42 : Mesure de la liaison du losartan-Cy3 suivant la densité de récepteurs AT_1. (A) courbe de liaison à la saturation du Losartan-Cy3 sur les cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs GFP-AT_1. (B) détermination du K_D et du B_{max} suivant la densité de récepteurs AT_1. Les barres d'erreur correspondent au SEM parmi 3 échantillons indépendants. AU : arbitrary unit.

Cette indication d'une différence significative de K_D en fonction de la densité de récepteurs suggère que l'affinité du Losartan-Cy3 pourrait être modulée en fonction de l'état d'oligomérisation du récepteur AT_1.

2. Etude de l'état d'oligomérisation des récepteurs AT_1

La méthode quantitative de l'équipe de Karen Martinez permet également d'étudier l'état d'oligomérisation des RCPG en fonction du niveau d'expression. Elle a été utilisée pour déterminer l'état d'oligomérisation de plusieurs RCPG.

Cette méthode est basée sur l'utilisation de GPCR fusionnés avec un SNAP tag à l'extrémité N-terminale qui permet un marquage spécifique du récepteur par deux ligands de l'étiquette SNAP qui forment un couple D/A (donneur/accepteur) de FRET. En contrôlant le ratio récepteur / ligand du SNAP tag, il est possible d'effectuer des mesures quantitatives de FRET à de nombreux rapports récepteur / ligand du SNAP tag (R/L) en mesurant l'efficacité apparente du FRET, Eapp par sensibilisation de l'émission de fluorescence de l'accepteur d'après une méthode publiée par l'équipe de Karen Martinez (B. H. Meyer *et al.*, 2006a; B. H. Meyer *et al.*, 2006b).

Durant mon séjour de recherche chez le Dr Karen Martinez, j'ai donc participé à des expériences visant à étudier l'état d'oligomérisation du récepteur AT_1 dans des cellules HEK 293 transfectées de manière transitoire. Ici, une analyse des mesures effectuées à des ratios R/L compris entre 0,2 et 0,8 a été faite. L'efficacité de FRET apparente Eapp est dépendante de la densité des récepteurs (**Figure 43 A**). A partir de ces données il est possible d'extraire l'état apparent d'oligomérisation du récepteur, valeur traduisant l'oligomérisation déduite des courbes FRET d'efficacité de FRET Eapp (**Figure 43 B**).

Pour les récepteurs AT_1, leur état d'oligomérisation dépend du niveau d'expression avec un état d'oligomérisation apparent de 4 à des niveaux d'expression peu élevé jusqu'à très élevé, ce qui suggère un équilibre entre monomères et tétramères en faveur du tétramère, éventuellement avec la formation transitoire de dimères (**Figure 43 B**).

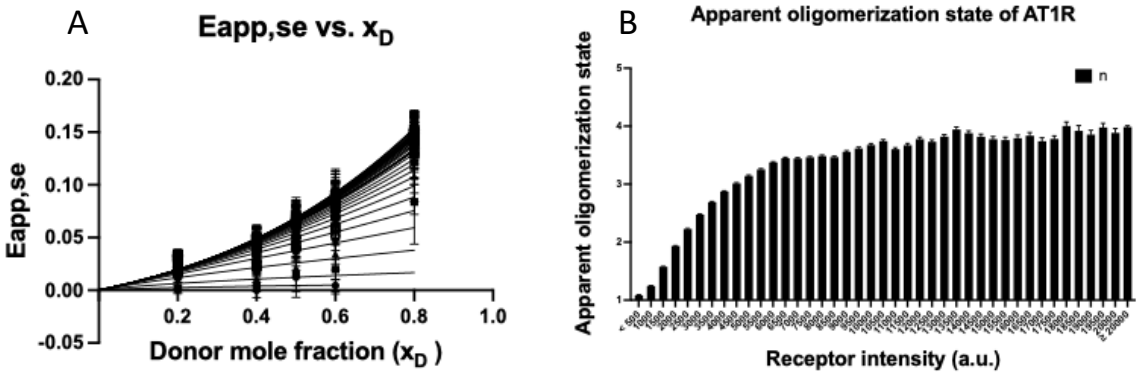


Figure 43 : Oligomérisation apparente des récepteurs AT_1 dépendant de la densité des récepteurs sur les cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs AT_1. Déterminé d'après Meyer *et al* (B. H. Meyer *et al.*, 2006b). L'efficacité apparente du FRET (Eapp,se) est tracée en fonction de la fraction molaire du donneur (xD) de (0,2-0,8) (A). Pour différents xD, l'Eapp,se se comporte différemment en fonction de la densité du récepteur. À faible densité, aucun FRET n'est observé à aucun xD. L'augmentation de la densité des récepteurs entraîne une augmentation de Eapp,se en fonction de xD. L'état apparent d'oligomérisation du récepteur a été extrait de l'ajustement de chaque plage de densité et a donné 1,08 ± 0,01 à faible densité, 4,0 ± 0,02 à haute densité. Les données sont la moyenne Eapp,se ± SEM pour les mesures. L'état apparent d'oligomérisation du récepteur a été extrait et tracé en fonction de la densité du récepteur pour toutes les densités mesurées (B). À mesure que la densité du récepteur augmente, l'état d'oligomérisation du récepteur augmente également. Les données représentent l'état d'oligomérisation ajusté ± erreur standard.

Cette première analyse a été effectuée en absence de ligand. Il serait intéressant de regarder quel est l'état d'oligomérisation de AT_1 après addition de losartan par exemple.

L'hypothèse que nous suggérons est qu'il y aurait une corrélation entre la liaison du Losartan-Cy3 suivant la densité de récepteurs GFP-AT_1 et l'état d'oligomérisation étudié sur SNAP-AT_1. Le Losartan-Cy3 aurait une amélioration de l'affinité pour le récepteur lorsqu'il est assemblé en oligomère, avec une diminution du K_D estimée lorsque la densité de récepteurs augmente (**Figure 42 B** et **43 B**). L'analyse suggère en outre que le ligand se lie préférentiellement aux oligomères AT_1 qu'aux monomères AT_1.

Conclusion

Des ligands fluorescents et leurs homologues non fluorescents ciblant les récepteurs AT_1 ont été conceptualisés puis caractérisés pharmacologiquement. Plusieurs tests cellulaires *in vitro* ont été établis dans lesquels AT_1 est exprimé de manière hétérologue sous forme de protéine de fusion afin de caractériser pharmacologiquement ces ligands.

Pour la première fois, trois ligands fluorescents pour les récepteurs AT_1 et les récepteurs AT_2 ont été caractérisés. Il s'agit des ligands agonistes TAMRA-Ang II, Cy3-Ang II et Cy3-linker-Ang II. En plus de conserver une capacité de liaison pour les récepteurs AT_1 et AT_2, ces ligands fluorescents induisent la même signalisation que l'Ang II sur AT_1, à savoir la voie des protéines G_q, permettant entre autres la libération de calcium intracellulaire et à terme la contraction artérielle, et la voie des β-arrestines permettant l'internalisation des récepteurs. Malgré une EC_{50} plus importante de l'ordre de 100nM, nos ligands agonistes peuvent être utilisés pour tracer les récepteurs AT_1 et AT_2 dans les cellules les surexprimant.

Un premier ligand fluorescent sélectif des récepteurs AT_2 par rapport aux récepteurs AT_1 a été identifié, le ligand Cy3-TRV027. Jusqu'à 100nM ce ligand se lie sélectivement aux récepteurs AT_2 par rapport aux récepteurs AT_1. A partir de 1µM, le ligand Cy3-TRV027 active les récepteurs AT_1 en donnant une signalisation G_q mais aussi β-arrestines. Le ligand Cy3-TRV027 a perdu le biais strictement β-arrestines sur les récepteurs AT_1.

Pour finir, pour la première fois un ligand fluorescent est sélectif des récepteurs AT_1 par rapport aux récepteurs AT_2, l'antagoniste Losartan-Cy3. En plus de ne se fixer qu'aux récepteurs AT_1, avec un K_D avoisinant les 30nM, il conserve le caractère d'antagoniste des récepteurs AT_1 et est un bon traceur du récepteur AT_1 *in vitro*.

Ainsi, les nouveaux ligands fluorescents développés et caractérisés peuvent être appliqués dans une série de techniques basées sur la fluorescence pour étudier la signalisation et la localisation des récepteurs de l'angiotensine II. Dans la suite de ce projet de thèse, ces ligands pourront être utilisés pour étudier l'impact de la *S*-nitrosation par un donneur de NO sur les récepteurs AT_1, *in vitro* mais également *ex vivo*. Les réponses fonctionnelles et la signalisation pourront être étudiées avec les nouveaux ligands fluorescents que nous venons de caractériser.

Partie 2

Effet des donneurs de NO sur la réponse fonctionnelle aux agonistes du récepteur AT_1

Objectifs

Il a été démontré, par l'équipe de l'EA 3452 (Bouressam *et al.*, 2019), qu'un prétraitement d'artères cérébrales de rat avec du S-nitrosoglutathion abolit la vasoconstriction induite par l'Ang II alors que les réponses d'autres récepteurs associés à $G_{q/11}$ demeurent inchangées, suggérant que AT_1 est la cible directe du donneur de NO. Des résultats similaires ont récemment été obtenus par une autre équipe (Pinheiro *et al.*, 2021). L'objectif de l'étude actuelle est de confirmer ces résultats obtenus sur artères au niveau cellulaire en étudiant la signalisation des récepteurs AT_1 suite à un prétraitement à un donneur de NO. De plus, par l'intermédiaire des traceurs fluorescents caractérisés, l'impact de la *S*-nitrosation des récepteurs AT_1 sur leur localisation et leur internalisation sera étudiée.

Pour cela, la méthodologie utilisée pour caractériser les traceurs fluorescents sera également nécessaire dans ce travail expérimental. La signalisation des récepteurs AT_1 sera étudiée par l'intermédiaire de la mesure de la réponse calcique caractéristique de la voie des protéines G_q. Le recrutement des effecteurs des récepteurs AT_1 sera suivi par mesure de la fluorescence en BRET. Pour finir la localisation des récepteurs AT_1 sera analysée par imagerie. Une nouvelle étude *ex vivo*, sur artères cérébrales moyennes de rat, permettra de comprendre quels mécanismes sont impliqués dans l'abolition de la vasoconstriction induite par l'Ang II lorsque les artères sont prétraitées avec un donneur de NO.

Matériels et méthode

I. Matériels

Donneurs de NO

Le *S*-nitrosoglutathion (GSNO) et le *S*-nitroso-N-acétylcystéine (NacNO) sont les donneurs de NO utilisés pour ces expériences. De l'eau déminéralisée ultra pure (>18,2 MΩ.cm) a été utilisée pour préparer la solution de NacNO. La NacNO a été synthétisée extemporanément à une concentration finale de 10^{-2}M en faisant réagir de la N-acétylcystéine avec du $NaNO_2$ en milieu acide, comme décrit précédemment (Parent *et al.*, 2013). La solution est ajustée à pH 7,4 en ajoutant du NaOH 40%, puis dilué 2 fois dans un tampon phosphate 10^{-2}M pH 7,4. Le GSNO a été préparé extemporanément comme décrit précédemment (Parent *et al.*, 2013). Toutes les manipulations et tests impliquant le GSNO et le NacNO ont été effectués dans des conditions de lumière tamisée afin de limiter la dégradation induite par la lumière.

Lignées cellulaires

Une seule lignée cellulaire a été utilisée, les cellules embryonnaires rénales humaines immortalisées HEK 293 (ATCC Cat# CRL-1573, RRID :CVCL_0045), mais modifiée génétiquement avec différents plasmides suivant les différentes expériences.

Des transfections stables ont été établies pour surexprimer les récepteurs humains AT_1 ou AT_2 marqués par une étiquette Flag ou par la protéine fluorescente GFP dont les vecteurs sont cités ci-après.

II. Méthodes

Culture cellulaire

Les cellules HEK 293 ont été cultivées en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) dans des flasques de 75cm^2 dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium, référence P30-3306 NGlowBiotech) complémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (référence P30-3306 PAN Biotech), 2mM de glutamine (référence 25030-024 GIBCO) et 1% d'antibiotiques (pénicilline à 100unités/mL et streptomycine 100µg/mL, référence 15140-122 GIBCO). Lorsqu'elles atteignent environ 80% de confluence, le milieu est éliminé, les cellules sont rincées au PBS puis 1,5mL de trypsine est ajouté dans chaque boite. Après incubation 5 minutes à 37°C, du milieu complet est ajouté pour inhiber l'action de la trypsine puis un petit volume de cellules est prélevé puis ajouté dans une nouvelle boite contenant 15mL de milieu complet. Les passages cellulaires s'effectuent à une fréquence de 2 par semaine. Tous les réactifs ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Mesure de la libération calcique intracellulaire

Le principe de cette méthode a été décrit dans la partie 1 des travaux expérimentaux (*cf*. p66)

Des cellules HEK 293 surexprimant de manière stable les récepteurs Flag-AT_1 ont été cultivées à 600 000 cellules/mL pendant deux jours dans du milieu MEM complet en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) en T10. Elles ont ensuite été chargées avec 2,5µM de Fluo-4-AM (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) en présence de 2,5mM de probénécide (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et de 300µM de NacNO dilués dans le tampon HEPES pendant une heure. Les cellules ont ensuite été rincées et collectées dans du PBS et mises en suspension dans 12mL de tampon HEPES (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, 0,4mM NaH2PO4). Les cellules ont été distribuées dans une plaque 96-puits (Greiner 655090, 100µL/puits) et centrifugées pendant 5 minutes à 800 rpm. Les composés testés ont été dilués en série dans le tampon physiologique HEPES.

Les augmentations de calcium intracellulaire provoquées par les agonistes, injectés après 30 secondes de mesure, ont été enregistrées à l'aide d'un lecteur de microplaques Flexstation III (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) avec une mesure toutes les 3 secondes pendant 220 secondes à 37°C, par émission de fluorescence à 520nm (excitation à 485nm). Les amplitudes de réponse maximale ont été normalisées au niveau de fluorescence de base. Pour chaque concentration de l'agoniste, la valeur maximale de l'augmentation de la concentration en calcium a été déterminée afin de construire des courbes concentrations-réponse. Le logiciel d'analyse utilisé est KaleidaGraph 4.0.

Localisation subcellulaire par imagerie de fluorescence

Des cellules HEK 293 surexprimant de manière stable les récepteurs humains GFP-AT_1 ou GFP-AT_2 ont été cultivées à 80 000 cellules/puits pendant 48h en atmosphère humide dans un incubateur (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) dans des plaques 24-puits contenant du milieu MEM complet sur des lamelles de 12 mm de diamètre pré-recouvertes de collagène de rat de type I (60 µg/mL, référence 11179179001). Les cellules ont été incubées 30 minutes à 37°C avec 300µM de NacNO ou du tampon HEPES (0,1% BSA) avant l'ajout des ligands. Les différents ligands testés ont été dilués dans du tampon physiologique HEPES (0,1% BSA) et ajoutés aux cellules pendant 30 minutes à 37°C. Après incubation, les cellules sur lamelles ont été fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 15 minutes, rincées deux fois avec du PBS et exposées 15 minutes à 50mM de NH4Cl afin d'éteindre la fluorescence restante du paraformaldéhyde. Après deux autres rinçages dans du PBS, les lamelles ont été collées sur des lames à l'aide d'un agent de montage (Mowiol, Calbiochem). L'acquisition des images a été réalisée avec un microscope à épifluorescence LEICA (microscope motorisé LEICA DM5500B avec caméra froide Leica CTR 6000). Les figures ont été créées avec le logiciel ImageJ.

Mesure des interactions récepteur/effecteur par bioluminescence (BRET)

Le principe de cette méthode a été décrit précédemment (*cf*. p67)

Le protocole effectué diffère des expériences précédentes à la dernière étape seulement. Ainsi, pour avoir les détails du début de ce protocole il faut se référer aux pages 68-69.

Le milieu de culture des cellules transfectées, incubées dans la plaque 96-puits pendant 24h, est éliminé puis remplacé par 80µL/puits de tampon physiologique HEPES (0,2% BSA). Les composés testés ont été dilués en série dans le tampon HEPES (0,2% BSA). Les donneurs de NO utilisés ont été pré-incubés avec les cellules pendant une heure avant l'activation par le composé testé. Dans la plaque 96-puits, 10µL des composés à tester ont été ajoutés suivis du substrat NLuc Glow (dilué au 1/80 dans du tampon HEPES (0,2% BSA) (Interchim, Montluçon, France) 10 minutes avant l'enregistrement du point final BRET. Les signaux ont été acquis dans un appareil VictorLight (Pekin Elmer) à 37°C. Pour chaque puits, la lumière émise est mesurée de manière consécutive à la longueur d'onde d'émission du donneur (Nluc, filtre d'émission 435-385nm) et à la longueur d'onde d'émission de l'accepteur (YPET ou venus, filtre d'émission à 510-560nm).

Un « ratio BRET » correspondant au signal dans le « canal accepteur » (filtre bande passante 510-560nm) divisé par le signal dans le « canal donneur » (filtre bande passante 435-385nm) a été calculé. La valeur de « netBRET » est ensuite calculée en soustrayant le « ratio BRET » des cellules exprimant uniquement le donneur d'énergie au « ratio BRET » des cellules exprimant le donneur et l'accepteur d'énergie (pour le même temps d'activation). Pour finir, les signaux BRET modulés par un agoniste sont calculés en soustrayant le signal netBRET obtenu sans activation des récepteurs aux autres signaux netBRET.

Animaux et déclaration éthique

Toutes les expériences sont effectuées en conformité avec les recommandations de la Communauté Européenne (directive 2010/63/UE) pour l'utilisation des animaux de laboratoire. Les protocoles et les procédures expérimentales ont été approuvés par le comité d'éthique régional sur l'expérimentation animale (saisine BisNitroVivo APAFIS #15598) et les procédures expérimentales hors champ ont été contrôlées par l'Animalerie centrale du Campus Brabois Santé ACBS (n° du projet ACBS17-MCAIA).

Les expériences sont réalisées sur des rats Wistar mâles normo-tendus, non consanguins, âgés de 4 à 8 mois (Rj/Han : WI, Janvier, Le Genest-Saint-Isles, France). Les procédures sont réalisées en zone EOPS (exempt d'Organismes pathogènes Spécifiques) à l'ACBS.

Préparation des artères cérébrales moyennes de rat

La procédure pour la préparation des artères cérébrales moyennes et la vérification de leur viabilité est expliquée et détaillée en pages 74-75 de ce manuscrit.

Etude de la réactivité artérielle suite à l'application de ligands AT_1

a. Prétraitement au GSNO

Après l'évaluation de la viabilité au KCl, les artères ont été exposées pendant 30 minutes à du GSNO 2.10^{-6} $mol.L^{-1}$ ou au PSS. Ensuite, un rinçage des artères avec du PSS a été réalisé pendant une heure avant l'ajout des différents peptides.

b. Réponse des différents peptides

Les artères ont ensuite été exposées aux différents peptides étudiés à des concentrations allant de 1.10^{-12} $mol.L^{-1}$ à 1.10^{-6} $mol.L^{-1}$ avec 5 minutes d'exposition par concentration de peptide. Les temps d'exposition étaient réalisés à l'obscurité lorsque les peptides testés présentaient de la fluorescence. Les courbes concentration-réponse avec un prétraitement au GSNO ont été comparées aux courbes concentration-réponse sans traitement. Afin d'exclure tout effet dépendant du temps et de l'âge des animaux, les différentes conditions ont été réalisées dans un ordre aléatoire.

Analyses statistiques

Les valeurs de DI ont été mesurées à l'aveugle par deux opérateurs différents, garantissant des mesures fiables et objectives. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de Graphpad Prism version 8.0.2 (RRID : SCR_002798).

Les réponses vasoactives des artères cérébrales moyennes sont exprimées en pourcentage de changement de DI par rapport à la valeur mesurée lors du prétraitement. Cette normalisation permet de limiter les sources de variation indésirables comme les différences anatomiques des artères. Pour chaque condition, la taille de l'échantillon est d'au moins n = 4, avec un effectif plus grand pour les groupes prétraités au GSNO (compte tenu de la forte possibilité de dégradation du GSNO).

Des courbes concentration-réponse aux peptides ont été construites pour chaque ACM et la moitié de la concentration efficace maximale (EC50) a été calculée à l'aide de l'équation de Hill : $\%changement\ DI = E_{min} + (E_{max} + E_{min}) / (1+10^{(logEC50 - log(concentration)*pente\ de\ Hill)})$, où E_{min} et E_{max} sont respectivement la réponse minimale et maximale atteinte dans chaque courbe concentration-réponse. Les différences dans les réponses vasoactives ont été déterminées par deux tests statistiques : une ANOVA à deux facteurs (traitement, concentration) suivi d'un test post-hoc de Tukey ($P < 0,05$).

Résultats et discussion

I. Etude des effets de la *S*-nitrosation sur la réponse fonctionnelle AT_1 *in vitro*

Pour étudier les effets de la *S*-nitrosation sur la réponse fonctionnelle AT_1, les cellules ont été prétraitées ou non à différents donneurs de NO, le GSNO et le NacNO. Plusieurs concentrations de ces donneurs de NO ont été testées allant de 100µM à 1mM.

Des premiers tests de réponse fonctionnelle, mesurant la réponse calcique intracellulaire consécutive à l'activation de la voie des protéines G_q ont été réalisés en prétraitant les cellules surexprimant les récepteurs AT_1 avec 300µM de NacNO, puis en activant les récepteurs avec de l'Ang II (**Figure 44 A**). Une légère baisse de la libération calcique est observée pour ces cellules comparées aux cellules non prétraitées activées par l'Ang II. Il s'agit d'un premier résultat encourageant qui va dans le sens d'un blocage de la voie G_q par un prétraitement à des RSNO. Cependant l'inhibition de la voie G_q n'est pas retrouvée dans les résultats de BRET. En effet, malgré un prétraitement des cellules à deux donneurs de NO différents et à différentes concentrations allant jusqu'à 1mM, le recrutement des protéines miniGq par les récepteurs AT_1 activés par l'Ang II reste similaire avec ou sans prétraitement (**Figure 44 B**). Le recrutement des β-arrestines 2 et l'internalisation des récepteurs AT_1 mesurés en BRET, sont également similaires entre les cellules activées par l'Ang II prétraitées par des donneurs de NO ou non traitées (**Figure 44 C et D**).

L'internalisation des récepteurs est également étudiée en imagerie sur les cellules surexprimant les récepteurs GFP-AT_1 ou GFP-AT_2 (**Figure 45**). Les récepteurs AT_1 activés par 30nM d'Ang II ou 300nM de Cy3-Ang II sont retrouvés dans les vésicules d'endocytose dans le cytoplasme des cellules, donc internalisés. Les récepteurs AT_2 restent à la surface de la membrane plasmique après les activations par les agonistes. Lorsque les cellules sont prétraitées avec 300nM de NacNO pendant 30 minutes puis activées par les agonistes, les récepteurs AT_1 sont de nouveau retrouvés dans le cytoplasme des cellules et les récepteurs AT_2 sont localisés à la surface de la membrane plasmique. De ce fait le prétraitement des cellules pendant 30 minutes par le NacNO à 300nM ne semble pas impacter la localisation des récepteurs AT_1 et AT_2 après leur activation par des agonistes.

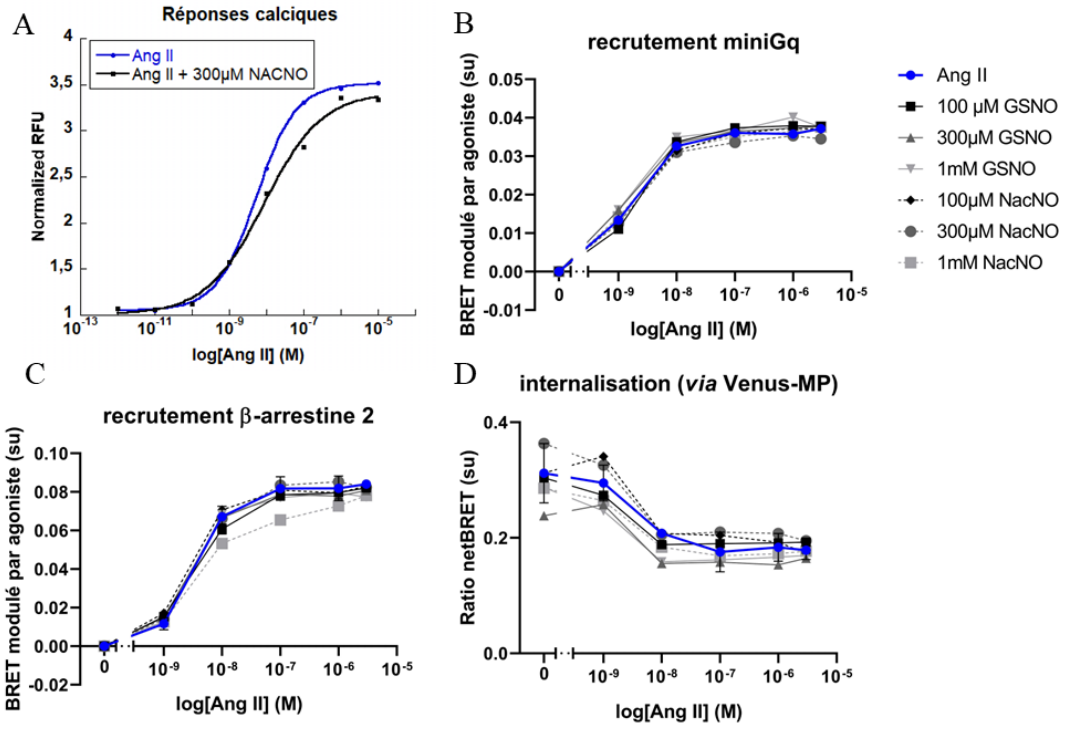


Figure 44 : Effets des donneurs de NO sur la signalisation de cellules surexprimant les récepteurs AT_1. (A) Courbes dose/réponse calcique mesurées dans les cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_1 prétraitées ou non à 300µM de NacNO et activés par l'Ang II. Le graphique est représentatif de n = 1 expérience, avec un duplicat pour chaque condition. Chaque point de données représente les valeurs moyennes des duplicats de l'expérience ; KaleidaGraph (4.0). (B/C/D) Courbes de recrutement des protéines par le récepteur AT_1 activé par l'Ang II mesurées dans des cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire AT1R-NanoLuc et (B) Venus-miniGq, (C) YPET-ARRB2 ou (D) Venus-MP. Les cellules ont été prétraitées ou non à différentes concentrations de NacNO ou GSNO pendant 30 minutes. Les graphiques sont représentatifs de n = 1 expérience, avec un duplicat pour chaque condition. Chaque point de données représente les valeurs moyennes des duplicats de l'expérience (Graphpad Prism 8.0.2).

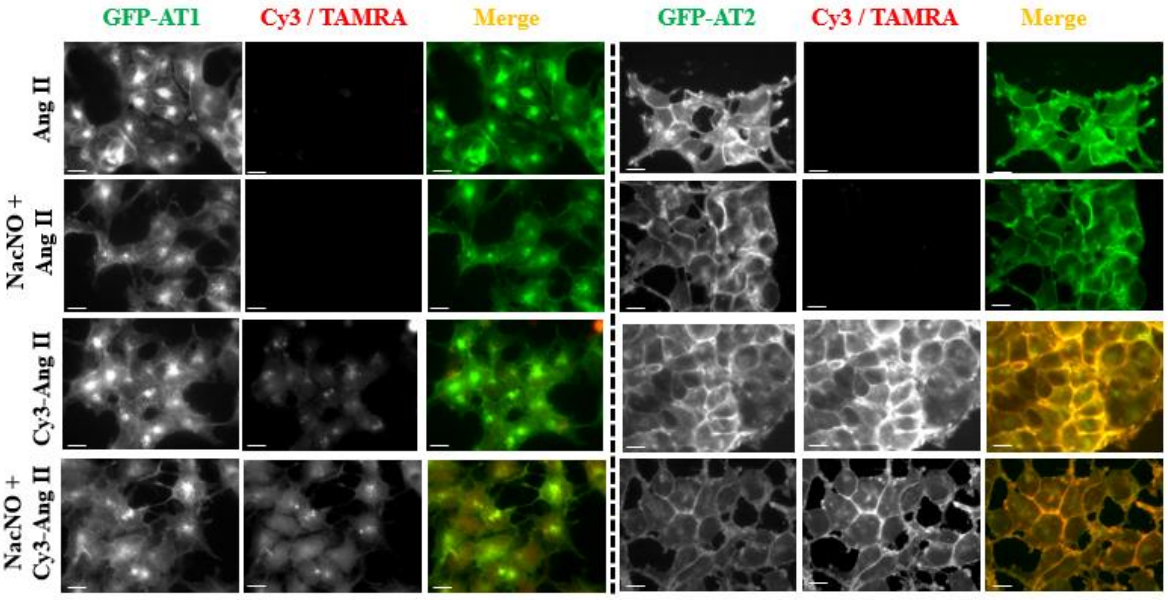


Figure 45 : Images de microscopie en épifluorescence représentatives de la localisation des récepteurs GFP-AT_1 ou GFP-AT_2 après prétraitement ou non au NacNO et stimulation à des agonistes. Les cellules HEK 293 surexprimant GFP-AT_1 ou GFP-AT_2 sont fixées prétraitées 30 minutes avec 300 µM de NacNO ou avec du tampon HEPES (0,1% BSA) et activées 30 minutes par l'Ang II (30nM) ou la Cy3-Ang II (300nM). Images représentatives de 1 expérience. Barre d'échelle dans les images, 10µm.

Les premiers tests cellulaires, effectués sur cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_1, reflètent une conservation des voies des protéines G_q et des β-arrestines ainsi que l'internalisation des récepteurs après un prétraitement à des donneurs de NO et activation des récepteurs avec un agoniste.

II. Etude des effets de la *S*-nitrosation sur la vasoréactivité de l'artère *ex vivo*

L'impact des donneurs de NO sur les récepteurs AT_1 a été étudié ex vivo sur des artères cérébrales moyennes de rats. Les artères ont été prétraitées ou non par du GSNO à une concentration de 2.10^{-6}M pendant 30 minutes. Après un rinçage avec du PSS pendant 30 minutes l'Ang II ou l'agoniste fluorescent Cy3-Ang II sont ajoutés à concentrations croissantes de 1pM à 1µM et la contraction artérielle est mesurée afin d'établir des courbes concentration-réponse (**Figure 46**).

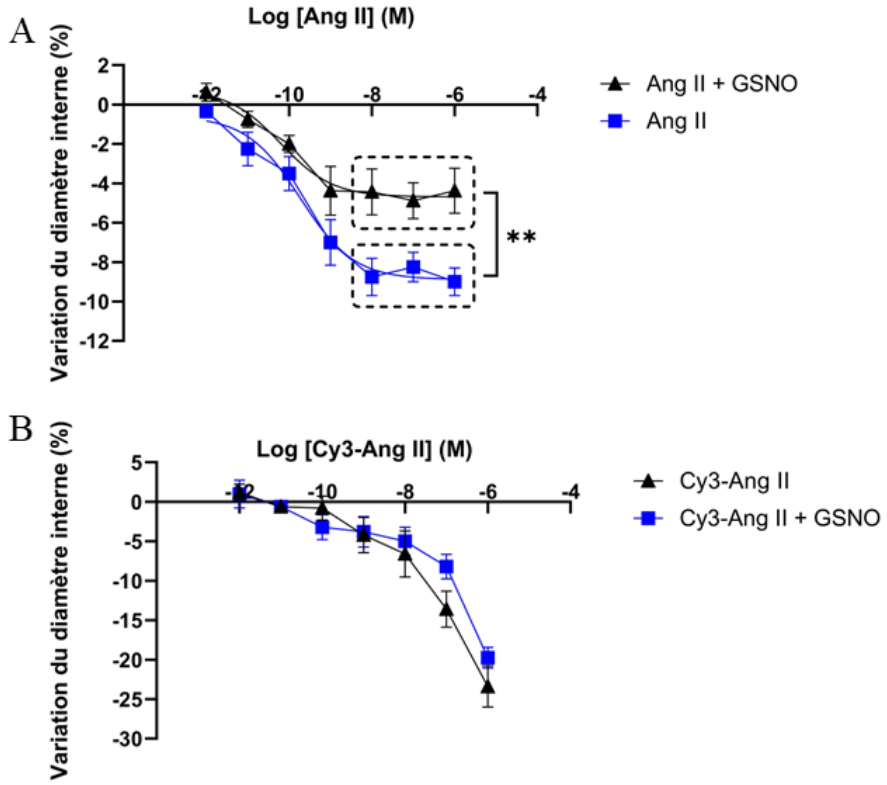


Figure 46 : Mesures des réponses contractiles des artères cérébrales moyennes à différents ligands avec ou sans prétraitement au GSNO. Les courbes concentration-réponse de l'Ang II (A) ou du ligand fluorescent Cy3-Ang II (B) ont été obtenues après exposition (30min) à du PSS ou du GSNO (2.10^{-6}M). Les graphiques sont représentatifs de minimum n = 3 expériences distinctes. Les changements de diamètre interne (%) sont exprimés en moyenne ± SEM. La modélisation de Hill a été utilisée et une ANOVA deux facteurs (traitement, concentration) a été utilisée pour calculer les valeurs P, *P < 0,05 (test post-hoc de Tukey) (Graphpad Prism 8.0.2)

D'abord, l'Ang II induit une contraction artérielle avec une EC_{50} de l'ordre de 1.10^{-10}M et un E_{max} de -9%, ce que nous retrouvons dans d'autres études internes de l'équipe. Les artères prétraitées avec du GSNO ont une contraction induite par l'Ang II significativement moins importante que celles non traitées. Un prétraitement des artères cérébrales inhibe la vasoconstriction par l'Ang II confirmant les résultats antérieurs de l'équipe (Bouressam *et al.*, 2019). Précédemment, une abolition de la réponse contractile était observée alors que nous retrouvons ici une légère contraction qui persiste. Ceci peut être dû au manque de stabilité du GSNO qui se dégrade facilement et a pu être endommagé pendant le transport entre le laboratoire et l'animalerie ACBS, impactant la concentration finale de GSNO utilisée en prétraitement. De plus, un changement significatif de contraction est plus difficile à observer du fait de l'amplitude de la réponse à l'Ang II qui reste subtile mais dont l'affinité est plus importante que d'autres vasoconstricteurs, comme la phényléphrine ou la sérotonine.

Une contraction artérielle est également observée pour le ligand fluorescent Cy3-Ang II jusqu'à 10nM. Au-delà la contraction observée est due en partie à l'impact de la Cyanine 3 AT_1-indépendant directement sur les artères, décrit également dans les travaux précédents. Les artères prétraitées avec du GSNO ont une contraction induite par la Cy3-Ang II qui semble moins importante mais n'est significativement pas différente. Il est possible que la contraction importante de l'artère due à la Cyanine 3 masque les effets du GSNO observés avec l'Ang II.

Conclusion

Dans cette première étude de l'impact de donneurs de NO sur la signalisation des récepteurs AT_1, des résultats mitigés sont obtenus. En effet, nous retrouvons l'inhibition de la voie G_q des récepteurs AT_1 après un prétraitement des artères à un donneur de NO. Cependant au niveau cellulaire ces résultats ne sont pas observés.

Au niveau cellulaire, un prétraitement avec le GSNO ou le NacNO ne semble pas impacter la signalisation des récepteurs AT_1 dans ces conditions expérimentales. Le modèle cellulaire *in vitro* utilisé ne semble pas reproduire les données observées *ex vivo* malgré 2 publications d'autres laboratoires avec les mêmes cellules (Leclerc *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2021).

La voie des β-arrestines et l'internalisation sont conservées après un prétraitement avec le NacNO ou le GSNO. Cependant, comme la *S*-nitrosation des récepteurs AT_1 par ces donneurs de NO n'est pas confirmée, nous ne pouvons pas être certains que le prétraitement par les RSNO a bien induit la *S*-nitrosation d'AT_1. En effet, cette possibilité d'une « inefficacité » des RSNO à induire la *S*-nitrosation sur ces cellules n'est pas écartée et pourrait expliquer le maintien de la signalisation complète des récepteurs AT_1.

Les données observées sur artères cérébrales confirment l'inhibition de la voie des protéines G_q des récepteurs AT_1 après un prétraitement des artères par du GSNO. Ces données confirment les résultats antérieurs de l'équipe (Bouressam *et al.*, 2019) mais avec un effet plus faible.

Pour conclure, l'inhibition de la vasoconstriction des artères cérébrales par un prétraitement au GSNO a été reproduite mais dans une moindre mesure. Le modèle cellulaire, pourtant utilisé dans d'autres études, ne permet pas de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de la vasoconstriction observée sur tissus. D'autres expériences sur cellules sont nécessaires pour déterminer si les RSNO ont un impact sur les signalisations du récepteur AT_1.

Discussion générale

L'objectif principal des travaux présentés dans cette thèse était de caractériser de nouveaux ligands fluorescents comme traceurs permettant d'étudier les récepteurs AT_1 de l'Ang II sur cellules et tissus. A long terme, ces traceurs pourront servir à étudier l'impact de la *S*-nitrosation induite par des donneurs de NO sur la signalisation des récepteurs AT_1. Comme il l'a été mentionné précédemment, peu de ligands fluorescents de AT_1 sont disponibles sur le marché pour l'étude de ce récepteur et leur caractérisation pharmacologique n'est pas précise. L'intérêt de développer des ligands fluorescents est qu'avec une molécule traceur il est possible d'étudier le récepteur cible dans une grande variété d'expériences, de la microscopie de molécule unique jusqu'à potentiellement l'analyse d'interaction récepteur/ligand par BRET *in vivo* (White *et al.,* 2019; Soave *et al.*, 2019, 2021)

Le récepteur AT_1 activé par l'Ang II déclenche les effets les plus connus de l'activation du SRA tandis que la stimulation de AT_2 a des effets opposés. L'équilibre physiologique entre ces deux récepteurs a été détaillé dans une récente revue de notre équipe (Colin *et al.*, 2023). Dans la plupart des situations physiopathologiques, l'activation du récepteur AT_1 est prédominante et délétère et atténue les effets bénéfiques opposés induits par le récepteur AT_2.

Les effets vasoconstricteurs induits par le récepteur AT_1 sur les artères cérébrales, consécutifs à l'activation de la protéine Gq, peuvent réduire la perfusion cérébrale en cas d'accident vasculaire cérébral. En outre, l'activité du récepteur AT_1 est directement régulée par la voie des β-arrestines impliquée dans l'internalisation du récepteur. Les β-arrestines peuvent également agir comme des protéines d'échafaudage favorisant les cascades de signalisation alternatives de AT_1 avec des effets protecteurs potentiels. Le développement d'agonistes AT_1 biaisés envers les β-arrestines, capables d'activer sélectivement la voie de transduction de la β-arrestine plutôt que la voie G_q, semble prometteur et pourrait conduire à de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'implication du récepteur AT_1 dans les maladies cérébrovasculaires ainsi que l'intérêt des signalisations alternatives, induites par les agonistes AT_1 biaisés pour la β-arrestine et potentiellement par la *S*-nitrosation des récepteurs AT_1, ont fait l'objet d'une revue de notre équipe (Delaitre *et al.*, 2021). Leur impact sur l'internalisation de AT_1 dans les artères cérébrales doit être évalué, mais le manque d'outils hautement sélectifs pour cibler AT_1 constitue un obstacle majeur.

Nous avons présenté, dans la première partie des travaux expérimentaux de cette thèse, une série de ligands fluorescents développés en coopération avec des chercheurs de deux laboratoires de chimie, le Dr. Boisbrun du L2CM et le Dr. Acherar du LCPM. Ces dérivés rendus fluorescents basés sur l'Ang II agoniste de AT_1 ou sur le TVR027 agoniste AT_1 biaisé envers la voie β-arrestine (TRV027) et un dérivé fluorescent de l'antagoniste sélectif de AT_1 par rapport à AT_2, le Losartan-Cy3, nous permettent de suivre les récepteurs AT_1 et/ou les récepteurs AT_2.

Par la suite, la deuxième partie des travaux expérimentaux présentés dans ce manuscrit confirment nos résultats antérieurs, à savoir qu'un prétraitement d'artères cérébrales moyennes par un donneur de NO inhibe la vasoconstriction induite par les récepteurs AT_1. Cependant ces résultats ne sont pas retrouvés dans nos expériences cellulaires, malgré des publications d'autres équipes sur modèle cellulaire, illustrant la difficulté de travailler avec des donneurs de NO et d'étudier la *S*-nitrosation.

La caractérisation pharmacologique de nouveaux ligands fluorescents traceurs des récepteurs de l'angiotensine

Les peptides fluorescents dérivés de l'Ang II conservent la même fonctionnalité que le peptide natif avec une spécificité pour les deux types de récepteurs de l'Ang II, AT_1 et AT_2. Une perte de l'affinité de ces ligands est observée, comme c'est le cas pour de nombreux ligands fluorescents, testés dans la littérature, qui montrent une diminution de 2 à 3 log des traceurs fluorescents pour leur récepteur cible (Tadevosyan *et al.*, 2015). Cependant, l'utilisation de ces traceurs fluorescents est possible sur cellules jusqu'à 300nM ce qui permet d'étudier les récepteurs AT_1, tant leur localisation que leurs fonctions. Sur tissus artériels, les agonistes couplés à la Cyanine 3 induisent une vasoconstriction similaire à l'Ang II mais ont une limite d'utilisation à 10nM car, à plus forte concentration, la Cyanine 3 elle-même impacte la contraction des artères indépendamment du récepteur AT_1.

Le peptide fluorescent Cy3-TRV027 a une sélectivité pour les récepteurs AT_2 par rapport aux récepteurs AT_1 jusqu'à 100nM. A plus fortes concentrations les peptides fluorescents dérivés de TRV027 se lient également aux récepteurs AT_1 et perdent leur biais de signalisation β-arrestine strict et commencent à activer la voie G_q. Très récemment, il a été montré dans la littérature que la surexpression de récepteurs pouvait modifier la spécificité des agonistes AT_1 biaisés envers les β-arrestines conduisant à un gain de fonctions et à une perte du biais (A. Li *et al.*, 2023). En effet, dans cette étude, les cellules U20S-TetOn-AT_1 surexprimant les récepteurs AT_1 induisent une libération de calcium lorsque les récepteurs sont activés par les ligands connus comme biaisés envers les β-arrestines, le TRV027, le TRV023, le TRV026 ou le SII à 10^{-5}M à une forte densité de récepteurs. Dans notre étude, cette hypothèse semble écartée car la même lignée stable de cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_1 a été utilisée pour le TRV027 et ses analogues fluorescents or le TRV027 conservait bien son biais β-arrestine jusqu'à 1µM. Il est prévu d'étudier ces dérivés fluorescents dans le laboratoire du Dr. Karen Martinez afin d'établir des Kd et de les corréler avec la densité de récepteurs AT_1 et AT_2 mesurée. Ainsi nous pourront déterminer comment la surexpression des récepteurs AT_1 impacte la liaison et la signalisation des peptides fluorescents. La fragilité du biais de signalisation des agonistes biaisés β-arrestines est mise en avant dans la littérature et l'ajout d'un fluorophore impacte donc également la spécificité des agonistes AT_1 biaisés envers les β-arrestines à partir de 1µM.

L'antagoniste fluorescent Losartan-Cy3 est le traceur avec les résultats les plus prometteurs. En plus de conserver son caractère antagoniste des récepteurs AT_1 et d'avoir un K_D avoisinant les 30nM, il est sélectif des récepteurs AT_1 par rapport aux récepteurs AT_2 et permet un suivi en imagerie dès 10nM. Des études *ex vivo* sur ACM sont à prévoir pour estimer s'il permet la même inhibition de la vasoconstriction artérielle que le losartan.

Nous avons donc à notre disposition des traceurs fluorescents se liant aux récepteurs AT_1 et AT_2, dont l'un est sélectif des récepteurs AT_2 par rapport aux récepteurs AT_1 et un autre sélectif des récepteurs AT_1 par rapport aux récepteurs AT_2. Ils permettent de localiser les récepteurs et d'étudier la signalisation des récepteurs AT_1. Ils pourront donc être utilisés dans la suite du projet orientée sur l'impact de la *S*-nitrosation du récepteur AT_1 sur sa signalisation.

Limites de détection

Nous avons rencontré des limites de détection pour de nombreuses méthodes, que ce soit dû à l'extinction de fluorescence du fluorophore accepteur dépendante de la Cyanine 3 à partir d'une concentration de 10^{-5}M lors des expériences de BRET, ou le bruit de fond important sur les cellules HEK 293 contrôles en cytométrie en flux. Ces limitations nous ont empêché de monter en concentration de ligands fluorescents dérivés de la Cy3 ou de la TAMRA afin d'atteindre un plateau de saturation et de déterminer les K_D des ligands ou leur EC_{50} de manière précise. Cependant, la nouvelle méthode développée par l'équipe de Karen Martinez combinant les tests basés sur la fluorescence et l'analyse quantitative d'images de cellules uniques a permis de déterminer le K_D du Losartan-Cy3 malgré une liaison non spécifique importante du ligand à partir de 300nM et l'absence de saturation de la courbe. Il serait intéressant de tester les autres ligands fluorescents par l'intermédiaire de cette méthode afin d'estimer leur constante d'affinité.

Pour contrebalancer les limites de détection contraignantes, il est intéressant de noter que toutes les techniques utilisées pour caractériser les ligands ont indiqué un même ordre de grandeur pour le K_D du Losartan-Cy3. Le K_D calculé par l'intermédiaire des mesures de liaison par fluorescence à la membrane plasmique est environ de 30nM. La sélectivité mesurée en cytométrie en flux montre le Losartan-Cy3 sélectif pour les récepteurs AT_1 à cette même concentration. Les mesures effectuées en BRET estiment également l'IC_{50} de l'antagoniste fluorescent à cette concentration. Malgré les deux phases distinctes observées avec la méthode de réponse calcique, le pA2 et le Ki calculé se rapprochent également de ce résultat. Ainsi les méthodes et protocoles qui ont servi à caractériser les nouveaux dérivés fluorescents donnent des résultats similaires, confirmant leur pertinence.

Augmentation de l'EC_{50} avec les ligands fluorescents

Les ligands fluorescents dérivés de l'Ang II ont une augmentation de l'EC_{50} pour activer les récepteurs AT_1 du même ordre que celle retrouvée dans d'autres études de ligands fluorescents (Tadevosyan *et al.*, 2015). L'ajout de l'espaceur entre le fluorophore et le peptide, permettant en théorie d'éloigner le fluorophore du site de liaison du ligand, n'améliore pas l'EC_{50} mesurée ni en réponse calcique ni dans le recrutement des différents effecteurs de la signalisation de AT_1 ou de son internalisation. En effet, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que cet espaceur se soit replié et n'éloigne donc pas le fluorophore du peptide. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant les ligands fluorescents ayant ou non l'espaceur dans des études de liaison récepteur/ligand par transfert d'énergie où l'efficacité de transfert de FRET entre les récepteurs fluorescents et les ligands fluorescents à l'équilibre sera étudiée.

Un encombrement stérique peut donc être présent au niveau du site de liaison expliquant cette perte d'affinité. D'autres études antérieures mettent en avant l'altération des propriétés de liaison du ligand aux récepteurs AT_1 lors d'une modification N-terminale des récepteurs AT_1 avec une perte d'affinité de l'ordre de 2 log de l'Ang II pour le récepteur AT_1 (Wingler *et al.*, 2019b; Tóth *et al.*, 2021) illustrant l'importance de l'extrémité N-terminale du site de liaison pour le ligand (H. Zhang *et al.*, 2015b). La modélisation du site de liaison du récepteur AT_1 avec les différents dérivés fluorescents étudiés permettrait de déterminer leurs interactions, notamment les interactions potentielles de l'espaceur ajouté dans la poche de liaison orthostérique du récepteur. Cette modélisation pourrait également être utile dans la synthèse de nouveaux ligands fluorescents afin d'éviter les potentiels encombrements stériques et limiter en partie une perte d'affinité pour les récepteurs AT_1.

Comparaison des différents fluorophores Cy3 et TAMRA utilisés

Nos dérivés fluorescents sont couplés au fluorophore Cy3 et le ligand fluorescent commercial utilise la TAMRA. Ces deux fluorophores ont des caractéristiques proches avec une taille semblable, un spectre d'excitation et un spectre d'émission proches. Ces deux fluorophores ont été étudiés avec des paramètres d'acquisition identiques lors des expériences, cependant ils ne donnent pas exactement les mêmes résultats, bien qu'ils soient tous les deux des traceurs pour les récepteurs AT_1 et les récepteurs AT_2 de l'angiotensine.

Ces deux traceurs fluorescents ont des EC_{50} et E_{max} similaires obtenues en mesurant la réponse calcique. Ils recrutent également les mêmes effecteurs des récepteurs AT_1 avec une affinité et une efficacité similaire.

En cytométrie en flux le ligand TAMRA-Ang II induit un bruit de fond plus faible que le Cy3-Ang II à la même concentration. Ce même constat est observé en microscopie d'épifluorescence montrant une liaison non spécifique plus élevée de la Cy3 par rapport à la TAMRA pour ces deux méthodes. En effet, la TAMRA a un déplacement de Stokes plus élevé, pouvant limiter la contamination du signal d'émission, donc le bruit de fond. Cependant, la colocalisation entre la TAMRA-Ang II et les récepteurs GFP-AT_1 est moins importante que celle observée pour la Cy3-Ang II avec les récepteurs GFP-AT_1. De plus, la Cy3-Ang II donne un signal de fluorescence plus intense que la TAMRA-Ang II avec les récepteurs GFP-AT_2 à la membrane plasmique. Peut-être est-ce dû au fait que les propriétés de fluorescence des fluorophores sont dépendantes de l'environnement.

Les tests *ex vivo* ont montré un comportement différent des fluorophores sur les artères cérébrales moyennes de rat. Une contraction des artères, AT_1 indépendante, est induite par la Cy3 à partir de 100nM alors que la TAMRA ne semble pas impacter la vasomotricité d'elle-même. Bien que le ligand TAMRA-Ang II ait un comportement proche de l'Ang II, les courbes dose/réponse obtenues pour la contraction des artères et pour le recrutement des protéines G_q ne ressemblent pas à une courbe sigmoïde.

Il serait intéressant de tester de nouveaux fluorophores, ayant de meilleures propriétés de fluorescence, sur les peptides afin de limiter les désagréments que nous avons eu lors de ce projet. Le changement chimique du greffage des fluorophores aux peptides peut aussi être discuté afin de permettre une utilisation optimale des sondes dans des techniques de fluorescence (Maujean *et al.*, 2023a; Maujean *et al.*, 2023b). La modélisation moléculaire pourrait aider au choix de ces nouveaux fluorophores. Certains fluorophores peuvent participer à la liaison du ligand dans le site de liaison du récepteur. Ainsi la dynamique de la molécule fluorescente sur les récepteurs AT_1 ou AT_2 pourrait affiner les choix des fluorophores.

Etudes fonctionnelles AT_2 envisagées

Les études de cytométrie en flux et l'observation des cellules en microscopie à épifluorescence nous ont permis de caractériser la liaison des différents dérivés fluorescents sur les récepteurs AT_2. Ainsi, les dérivés fluorescents de l'Ang II, et surtout le dérivé fluorescent de TRV027, Cy3-TRV027, pourraient être utilisés comme outils fluorescents dans des tests de liaison sur les récepteurs AT_2. Par exemple, il pourrait être envisagé d'étudier l'impact de donneurs de NO sur la liaison des dérivés fluorescents aux récepteurs AT_2. Ainsi nous pourrions établir si, *in vitro*, l'exposition à un donneur de NO impacte les récepteurs. Ces ligands fluorescents pourront être utilisés de manière plus générale comme traceur dans des mesures de liaison surtout si l'on peut détecter du FRET entre le GFP-AT_2 et le ligand Cy3-TRV027 ou du BRET entre AT_2-Nluc et Cy3-TRV027 ce que nous n'avons pas eu le temps de tester.

Les voies de signalisation du récepteur AT_2 ne sont pas clairement établies dans la littérature et sont complexes à étudier. Ce récepteur, appartenant à la famille des RCPG de par sa structure et sa séquence, a une signalisation de la voie des protéines G remise en question. De plus, ce récepteur ne recrute pas les β-arrestines et ne s'internalise pas (Johnstone *et al.*, 2022). Comme l'identification des effecteurs directs de ce récepteur reste un défi pour le monde scientifique, la mise en place d'études fonctionnelles du récepteur AT_2 est problématique. Nos essais de tests fonctionnels sur des cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_2 et sur des cellules PC 12, lignée cellulaire de phéochromocytome de rat supposées exprimer les récepteurs AT_2, n'ont apporté aucun résultat concluant. La libération calcique a été investiguée suite à l'activation des récepteurs AT_2 par différents agonistes ou l'activation des récepteurs muscariniques endogènes par de l'acétylcholine, utilisée comme contrôle positif. La seule libération calcique mesurée a été obtenue après activation des récepteurs muscariniques avec l'acétylcholine sur les cellules HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_2. Une étude sur cellules endothéliales humaines est envisagée en collaboration avec l'équipe du Dr Demiot de l'UNILIM de l'Université de Limoges. Des études de liaison ligand/récepteur par microscopie confocale sont également envisagées pour déterminer l'affinité des ligands fluorescents pour les récepteurs AT_2, comme cela a été fait avec le Losartan-Cy3 pour les récepteurs AT_1.

Des tests fonctionnels des récepteurs AT_2 au niveau tissulaire pourront être réalisés en étudiant la vasodilatation d'artères cérébrales moyennes *ex vivo*. Les artères seront préalablement contractées avec une solution potassique, qui sera maintenue tout au long de l'expérience et les récepteurs AT_1 seront bloqués avec un excès de Losartan (10^{-5}M). Ainsi nous pourront étudier l'impact des différents ligands fluorescents dérivés de l'Ang II et de TRV027 sur la dilatation des ACM. Cette expérience sera limitée en termes de concentrations pour les dérivés fluorescents Cy3, car le fluorophore Cy3 induit une contraction AT_1-indépendante à partir de 100nM.

Tracer les récepteurs endogènes

Les dérivés fluorescents reconnaissent et se lient aux récepteurs AT_1 et/ou AT_2 dans nos modèles cellulaires surexprimant ces récepteurs. Le nouvel enjeu de ces ligands fluorescents serait de pouvoir détecter les récepteurs endogènes au niveau cellulaire. Dans les tissus artériels, nos dérivés fluorescents basés sur l'Ang II se lient aux récepteurs AT_1, comme le montre la vasoconstriction des artères cérébrales moyennes lorsque l'on ajoute 10nM de ces ligands, ainsi ils se lient aux récepteurs endogènes des artères. Cependant, dans les lignées cellulaires, l'expression endogène des récepteurs AT_1 et AT_2 est plus faible, donc plus difficile à détecter.

De nouveaux modèles cellulaires pourraient être utilisés, exprimant les récepteurs de manière endogène, comme des CMLV ou les lignées A-10 ou PC-12, malgré les résultats peu prometteurs que nous avons obtenus avec ces lignées cellulaires. Avec les techniques et protocoles mis au point lors de ce projet de thèse, nous avons une bonne base pour commencer les investigations sur la liaison des dérivés fluorescents aux récepteurs endogènes, en comparaison avec l'Ang II non marquée.

Quantification de l'internalisation des récepteurs

La quantification de l'internalisation des récepteurs AT_1 par les ligands fluorescents mesurée en BRET n'a pas été possible avec les résultats présentés en partie à cause de la limite de détection constatée en BRET. Cependant, il serait possible de quantifier l'internalisation par l'intermédiaire de la cytométrie en flux en mesurant une diminution des récepteurs GFP-AT_1 à la surface des cellules après leur activation par ces différents ligands fluorescents. Une corrélation entre la GFP et la Cy3 mesurée pourrait nous permettre d'établir des courbes dose-réponse de l'internalisation des récepteurs. Cette technique a été utilisée par notre équipe pour quantifier les récepteurs AT_1 à la surface de cellules HEK surexprimant GFP-AT_1 pour montrer que le GSNO n'impacte pas l'internalisation des récepteurs AT_1 induite par l'Ang II (Bouressam *et al.*, 2019).

Utilisation de la TAMRA-Ang II pour étudier les récepteurs AT_1 et AT_2

Le ligand TAMRA-Ang II, dont l'EC_{50} est similaire à celle de la Cy3-Ang II, est déjà utilisé dans quelques études, notamment pour localiser et quantifier les récepteurs AT_1 dans des tissus musculaires animaux (Deminice *et al.*, 2020; Murase *et al.*, 2020). En effet, l'équipe de Deminice a pu identifier les récepteurs AT_1 sur des coupes histologiques de muscles squelettiques et du diaphragme de rats à l'aide du ligand TAMRA-Ang II à 5µM. Cette liaison semble spécifique car les mêmes expériences en présence d'un excès de Losartan (1mM) ont été réalisées et ne montrent pas de liaison du ligand.

Deux équipes utilisent le ligand TAMRA-Ang II comme traceur pour des études cellulaires de pharmacologie, celle des Dr Kevin Pfleger en collaboration avec Dr Stephen Hill et celle du Dr László Hunyady. L'équipe de recherche du Dr Kevin Pfleger et Dr Stephen Hill utilise ce ligand TAMRA-Ang II comme traceur pour étudier la liaison de ligands non fluorescents au récepteur AT_1, notamment des tests de nanoBRET par compétition avec le récepteur Nluc-AT_1 en extracellulaire et la TAMRA-Ang II comme accepteur de BRET (Stoddart *et al.*, 2015). Cette équipe a également montré l'utilisation potentielle du ligand TAMRA-Ang II dans des tests de liaison permettant de détecter les hétéromères dans les cellules vivantes en temps réel (Johnstone *et al.*, 2021; Johnstone & Pfleger, 2021). Des

expériences de BRET ont mis en évidence des rôles fonctionnels dû à l'hétéromérisation du récepteur AT_2 avec le récepteur B2 (Johnstone *et al.*, 2022).

En plus de prouver que l'utilisation de ligands fluorescents comme la TAMRA-Ang II est possible dans des techniques basées sur la fluorescence, ces études mettent en avant la possibilité de détecter la formation d'hétéromères de RCPG. L'équipe de Karen Martinez étudie également l'oligomérisation des RCPG dans des systèmes hétérologues en déterminant la densité de récepteurs de manière très précise à la surface des membranes plasmiques (Brinkenfeldt *et al.*, 2023). Dans la littérature, il est décrit que les modifications fonctionnelles consécutives de la dimérisation des récepteurs AT_1 et AT_2 peuvent impacter la physiologie de ces derniers. De nouvelles investigations avec cette technique innovante pourraient renseigner sur l'impact que peut avoir la dimérisation des récepteurs en situation physiopathologique. Cela pourrait aussi contribuer à l'étude de la signalisation générale des RCPG, sachant que certains peptides peuvent se lier préférentiellement à leurs récepteurs lorsqu'ils sont dimérisés ou avoir d'autres interactions encore non décrites.

L'équipe du Dr László Hunyady a utilisé la TAMRA-Ang II comme traceur dans des mesures de liaison récepteur/ligand par BRET pour quantifier la liaison des ligands aux récepteurs non modifiés en utilisant des biocapteurs Gaussia luciferase (GLuc) comme donneur d'énergie (Tóth *et al.*, 2021). Les biosenseurs GLuc-PM ou la NanoLuc-PM tapissent le feuillet externe de la membrane plasmique des cellules et le BRET mesuré se fait entre GLuc-PM à la membrane plasmique et les ligands fluorescents liés à leurs récepteurs. Ainsi des courbes de liaison compétitive avec 1µM de TAMRA-Ang II et des concentrations croissantes de candésartan ont été réalisées afin de déterminer des Ki. Nous avons testé ces biosenseurs avec nos ligands fluorescents mais le signal de BRET de liaison spécifique constaté était très faible. Leurs résultats sont en accord avec notre étude, montrant une difficulté de déterminer des liaisons spécifiques dû à l'important bruit de fond de la liaison non spécifique, due à des collisions aléatoires.

Avec l'utilisation de la TAMRA-Ang II, l'équipe de Hunyady met également en avant un biais de la signalisation de la β-arrestine dépendant du taux de dissociation du ligand et de l'activation des protéines G au niveau des endosomes (Tóth *et al.*, 2023). Ces résultats, retrouvés dans BioRxiv, sont en cours de publication mais semblent prometteurs quant à l'émergence du concept que l'endocytose est un point clé pour la signalisation biaisée des RCPG dépendante du temps.

Ces équipes de recherche utilisent le ligand TAMRA-Ang II pour étudier les récepteurs AT_1 et AT_2 dans leurs expériences. Ayant des caractéristiques pharmacologiques similaires au ligand Cy3-Ang II, cela encourage à l'utilisation de ce dérivé fluorescent aux mêmes fins exploratoires.

L'étude du ligand TAMRA-Ang II sur la vasoconstriction des artères cérébrales moyennes doit se poursuivre. Bien que l'effet artéfactuel de la Cyanine 3 sur la contraction ne soit pas retrouvé avec la TAMRA, la courbe dose-réponse du ligand TAMRA-Ang II n'a pas l'allure d'une courbe de Hill, retrouvée pour l'Ang II, mais plutôt une allure linéaire. Des investigations approfondies sont envisagées afin de déterminer les mécanismes induisants la contraction artérielle spéciale de la TAMRA mais également de la Cy3.

Commercialisation de nouveaux outils fluorescents pour les récepteurs AT_1

Très récemment, des antagonistes fluorescents des récepteurs AT_1 de l'angiotensine II ont été commercialisés par le groupe Celtarys research, le CELT-252 et le CELT-145. Il s'agit de 2 antagonistes fluorescents dont la validation pharmacologique a été établie par des études de radioliaison. Leur K_i, de 39nM et 160nM respectivement, sont similaires au K_D de notre ligand Losartan-Cy3 avoisinant les 30nM. Peu d'informations sont disponibles concernant l'antagoniste utilisé ou la structure de leurs sondes. Il serait intéressant de collaborer avec cette entreprise pour caractériser entièrement leurs sondes fluorescentes dans nos essais cellulaires et les comparer à notre traceur Losartan-Cy3.

Le développement et la commercialisation de ces sondes prouvent la demande en outils fluorescents pour étudier AT_1 et la faisabilité et l'utilité des dérivés fluorescents, nous encourageant à continuer de travailler avec nos traceurs fluorescents prometteurs.

Effet des donneurs de NO sur la réponse fonctionnelle aux agonistes du récepteur AT_1

L'absence de corrélation entre les résultats cellulaires et tissulaires sur l'impact des donneurs de NO sur la signalisation G_q des récepteurs AT_1 nous amène à de nombreuses réflexions. Bien qu'il ne s'agisse que de premières expériences sur cellules, comparé aux nombreux résultats antérieurs de l'équipe sur les artères cérébrales moyennes, nous ne pouvons conclure de l'effet de donneurs de NO sur la signalisation des récepteurs AT_1.

Etudes *in vitro* de l'impact des donneurs de NO sur AT_1

L'absence d'impact des donneurs de NO *in vitro* sur la signalisation G_q, la signalisation β-arrestine et l'internalisation des récepteurs, peut être remise en question sur plusieurs points. En effet, il s'agit de premiers tests dont la répétition des expériences n'a pas été effectuée. Il est donc possible que pour ces expériences le GNSO et le NacNO aient été dégradés au cours de la manipulation et n'aient pas pu *S*-nitroser les récepteurs AT_1. La gamme de concentration de GSNO et NacNO n'était peut-être pas assez étendue.

D'autres études montrent la possibilité d'une inhibition de la voie des protéines G de AT_1 par un prétraitement à un donneur de NO, cependant l'effet du GSNO observé dans ces études restait relativement faible (Leclerc *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2021). En mesurant la mobilisation calcique intracellulaire, l'équipe de Pinheiro avait observé une légère baisse de la libération calcique lorsque les cellules HEK 293 surexprimant de manière transitoire les récepteurs AT_1 étaient prétraitées pendant 15 minutes avec 1mM de GSNO et activés par l'Ang II (Pinheiro *et al.*, 2021). Pour cette technique, nous nous sommes cantonnés à une seule expérience avec un prétraitement de 300µM de NacNO, montrant un début de diminution de libération calcique. Il serait intéressant de continuer ces expériences avec une concentration plus importante de NacNO et de tester le GSNO pour déterminer si nous retrouvons une baisse significative de la libération calcique consécutive de la voie des protéines Gq des récepteurs AT_1. Nous avons réalisé les expériences de libération calcique à 25°C, il est possible qu'à cette température la S-nitrosation ne se produise pas. En effet, dans la littérature, les expériences décrivant l'impact de donneurs de NO, *in vitro* ou *ex vivo*, se font à 37°C.

Afin de vérifier si, dans nos conditions expérimentales, les récepteurs AT_1 sont bien nitrosés, nous pourrions réaliser ces mêmes expériences avec des cellules surexprimant les récepteurs AT_1 mutés pour la cystéine 289 (plasmide donné par l'équipe du Dr. Gaétan Guillemette) et comparer ces résultats avec nos résultats obtenus sur cellules surexprimant les récepteurs AT_1.

Il est également envisagé de détecter la nitrosation du récepteur AT_1 par la technique du biotin switch couplée à la spectrométrie de masse ou western blot qui permettrait d'identifier la ou les cystéines nitrosées (Belcastro *et al.*, 2017). Cette technique, utilisée par notre équipe, permet de purifier les protéines nitrosées qui sont ensuite identifiées par western blot, comme cela a été le cas des récepteurs GFP-AT_1 (Bouressam *et al.*, 2019). Avec le nouvel anticorps anti-AT_1 prometteur, nous pourrions essayer de suivre le récepteur endogène dans les artères isolées (Murphy *et al.*, 2019; Deminice *et al.*, 2020).

Comme l'effet de ces donneurs de NO sur la réponse calcique en cellule hétérologue est faible, nous ne pouvons pas conclure que le prétraitement de RSNO conserve la voie β-arrestine et l'internalisation des récepteurs. Il serait envisageable d'étudier et quantifier l'internalisation des récepteurs AT_1 et même AT_2 en cytométrie en flux pour établir si les RSNO impactent cette fonction, comme cela avait été initié dans l'équipe (Bouressam *et al.*, 2019). Il est envisagé d'étudier cette internalisation directement sur les artères cérébrales moyennes de rats par l'intermédiaire des dérivés fluorescents que nous avons caractérisés. En effet, un suivi des récepteurs AT_1 par un traceur fluorescent, tel que le Losartan-Cy3 ou la TAMRA-Ang II, permettrait de constater s'il est internalisé ou non, soit en suivi en temps réel, soit en histologie en marquant les récepteurs AT_1 comme l'a déjà fait l'équipe de Deminice avec le ligand TAMRA-Ang II (Deminice *et al.*, 2020). Cela nous permettrait également de confirmer sur tissus que les ligands fluorescents TAMRA-Ang II et Losartan-Cy3 peuvent servir de traceurs des récepteurs AT_1.

Etudes *ex vivo* de l'impact des donneurs de NO sur AT_1

Les données observées sur artères cérébrales confirment l'inhibition de la voie des protéines G_q des récepteurs AT_1 après un prétraitement des artères par du GSNO. Cela coïncide avec les résultats antérieurs de l'équipe (Bouressam *et al.*, 2019) et avec la littérature où nous retrouvons une inhibition de la contraction d'anneaux aortiques prétraités avec du nitrate de sodium SNP (Pinheiro *et al.*, 2021). D'après cette équipe l'inhibition de cette voie G_q pourrait être en partie due à la *S*-nitrosation d'une autre cible de la signalisation des récepteurs AT_1, la protéine PKC, ce qui l'inhiberait (Choi *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2021).

L'impact de donneurs de NO sur les récepteurs AT_2 avait été discuté dans notre équipe et des résultats non publiés montraient une abolition de la vasodilatation induite par les récepteurs AT_2 des artères cérébrales moyennes après un prétraitement au GSNO (BOURESSAM, 2018). Des approches cellulaires pourraient confirmer que les récepteurs AT_2 sont bien nitrosés, comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Jang *et al.*, 2015), et peut-être préciser le(s) mécanisme(s) impliqués dans ce phénomène.

Développement d'un ligand AT_1 donneur de NO

Un nouveau ligand-dirigé donneur de NO a été synthétisé par l'équipe du Dr Michel Boisbrun du laboratoire L2CM. Ce ligand basé sur un antagoniste des récepteurs AT_1 est développé dans le but d'effectuer la nitrosation ciblée de la cystéine 289 du récepteur AT_1. Les premiers tests pharmacologiques que j'ai effectués lors de ma thèse, montrent que ce ligand conserve la même puissance antagoniste que le Losartan et le Losartan-Cy3 étudiés précédemment (résultats non publiés, en vue d'un dépôt de brevet). L'étude *in vitro* de la libération du NO induite par ce ligand est en cours. Ce nouveau ligand donneur de NO semble très prometteur car s'il conserve un caractère antagoniste comme celui du losartan et une sélectivité pour les récepteurs AT_1 par rapport aux récepteurs AT_2 comme celle du Losartan-Cy3, ce ligand pourrait cibler spécifiquement les récepteurs AT_1 et induire la *S*-nitrosation de ce dernier. Cette approche innovante ouvre la perspective sur un nouveau potentiel thérapeutique visant l'AVC.

Conclusion

Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse montrent les différentes étapes de caractérisation pharmacologique effectuées pour valider de nouveaux outils fluorescents se liant aux récepteurs à l'angiotensine II, les récepteurs AT_1 et AT_2 dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 13 ci-dessous.

Nous nous sommes d'abord intéressés à la sélectivité des différents dérivés fluorescents pour les récepteurs AT_1 et/ou AT_2 et leur caractérisation fonctionnelle sur les récepteurs AT_1. Nous avons montré que les dérivés fluorescents basés sur l'Ang II conservent le comportement du peptide natif. Cependant l'augmentation de leur EC_{50} comparée à celle de l'Ang II démontre que l'ajout d'un fluorophore impacte l'affinité des ligands pour leur récepteur. Nous avons caractérisé un premier ligand fluorescent sélectif des récepteurs AT_1 et un autre ligand fluorescent sélectif des récepteurs AT_2.

Nous avons ensuite évalué l'impact de ces dérivés fluorescents sur les réponses vasomotrices d'artères cérébrales moyennes isolées. Nous avons observé une vasomotricité similaire des dérivés fluorescents de l'Ang II jusqu'à une concentration de 10nM, au-delà une contraction artérielle indépendante des récepteurs AT_1 induite par le fluorophore Cyanine 3 est constatée.

Pour finir, nos résultats sur l'impact d'un prétraitement de donneurs de NO sur la signalisation AT_1 montrent la difficulté de corréler les données obtenues sur artères dans un modèle cellulaire, à savoir l'inhibition de la voie des protéines G_q des récepteurs AT_1 après un prétraitement par du GSNO. Il serait nécessaire d'approfondir ces recherches pour comprendre les mécanismes cellulaires participant à l'abolition de la contraction artérielle observée sur les modèles *ex vivo* d'ACM.

Les principales perspectives de ce travail seront d'utiliser les nouveaux ligands fluorescents pour étudier les récepteurs AT_1 et les récepteurs AT_2 exprimés de manière endogène. Ces traceurs fluorescents pourront être utilisés dans de nombreuses techniques de fluorescence afin, par exemple, d'étudier l'impact de la *S*-nitrosation induite par des donneurs de NO sur la signalisation des récepteurs AT_1 au niveau cellulaire et tissulaire.

Ces projets pourront également aboutir à l'utilisation des dérivés fluorescents pour déterminer l'impact des thérapeutiques émergeants sur les récepteurs AT_1 et/ou AT_2 dans des modèles pathologiques.

Tableau 13 : Récapitulatif des effets observés des dérivés fluorescents sur les récepteurs de l'Ang II

Ligands fluorescents	**Effets attendus**		**Effets observés**		**Perspectives d'étude**
	AT_1	AT_2	AT_1	AT_2	
Cy3-Ang II / Cy3-L-Ang II	Agoniste	Agoniste	Liaison AT_1 Traceur fluorescent (imagerie) + + Test fonctionnel : agoniste Gq et β-arrestine ; internalisation ; vasoconstriction ACM (AT_1 indépendante à partir de 100nM)	Liaison AT_2 Traceurs fluorescents (imagerie) + + +	Détermination K_D pour AT_1/AT_2 au confocal Tests fonctionnels AT_2 sur ACM
TAMRA-Ang II	Agoniste	Agoniste	Liaison AT_1 Traceur fluorescent (imagerie) + Test fonctionnel : agoniste Gq et β-arrestine ; internalisation ; vasoconstriction ACM	Liaison AT_2 Traceur fluorescent (imagerie) + +	Détermination K_D pour AT_1/AT_2 au confocal Tests fonctionnels AT_2 sur ACM
Cy3-TRV027	Agoniste biaisé β-arrestine	–	Test fonctionnel : (≥ 1 µM) **agoniste Gq** et β-arrestine ; internalisation ; vasoconstriction ACM seulement AT_1 indépendante à partir de 100nM **Perte du biais β-arrestine**	Liaison **sélective AT_2** par rapport à AT_1 Traceur fluorescent (imagerie) + + +	Détermination K_D pour AT_1/AT_2 au confocal Tests fonctionnels AT_2 sur ACM Détermination liaison AT_1/AT_2 en imagerie
Losartan-Cy3	Antagoniste AT_1	–	Liaison **sélective AT_1** par rapport à AT_2 Traceur fluorescent (imagerie) + + + Antagoniste Gq et β-arrestine Effet chaperon pharmacologique	–	Tests fonctionnels AT_1 et AT_2 sur ACM

Annexes

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

Targeting the Angiotensin II Type 1 Receptor in Cerebrovascular Diseases: Biased Signaling Raises New Hopes

Céline Delaitre [1,2], Michel Boisbrun [3], Sandra Lecat [2] and François Dupuis [1,*]

1 CITHEFOR, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; celine.delaitre@univ-lorraine.fr
2 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242 CNRS/Université de Strasbourg, 300 Boulevard Sébastien Brant, CS 10413, CEDEX, 67412 Illkirch-Graffenstaden, France; sandra.lecat@unistra.fr
3 CNRS, L2CM, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; michel.boisbrun@univ-lorraine.fr
* Correspondence: Francois.Dupuis@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-372747272

Abstract: The physiological and pathophysiological relevance of the angiotensin II type 1 (AT_1) G protein-coupled receptor no longer needs to be proven in the cardiovascular system. The renin–angiotensin system and the AT_1 receptor are the targets of several classes of therapeutics (such as angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers, ARBs) used as first-line treatments in cardiovascular diseases. The importance of AT_1 in the regulation of the cerebrovascular system is also acknowledged. However, despite numerous beneficial effects in preclinical experiments, ARBs do not induce satisfactory curative results in clinical stroke studies. A better understanding of AT_1 signaling and the development of biased AT_1 agonists, able to selectively activate the β-arrestin transduction pathway rather than the G_q pathway, have led to new therapeutic strategies to target detrimental effects of AT_1 activation. In this paper, we review the involvement of AT_1 in cerebrovascular diseases as well as recent advances in the understanding of its molecular dynamics and biased or non-biased signaling. We also describe why these alternative signaling pathways induced by β-arrestin biased AT_1 agonists could be considered as new therapeutic avenues for cerebrovascular diseases.

Keywords: AT_1 receptor; Angiotensin II; cerebrovascular disease; biased agonism; beta-arrestin; RAS; TRV023; TRV027; Ang-(1–7)

check for updates

Citation: Delaitre, C.; Boisbrun, M.; Lecat, S.; Dupuis, F. Targeting the Angiotensin II Type 1 Receptor in Cerebrovascular Diseases: Biased Signaling Raises New Hopes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6738. https://doi.org/10.3390/ijms22136738

Academic Editors: Maurizio Mandalà and Daniel Henrion

Received: 23 May 2021
Accepted: 20 June 2021
Published: 23 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The systemic renin-angiotensin system (RAS) is a well-known hormonal cascade involved in many regulation processes such as the control of arterial pressure and vascular homeostasis. Angiotensinogen, a protein produced by the liver, is turned into angiotensin I, a decapeptide, by renin, an enzyme released by the kidney in response to various stimuli (blood pressure decrease, sympathetic stimulation). Angiotensin II (Ang II), an octapeptide, is generated by the cleavage of angiotensin I by the angiotensin-converting enzyme (ACE) mainly expressed at the endothelial surface. Ang II is known as the main effector of the RAS. Ang II binds with a similar affinity to two receptors: the Ang II type 1 receptor (AT_1) and type 2 receptor (AT_2), both belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) family and sharing 50% homology and 34% identity in their amino acid sequence [1–3].

Ang II activation of AT_1 is acknowledged as triggering most of the known effects of RAS stimulation [4,5], such as vasoconstriction, water and sodium retention and aldosterone release by the adrenal glands. This leads to increases in blood pressure, cardiovascular remodeling and fibrosis [6–8]. In most physiological situations involving Ang II release, AT_1 activation is predominant and will blunt the opposite effects induced by AT_2 stimulation, such as vasodilation, apoptosis and antiproliferative effects [9–12]. Despite this AT_1 predominance in Ang II mediated effects (mostly related to a more abundant expression of AT_1 compared to AT_2), the concept of a "protective arm" of RAS is a subject

of intensive research: it is composed of AT_2 and the Mas receptor (MasR), a GPCR activated by an endogenous truncated form of Ang II (Ang-(1–7)). For extensive reviews on the protective effect of AT_2 activation, please refer to Matavelli's or Carey's works [13,14] and for the MasR, refer to Povlsen's work [15].

Due to its wide physiological effects, AT_1 plays a critical role in many pathological conditions and cardiovascular diseases, like cardiac hypertrophy, hypertension and heart failure. For decades, treatments preventing AT_1 stimulation have been widely used as first line therapies for these cardiovascular diseases. ACE inhibitors, which prevent the cleavage of angiotensin I into Ang II, were developed in the 1980s. AT_1 selective antagonists, called AT_1 receptor blockers (ARBs or sartans), are a biphenyl-tetrazole based family of compounds first commercialized in the 1990s.

The involvement of AT_1 in the regulation of cerebral circulation is also well established [16,17] and a cerebrovascular local production of Ang II has been shown [18]. AT_1-dependent processes have been reported in cerebrovascular diseases including ischemic and hemorrhagic strokes, subarachnoid aneurysms, traumatic brain injury and might also be found in neurodegenerative processes, like Alzheimer's and Parkinson's diseases [19,20]. To date, etiological therapeutic treatments and/or therapeutic alternatives are scarce for all of these pathological conditions. This lack of efficient therapeutic options further justifies the growing interest for RAS and AT_1 as a therapeutic target in brain disorders.

AT_1 signaling pathways have been extensively studied over the past 25 years. AT_1 is coupled to the heterotrimeric $G_{q/11}$ protein that represents the main AT_1 signal transduction process involved in vasoconstriction of vascular smooth muscle cells (VSMC). However, recent advances suggest that AT_1 activation also leads to β-arrestin-dependent signaling pathways that could exert protective effects against cardiovascular diseases.

In the present review, we first discuss the major role of AT_1 in cerebrovascular diseases, before reviewing the preclinical and clinical studies showing the interest and limits of AT_1 blockade with ARBs in such situations (with a particular emphasis on strokes). We analyze the structure/function relationship of AT_1 with different agonists based on recent seminal articles that have led to the demonstration that a specific alternative active conformational state of AT_1 almost exclusively activates β-arrestin signaling instead of G protein signaling. Finally, we show the therapeutic potential of promoting this exclusive AT_1/β-arrestin biased signaling in pathophysiological situations where cerebral circulation is altered.

2. Implication of AT_1 in Cerebrovascular Disease

2.1. Role of AT_1 Activation in Strokes

Strokes are a major cause of death in industrialized countries and may lead to various physical disabilities consecutive to neurological deficit [21]. Strokes may result from two distinct etiologies: ischemia or hemorrhage. An ischemic stroke is the consequence of an obstruction or a vasospasm of a cerebral artery or arteriole [22], whereas a hemorrhagic stroke results from the rupture of the arterial, or arteriolar, wall. In both cases, the subsequent blood deprivation will lead to reduced oxygen levels, ischemia and necrosis of the downstream brain tissue.

Numerous preclinical data suggest that an overactivation of AT_1 by Ang II might contribute to the severity of cerebral ischemia and its consequences, mainly through its vasoconstrictor effects on cerebral arteries [23]. Indeed, in a classic rodent model of ischemic stroke, the middle cerebral artery occlusion model (MCAo, in which the middle cerebral artery is temporarily occluded by a nylon monofilament), increases in the local production of Ang II and in the AT_1-dependent vasoconstriction of cerebral arteries have been reported [24,25]. In the context of cerebral ischemia, Ang II and AT_1 stimulation thus lead to a decreased perfusion of the penumbra and might expand the deleterious consequences of a stroke [26]. Besides these acute post-stroke effects, chronic AT_1 stimulation is the main determinant of hypertension-induced inward remodeling of the cerebral arteriolar wall [17,27,28]. Indeed, hypertension, one of the major risk factors for strokes, induces a structural narrowing of the cerebral arterial lumen (thus reducing

blood perfusion in case of a stroke) that only antihypertensive treatments targeting RAS and AT_1 stimulation (ACE inhibitors and/or ARBs) are able to prevent [17,28,29].

Ang II and AT_1 stimulation also induce a proinflammatory response [30] and increase oxidative stress through the production of ROS, thus promoting cellular damage and apoptosis [31,32]. These effects might also contribute to the increase in brain damage and the enlargement of the penumbra in case of ischemia and during reperfusion.

Numerous preclinical and clinical studies have investigated the effects of ARBs, confirming the involvement of AT_1 in cerebral ischemia. These studies have been reviewed recently [33] and are discussed in Section 3.

2.2. Role of AT_1 Activation in Cerebral Aneurysm

Cerebral aneurysms are an abnormal condition in which a weakness of the cerebral arterial wall causes a localized dilation or bulge. Cerebral aneurysms can thus lead to hemorrhagic strokes showing a high mortality rate [34]. Given their role as major determinants of the cerebral arterial and arteriolar wall structure, RAS and AT_1 might be good candidates to participate in the development of cerebral aneurysms.

Regarding abdominal aortic aneurysms, the involvement of Ang II and RAS stimulation has been clearly demonstrated in animals, and strong evidence have been gathered in humans [35,36]. However, when considering cerebral aneurysms, the role of RAS components and AT_1 seems less obvious. In a study comparing patients with unruptured or ruptured cerebral aneurysm to controls, a significant drop in the mRNA expressions of ACE and AT_1 has been observed [37]. Immunohistochemistry also revealed a decrease in AT_1 and Ang II expression in unruptured aneurysmal walls. This decrease was even more pronounced in the arterial walls of patients with ruptured cerebral aneurysm [37]. Given the hypertrophic and remodeling effect of AT_1, the authors suggested that a decreased expression of RAS components could lead to a reduced wall thickness and vascular remodeling which may result in cerebral aneurysms [37].

Preclinical data do not completely support these observations. In an experimental model of aneurysm in rats combining a left internal carotid artery ligation with a left renal artery ligation and a high salt diet (to increase blood pressure), no change in AT_1 and ACE protein expression could be observed in cerebral aneurysmal walls. The authors therefore excluded any implication of AT_1 or ACE in cerebral aneurysm formation [38,39], as further supported by the lack of effect of an ARB treatment [38]. If not involved in the development of cerebral aneurysms, RAS has been proposed to play a pivotal role in their rupture. In a mouse model of cerebral aneurysm (obtained by combining induced systemic hypertension with a single injection of elastase into the cerebrospinal fluid at the right basal cistern), Tada et al. prevented the spontaneous aneurysmal rupture with either an ACE inhibitor or an ARB, in a pressure-independent manner [40]. It is noteworthy that, unlike the rat model evoked above, this particular model of intracranial aneurysm showed an increased expression of Ang II and AT_1 in aneurysmal walls, as revealed by immunohistochemistry [40].

The role of AT_1 in the pathogenesis of cerebral aneurysm still appears to be controversial. Even if some data suggest a less consistent role of AT_1 compared to other cerebrovascular diseases, further investigations are required to clarify the role of AT_1 and its alternative signaling pathways in cerebral aneurysm.

2.3. Role of AT_1 Activation in Traumatic Brain Injury

The Ang II/AT_1 axis also plays a pivotal role in traumatic brain injury (TBI), another major cause of death and disability. A direct lesion of the brain will result in neuronal damage, increased cell death, dysfunction of the blood-brain barrier and increased inflammatory response. TBI may thus lead to motor and cognitive disorders. In victims of severe TBI, the presence of the D allele of ACE genotype, leading to increased ACE activity, has been correlated with disease mortality [41]. The subsequent excessive AT_1 activation might

contribute to neuronal injury and vulnerability by inducing cerebrovascular remodeling and inflammation [42].

Two genes encode for AT_1 in rodents, AT_{1A} and AT_{1B}, and both share 93–94% amino-acids identity with the unique human AT_1 protein [43,44]. AT_{1A} has been described as the most abundant AT_1 isoform expressed in mouse brain [45]. A decrease in susceptibility to traumatic injury was observed in AT_{1A} knockout mice [46].

2.4. Role of AT_1 Activation in Neurodegenerative Diseases

AT_1 has also been reported as key determinant in many neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases. However, the involvement of AT_1 in these pathologies appears to be mostly located at the neuronal level. Recent reviews have been published on this matter [19,20,47] and this will not be further detailed here, as our present review addresses the cerebrovascular renin–angiotensin system.

2.5. Limitations

It is noteworthy that most of the studies cited above evaluated AT_1 protein expression by means of antibodies targeting AT_1 (Western blot and/or immunohistochemistry). These antibodies are notoriously unspecific [48–50] and the results obtained with these antibodies have therefore to be interpreted with caution. Nevertheless, the involvement of AT_1 in cerebrovascular diseases has been proven by many other means.

The roles of AT_1 in cerebrovascular diseases are summarized in Figure 1.

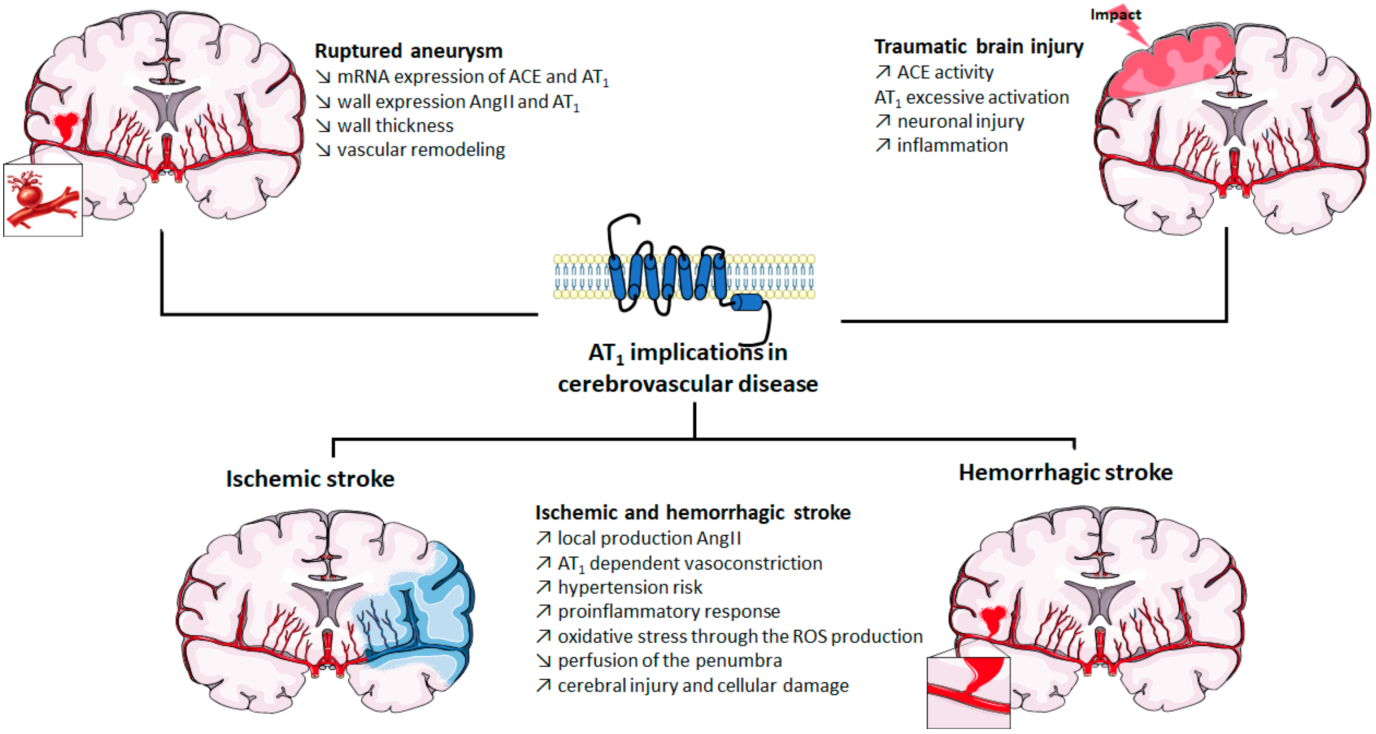


Figure 1. Implication of AT_1 in cerebrovascular diseases. ACE: angiotensin-converting enzyme; Ang II: angiotensin II; AT_1: angiotensin II type 1 receptor; mRNA: messenger ribonucleic acid; ROS: reactive oxygen species. The figure was prepared using the Servier Medical Art website (Creative Commons Attribution 3.0 unported License).

3. Blocking AT_1 by ARBs in Cerebrovascular Disease: Success and Limitations

AT_1 thus appears to be a first-order therapeutic target against cerebrovascular diseases, as has previously been clearly established for cardiovascular diseases. Currently, eight ARBs are clinically available, among which the most studied are losartan, candesartan, telmisartan and valsartan (Figure 2). Often described as surmountable (losartan) or unsur-

mountable (candesartan, telmisartan, valsartan) antagonists on the basis of their impact on the Ang II concentration response curve [51], ARBs show an inverse agonistic action by stabilizing the inactive state of AT_1 (see Section 4.2 below). ACE inhibitors and ARBs have been extensively studied to assess their potential preventive and curative effects in cerebrovascular pathologies.

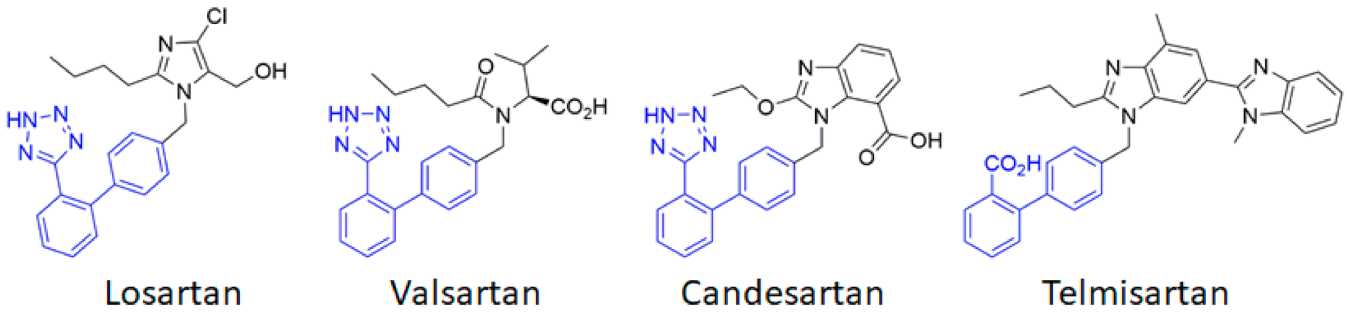


Figure 2. Chemical structures of the main angiotensin receptor blockers (ARB) used in therapeutics. The biphenyltetrazole (or the bioisosteric biphenyl carboxylic acid for telmisartan) is highlighted in blue.

Numerous preclinical studies show the beneficial effects of ARBs at the cerebrovascular level. ARBs regulate cerebral blood flow by blocking AT_1 in cerebral arterial VSMC and endothelial cells [52]. ARBs improve blood perfusion, reduce apoptosis and decrease the infarct size after an ischemic stroke [53]. A 2-week pretreatment with candesartan before MCAo ischemic strokes in normotensive or hypertensive rats reduces the infarct volume and improves the lower and upper limits of cerebral blood flow autoregulation [54]. This chronic treatment also reduces vascular remodeling [55] and neuronal damage after cerebral ischemia [56,57]. Candesartan has also been reported to reduce neuronal damage in mice after a TBI [58] while valsartan could prevent these lesions [59]. Losartan has shown beneficial effects to prevent aneurysmal subarachnoid hemorrhage in a murine model [40]. Taken together, these preclinical data (which have recently been extensively reviewed [33,60]) provide evidence for the cerebrovascular potential of ARBs.

However, the transposition to clinic does not entirely support these preclinical data. Numerous clinical studies highlight the beneficial effect of long-term RAS blockades on stroke prevention. Early trials were conducted with ACE inhibitors. The stroke rate was reduced by 25% in patients receiving the ACE inhibitor captopril in the CAPPP (CAPtopril Prevention Project) trial [61] and this reduction reached 32% in the HOPE (Heart Outcome Prevention Evaluation) trial with the ACE inhibitor ramipril [62]. Similar drops in stroke recurrence were recorded in patients treated with perindopril, another ACE inhibitor, in the PROGRESS (perindopril PROtection aGainst REcurrent Stroke Study) study [63]. Interestingly, clinical studies using ARBs show identical results, suggesting that the beneficial effect of ACE inhibitors is mainly related to the prevention of AT_1 stimulation. The LIFE (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension) study demonstrated that treatment with losartan prevented the risk of ischemia by 25% as compared to β-blockers that target β-adrenergic receptors [64]. The impact of candesartan was examined in the SCOPE (Study on COgnition and Prognosis in the Elderly) trial in which a risk reduction of 28% for non-fatal stroke was observed [65]. Similar results were found in the MOSES (MOrbidity and mortality after Stroke, Eprosartan compared with the calcium channel blocker nitrendipine for Secondary prevention) study with a 24% reduction in the stroke incidence in people treated with eprosartan [66]. Even if some studies failed to show such a dramatic effect (e.g., TRANSCEND [67] and PROFESS [68] trials), the prevention of strokes afforded by chronic ARBs treatment is well established. However, their efficacy in the acute and post-acute phases of strokes remains a matter of debate. The ACCESS (Acute Candesartan Cilexetil therapy in Stroke Survivors) study, in which candesartan therapy was initiated within 36 h after a stroke, revealed a lower

mortality and a lower rate of vascular events after a one-year follow-up [69]. But a more recent trial failed to confirm these results. In the SCAST (Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial) study, candesartan treatment administered within 30 h after a stroke failed to show any beneficial effect when compared to placebo after 6 months [67,70]. In addition, ARBs act neither on cerebral lesions nor on the reduction in infarct volume, while this was observed in preclinical models. Thus, when considering acute stroke treatment, more in-depth studies should be carried out and the search for other therapeutic avenues that target AT_1 should be considered.

4. Alternative Ligands to Target AT_1 Signaling

AT_1 has been a matter of intensive research over the last decades and new mechanisms for altering AT_1 signaling have recently emerged, related to the particular properties of this GPCR (Figure 3).

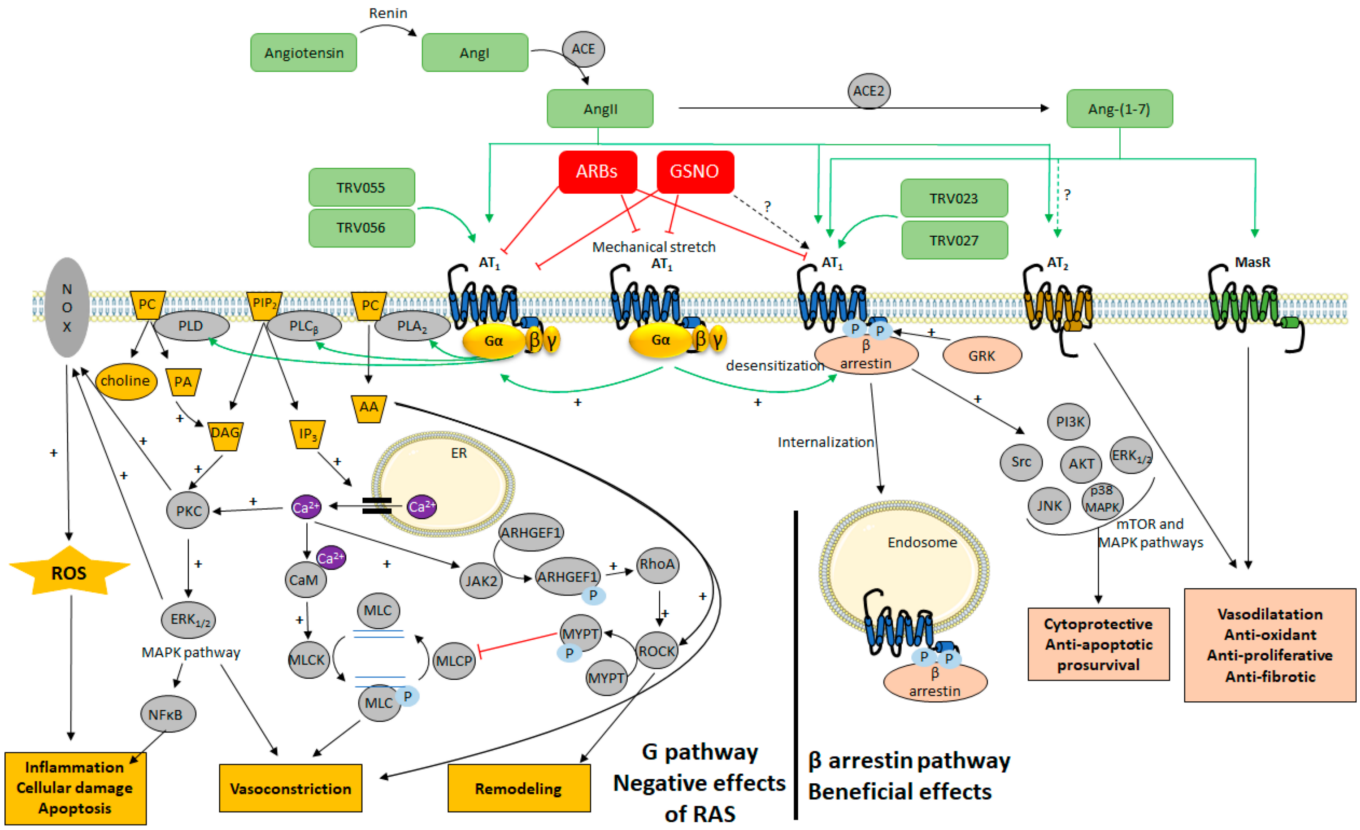


Figure 3. Overview of the cellular signaling pathways activated by AT_1 after stimulation of the renin–angiotensin system (RAS). AA: arachidonic acid; ACE: angiotensin-converting enzyme; ACE2: angiotensin-converting enzyme 2; AKT: protein kinase B; Ang-(1–7): angiotensin (1–7); Ang I: angiotensin I; Ang II: angiotensin II; ARHGEF1: Rho guanine nucleotide exchange factor 1. AT_1: angiotensin II type 1 receptor; AT_2: angiotensin II type 2 receptor; ARBs: angiotensin receptor blockers; CaM: calmodulin; DAG: diacylglycerol; ER: endoplasmic reticulum; $ERK_{1/2}$: extracellular signal regulated kinase $\frac{1}{2}$; GRK: G protein-coupled receptor kinase; GSNO: S-nitrosoglutathione; IP_3: inositol triphosphate; JAK2: Janus kinase 2; JNK: c-Jun N-terminal Kinase; MAPK: mitogen-activated protein kinases; MasR: Mas receptor; MLC: myosin light chain; MLCK: myosin light chain kinase; MLCP: myosin light chain phosphatase; mTOR: mammalian target of rapamycin; MYPT: myosin phosphatase target subunit; NFκB: nuclear factor kappa B; NOX: NADPH oxidase; PA: phosphatidic acid; PC: phosphatidylcholine; PI3K: phosphoinositide 3 kinase; PIP_2: phosphatidylinositol-4, 5-diphosphate; PLA_2: phospholipase A2; PLC_β: phospholipase Cβ; PLD: phospholipase D; PKC: protein kinase C; RhoA: RAS homolog family member A; ROCK: Rho associated protein kinase; ROS: reactive oxygen species; TRV023 and TRV027: β-arrestin biased AT_1 agonists; TRV055 and TRV056: G_q biased AT_1 agonists. The figure was prepared in part with the Servier Medical Art website (Creative Commons Attribution 3.0 unported License).

4.1. The Classical View of AT_1 Signaling

After Ang II binding, AT_1 adopts an active conformation that stimulates the $G_{q/11}$/phospholipase Cβ cascade [71] to induce VSMC contraction. Indeed, this pathway generates second messengers by phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP_2) hydrolysis. The increase in inositol trisphosphate (IP_3) will result in myosin light chain kinase (MLCK) activation through Ca^{2+}/calmodulin complexes. The increase in intracellular Ca^{2+} has also been reported to activate the JAK2 kinase which phosphorylates the ARHGEF1 Rho guanine nucleotide exchange factor [72]. ARHGEF1 then activates the RhoA/Rho kinase–mediated phosphorylation of MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1) and inhibition of the myosin light chain phosphatase (MLCP) activity [72].

Recent studies have also reported that AT_1 coupling to $G_{i/o}$, G_{12} and G_{13} [5,6,73–76]. Coupling of AT_1 to $G_{i/o}$ leads to an inhibition of adenylyl-cyclase and a decrease in cyclic adenosine monophosphate in kidneys, adrenal glomerula zone or liver [6]. AT_1 activation, via its coupling to $G_{12/13}$, may also trigger the RhoA/Rho kinase pathway evoked above and thus participate to vascular contraction, remodeling and inflammation induced by Ang II [77]. AT_1 has also been reported to phosphorylate and activate the cytosolic phospholipase PLA2 [78], resulting in the release of arachidonic acid and its derivatives which are involved in vascular tone and in p22phox-based NADH/NADPH oxidase activation in VSMC [79]. Intracellular protein kinases, such as protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinases (MAPK) and protein kinase B (AKT), may also stimulate NADPH oxidase and lead to the generation of reactive oxygen species (ROS) induced by Ang II [5,80].

After Ang II stimulation, AT_1 also undergoes phosphorylation on its C-terminal serine and threonine residues by GPCR kinases (GRKs). This phosphorylation process is a common feature of GPCR and increases β-arrestin1 and β-arrestin2 affinities for the receptor [81,82]. The initial role of β-arrestins was described to arrest the response by interrupting the heterotrimeric G protein coupling and to induce receptor internalization through clathrin-coated pits. But a new role of β-arrestins has now emerged for GPCR [83,84] including AT_1: once stably recruited by AT_1, β-arrestins act as scaffolding proteins that are suggested to directly promote AT_1 alternative signaling cascades with potential protective effects.

4.2. Targeting Different Active Conformations of AT_1 with Biased Agonists

Many ligands of GPCR can selectively initiate one or more distinct signaling pathways when coupled to their receptor. This is the biased agonism theory, also known as functional selectivity [85], that was first described more than four decades ago but not explored until recently [86]. These biased agonists will preferentially stabilize one of the many conformations that GPCR can adopt, thus allowing only specific interactions between the receptor and specific downstream intracellular proteins. In addition to the receptor conformation, cellular background and simultaneous expression of other receptors may lead to phosphorylation changes at the C-terminus of activated receptors. This can induce the binding of different conformations of β-arrestins, different internalization routes and altered signaling. It is referred to as the barcode theory [87,88].

Because the biased signaling exploration held great promise for the development of more effective therapies, the concept became rapidly fashionable and over-simplified, stating that for each GPCR, in addition to the classical active state that couples to both G protein and beta-arrestin, one could find biased ligands triggering exclusive signaling either towards heterotrimeric G coupling or towards β-arrestin. This view of exclusive G proteins *versus* β-arrestins biased signaling has now been debated in a series of valuable articles [89–92] but still holds for AT_1.

In the case of AT_1, several biased agonists have been developed and pharmacologically characterized that allow specific activation of the G protein-dependent pathway without activating β-arrestins (TRV055 and TRV056, Figure 3) and vice versa (TRV023 and TRV027, Figure 3) [93]. Biased ligands that differentially activate AT_1 coupling among the

various G protein subtypes have also been described [75]. Combining very precise molecular and pharmacological characterizations of these biased AT_1 agonists (allowed by the development of new tools, such as various biosensors based on bioluminescence resonance energy transfer BRET [75]) together with structural information [94–96] and molecular dynamic simulations of different categories of biased ligands/AT_1 pairs [71,97,98], AT_1 is now demonstrated to adopt at least three conformational states: the inactive one, the canonical active conformation that can couple to both G_q and β-arrestin pathways, but also an alternative active conformation coupling almost exclusively to β-arrestins. The following paragraph describes at the molecular level the results arising from these recent and highly relevant studies.

The very first X-ray crystallography study of AT_1 consisted of the receptor co-crystallized with an ARB [99]. The resulting inactive form of the receptor showed an H-bond between N295 of the transmembrane domain TM7 ($N295^{7.46}$) and N111 of the TM3 ($N111^{3.35}$). This interaction ensures an inward positioning of the TM6, together with a slight outward movement of TM7, precluding any contact with intracellular effectors (Figure 4, in salmon). This conformation is stabilized by biphenyl-tetrazole ARBs, as they tightly interact with several residues, including $N295^{7.46}$. They afford a stabilization of the $N111^{3.35}$–$N295^{7.46}$ H-bond and of the network of surrounding residues in the inactive conformation [51,99]. This stabilization of AT_1 in an inactive state results in the pharmacologically observed robust inverse agonism.

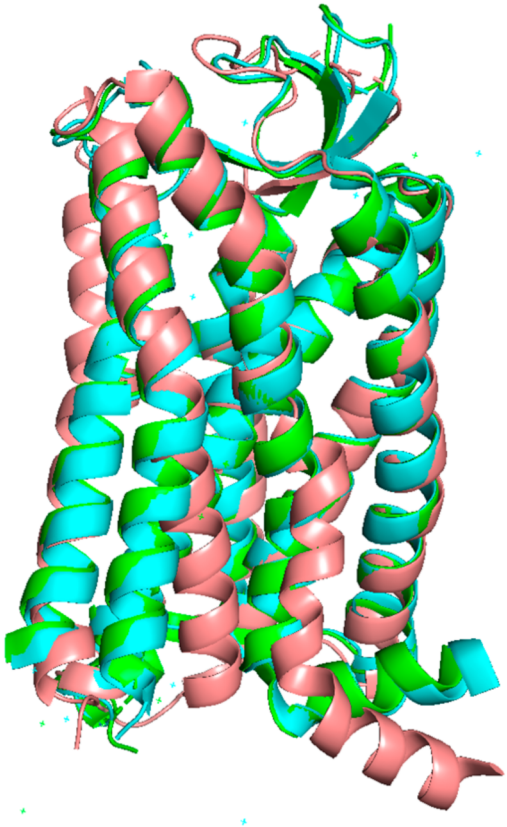


Figure 4. Superimposition of the three known structures of AT_1. Inactive (salmon), canonical active (green) and alternative active (cyan). TM6 and TM7 are located in the front. In the inactive structure, TM6 is remarkably bent inside the receptor, while TM7 is slightly twisted outside. The reference inactive structure of AT_1 has been chosen as PDB code 4YAY (from [99]). Canonical active and alternative active structures have been chosen as PDB code 6OS0 and 6OS1 respectively (from [96]). The figure was prepared with the PyMOL software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.0. Schrödinger, LLC).

In contrast, a more recent X-ray crystallography study [98] showed that in the presence of Ang II or of the biased agonist TRV 023 (Figure 4, in green and cyan, respectively), interaction with agonists induces an outward shift of TM6, which is a hallmark of GPCR activation [96]. In AT_1, this shift in TM6 is due to a conformational change of $N295^{7.46}$. Other events depend on the nature of the agonist, whether biased or not and have been well described by Suomivuori et al. and Wingler et al. in two recent and complementary articles published in 2020 [96,98]. The authors could decipher the following mechanisms by molecular dynamics and X-ray crystallography, both techniques providing converging results which are given below.

The natural agonist, Ang II, inserts itself in the ligand pocket of the receptor with its N-terminus oriented toward the extracellular side. The C-terminus with its hydrophobic phenylalanine will therefore position itself deeply into the core of the receptor, near the hydrophobic L112 of TM3 ($L112^{3.36}$) and pushing it towards TM2. Consequently, the neighboring $N111^{3.35}$ points outward from the receptor (Figure 5a in green). As a result, instead of pointing toward TM3, $Y292^{7.43}$ points toward TM2, exchanging its position with $F77^{2.53}$. This movement of $Y292^{7.43}$ induces a clockwise twist of TM7, such that the $N46^{1.50}$ below establishes an H-bond with $N295^{7.46}$ instead of $C296^{7.47}$ [98]. It also causes an outward shift of TM7 in the intracellular part of the receptor permitting $Y302^{7.53}$ to point up (Figure 5b in green). Such a global phenomenon, described by Suomivuori et al. as a "long-range allosteric network", drives the information from the ligand-binding pocket to the intracellular side of AT_1, resulting in the "canonical active conformation". The same pattern occurs with a greater extent when the ligand is a G_q biased agonist, allowing sufficient space for the α5 helix of G_q to accommodate with the receptor.

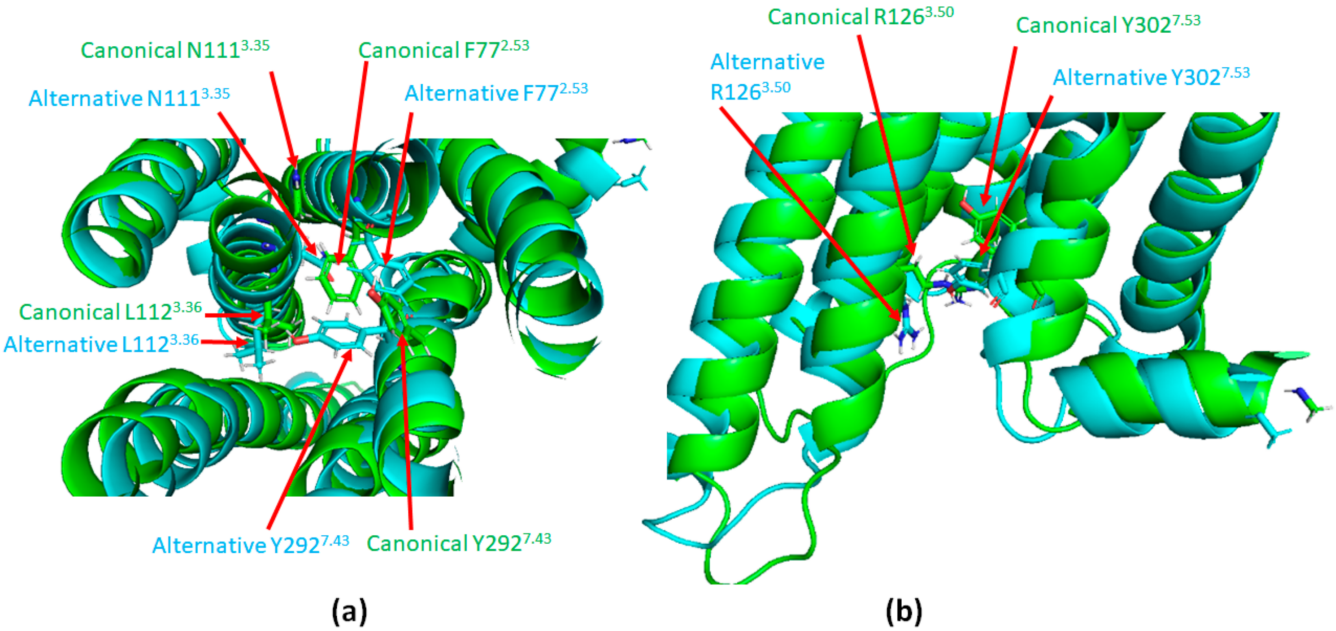


Figure 5. Illustration of the long range allosteric network of AT_1 inducing its switch to canonical active conformation. (**a**): Top view of the canonical (green) and alternative (cyan) active conformations of AT_1. (**b**): Superimposition of the intracellular part of AT_1 in its canonical (green) and alternative (cyan) active conformations. Canonical active and alternative active structures are simulation data available in supplementary material from [98]. The figure was prepared with the PyMOL software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.0. Schrödinger, LLC).

Alternatively, most arrestin-biased peptide agonists do not possess a phenylalanine on their C-terminus (Figure 6a) [94,100]. The consecutive lack of hydrophobic interaction with $L112^{3.36}$ prevents the complete outward shift of the intracellular side of TM7, leading to the "alternative active conformation" (Figure 6b in cyan). It includes a downward rotamer of $Y302^{7.53}$ which then points to the intracellular side. This has a repelling effect on $R126^{3.50}$,

thus also pointing down (Figure 5b, in cyan). R126$^{3.50}$ belongs to the conserved DRY motif of GPCR that is mandatory for GPCR coupling to heterotrimeric G proteins. The models simulated by Suomivuori et al. have established that this downward position of R126$^{3.50}$ induces a steric clash with the α5 helix of G_q, preventing its coupling to AT_1 [98]. The same models have shown that both AT_1 active conformations (canonical and alternative) can accommodate with the β-arrestin finger loop [98].

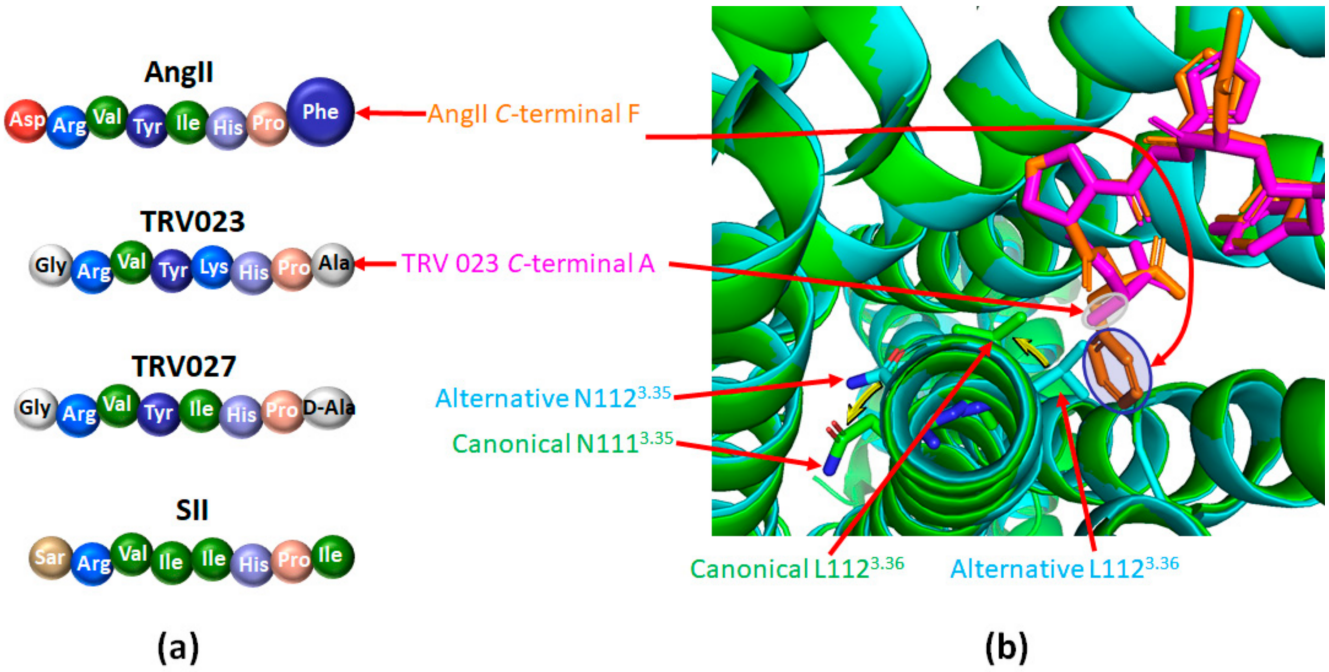


Figure 6. β-arrestin biased agonists of AT_1 favor its alternative active conformation. (**a**): Comparison of the amino acid sequences of angiotensin II (Ang II) and of the main β-arrestin biased agonists of AT_1; Ang II: angiotensin II; SII: [Sar^1,Ile^4,Ile^8] angiotensin II peptide analog; TRV023 and TRV027: β-arrestin biased AT_1 agonists. (**b**): Superimposition of the structure of AT_1 bound to Ang II (green, PDB code 6OS0; Ang II appears in orange) or to the β-arrestin biased agonist TRV023 (cyan, PDB code 6OS1; TRV023 appears in purple). The phenyl group of the C-terminal part of Ang II (highlighted in blue) goes deep into the ligand pocket, inducing a rotation of L112$^{3.36}$ and of N111$^{3.35}$ (yellow arrows). It yields the canonical structure of AT_1 (appears in green). The C-terminal part of TRV023 comprises a less bulky alanine residue (highlighted in grey) which does not induce such motion, yielding the alternative structure (in cyan). This panel was prepared with the PyMOL software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.0. Schrödinger, LLC).

A very seductive hypothesis has been proposed to explain why AT_1 can adopt such an alternative active conformation that binds almost exclusively to β-arrestin and not G proteins [96]. Wingler et al. have suggested that a biased signaling switch may predispose AT_1 to adopt an exclusive β-arrestin conformation. Interestingly, Ang II binding to AT_1 not only induces changes at the bottom of the ligand-binding pocket but also in residues constituting a key polar network in the transmembrane region of the receptor. In most class A GPCR, this polar network forms a sodium-binding site stabilizing the inactive conformation. This Na^+/GPCR interaction is due to the bond established between Na^+ and a highly conserved serine in TM7. However, one of the specificities of AT_1 among GPCR family, is that this serine residue is replaced by the asparagine N295$^{7.46}$ (involved in the initial outward shift of TM6 evoked above), thus alleviating Na^+ binding and favoring the β-arrestin alternative active conformation. Similar residue substitutions in the conserved Na^+-binding motif have been reported in several atypical chemokine receptors, such as the decoy receptor CXCR7 [101,102], that do not signal through G protein coupling, strengthening the hypothesis that the absence of the Na^+ binding site could favor an exclusive β-arrestin active conformation.

4.3. Targeting AT_1 by Covalent S-Nitrosation

S-nitrosation is defined as the covalent bond between nitric oxide (NO, a well-known gaseous transmitter playing an essential role in cardiovascular homeostasis) and the thiol moiety of cysteine residues of target proteins [103]. The so formed *S*-nitrosothiols are able to induce trans-nitrosation (the transfer of NO to another target protein) and/or to release NO, thus conferring on them potent vasodilator properties [104]. The *S*-nitrosation of proteins can induce dramatic changes in their functions [105] and recent papers suggest that AT_1 functions could be regulated by *S*-nitrosation.

Studies carried out by Leclerc et al. in 2006 showed a slight decrease in the affinity of Ang II for the AT_1 following exposure to sodium nitroprusside (SNP), a NO donor, in a cellular model of HEK293 cells overexpressing AT_1 [106]. Interestingly, it was proposed that AT_1 is the direct target of NO: using several AT_1 cysteine mutants, the authors showed that mutation of the cysteine 289 ($C289^{7.40}$) for a serine in human AT_1 was no longer sensitive to NO, suggesting that *S*-nitrosation of the cysteine residue at position 289 in TM7 of AT_1 was responsible for the slight loss of affinity for Ang II [106].

Based on these results, our group proposed that NO donors could directly reduce arterial contraction induced by Ang II activation of AT_1. We investigated the physiological consequences of this phenomenon by studying the effect of NO in an ex-vivo model: isolated and perfused middle cerebral arteries of normotensive rats [107]. *S*-nitrosation was induced by pretreatment with *S*-nitrosoglutathione (GSNO), an endogenous *S*-nitrosothiol previously shown as protective in different models of cerebral ischemia (MCAo) [108,109] and autologous blood clots injected through the internal carotid artery [110]). GSNO pretreatment of rat middle cerebral arteries specifically abolished the vasoconstriction induced by Ang II. Other vasoconstrictors sharing the same G_q signaling pathway, such as phenylephrine, or targeting Gi/o coupled receptors, such as serotonin, still produced vasoconstriction after GSNO pre-treatment. GSNO therefore specifically inhibited the vasoconstriction induced by Ang II by acting upstream of the G_q proteins, i.e. probably on the receptor itself. In preliminary experiments, we could detect *S*-nitrosated AT_1 after exposure of HEK293 cells overexpressing AT_1 to GSNO, although we did not investigate which cysteine was targeted [107]. Similar results have just been published [111]. Using an ex-vivo model of rat aortic rings, Pinheiro et al. have observed a decrease in vascular contraction induced by Ang II when arteries were pretreated with nitrite or GSNO [111]. In vivo, a decrease in the blood pressure response to Ang II was also detected after oral administration of nitrite or GSNO [111]. Both treatments increased plasma concentrations of *S*-nitrosated species and enhanced total protein *S*-nitrosation in the vessels. The authors identified PKC as the target of *S*-nitrosation and as the underlying mechanisms of the decreased responses to Ang II. In Leclerc's study, a decrease in the EC50 of Ang II-induced inositol phosphate production upon SNP treatment was reported, while Pinheiro et al. found, in HEK293T cells expressing AT_1, a Bmax decrease in the Ang II-induced intracellular calcium mobilization after GSNO pre-treatment. Taken together, these studies suggest that *S*-nitrosation promoted by GSNO reduces the physiological responses induced by Ang II by acting directly on AT_1 and on other proteins such as PKC.

Interestingly, the slight decrease in Ang II affinity described by Leclerc et al. after AT_1 *S*-nitrosation might not be the only effect of NO on the receptor. Indeed, the AT_1 dependent myogenic tone (the arterial contractile response consecutive to an increase in arterial transmural pressure and mechanical stretch [112]), which is independent of the binding of Ang II to AT_1, decreases in isolated middle cerebral arteries pretreated with GSNO (Figure 3) [107]. In addition, in preliminary experiments, GSNO pre-treatment of HEK293 cells did not impair the kinetics and amplitude of activated AT_1 internalization [107]. This suggests that the AT_1/β-arrestin pathway could remain unaffected by the *S*-nitrosation of the receptor.

When looking at AT_1 structure, it is noteworthy that $C289^{7.40}$ is one of the residues involved in the "long-range allosteric network" (see Section 4.2). As shown in Figure 7, the thiol function of $C289^{7.40}$ is oriented inside the receptor in the alternative active conforma-

tion (in cyan), whereas it points outward from the receptor in the inactive (in salmon) and canonical active (in green) states. This suggests that any modification on this particular residue could alter the process involved in conformational changes and may preclude or stabilize one or more conformations of AT_1. This hypothesis is strengthened by several reports focusing on single nucleotide polymorphism of AT_1 in humans. Among the few naturally occurring variants of AT_1, one is related to $C289^{7.40}$ where the cysteine is replaced by a tryptophan residue (C289W variant). This variant has not been associated with a pathology, but seems to be less expressed at the plasma membrane and decreases the potency of Ang II on phosphatidylinositol hydrolysis consecutive to G_q stimulation [113]. At least two other recent studies confirmed this reduced affinity of the C289W variant for Ang II but also showed that C289W is able to interact with β-arrestin2 at the plasma membrane upon Ang II stimulation [75,114]. However, C289W alters the β-arrestin2 conformation and reduces the β-arrestin-dependent activation of $ERK_{1/2}$ [114]. Taken together, these data support the idea that a modification at $C289^{7.40}$, such as *S*-nitrosation, may bias AT_1 signaling, but further investigations are needed.

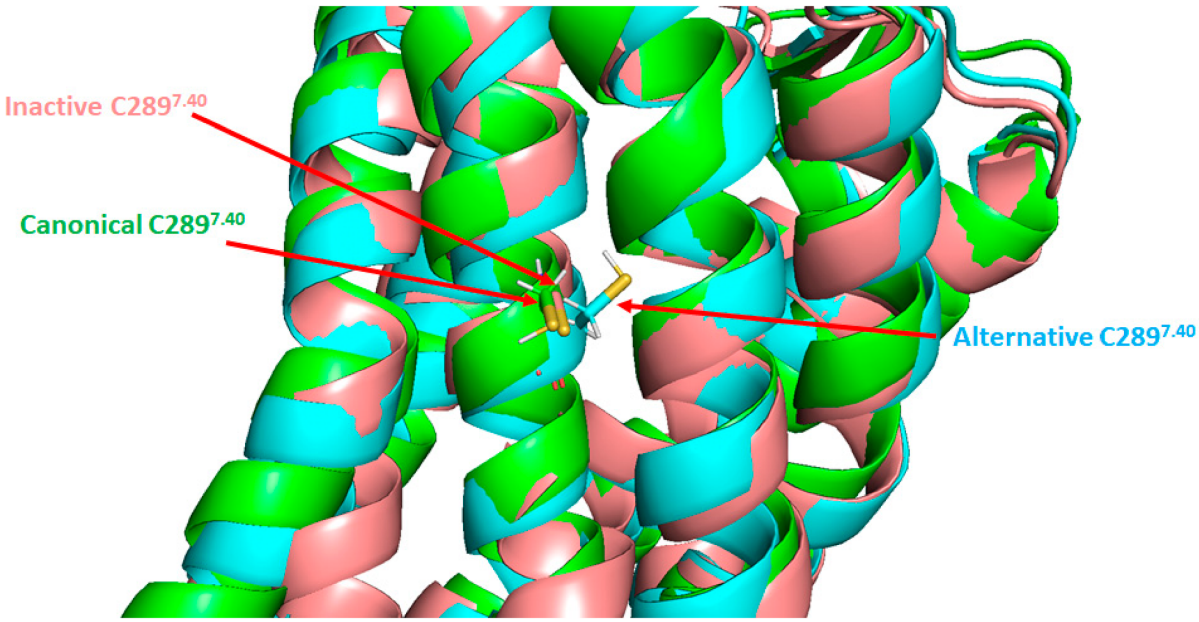


Figure 7. Positions of the cysteine 289 residue in the three known AT_1 structures. Superimposition of the three known AT_1 structures: inactive (salmon), canonical active (green) and alternative active (cyan). TM6 and TM7 are located in the front. C289 residue is indicated by arrows. The reference inactive structure of AT_1 has been chosen as PDB code 4YAY (from Zhang et al. [99]). Canonical active and alternative active structures are simulation data available in supplementary material from Suomivuori et al. [98]. The figure was prepared with the PyMOL software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.0. Schrödinger, LLC).

5. Promoting the β-Arrestin Pathway of AT_1 to Treat Cerebrovascular Disease

Having established that AT_1 is prone to biased agonism towards the β-arrestin pathway, we will now review the potential interests of promoting this AT_1/β-arrestin signaling. AT_1 recruits both β-arrestins equally and internalizes as a stable complex, inducing a slow recycling to the plasma membrane [115,116].

5.1. Biased Agonists towards AT_1/β-Arrestins in Cardiovascular Diseases

In addition to the desensitization and internalization of AT_1 which reduce G_q signaling, the activation of the β-arrestin pathway induces several signaling cascades involved in cellular processes, such as cell proliferation and growth, nutrient uptake and migration (Figure 3). Following stimulation either by Ang II or by the Ang II peptide analog SII, the first β-arrestin biased AT_1 agonist identified (Figure 6a), the consecutive phosphoproteomes

do not overlap, suggesting a G_q-independent phosphorylation process induced by β-arrestin biased agonists [117,118]. Moreover, in a very recent proteomic study, Pfeiffer et al. showed that the dynamic recruitment of proteins in close proximity to AT_1 displays a completely different pattern as a function of time, depending on whether AT_1 was stimulated by full agonists, G_q biased agonists, or β-arrestin biased agonists [119].

As previously mentioned, both β-arrestin1 and β-arrestin2 can be recruited after the phosphorylation of AT_1 by GRKs. The use of β-arrestin1 and β-arrestin2 biosensors has shown that a given ligand/AT_1 pair recruits both β-arrestins to the same extent but that they stabilize the receptor in distinct conformations [120]. Indeed, although the primary sequence and 3D structure of the two β-arrestin isoforms are very similar, conformational differences have been reported, suggesting functional differences [121]. This is illustrated at the cardiovascular level: on the one hand, β-arrestin1 exhibits harmful effects at the cardiac level, in particular by reducing cardiac function, promoting apoptosis and inflammation while, on the other hand, β-arrestin2 has been shown to have protective cardiac effects [122]. β-arrestin2 mediates signaling through Src, $ERK_{1/2}$, AKT and PI3K activations and has been reported to be cytoprotective, anti-apoptotic and pro-survival [93,123–126]. β-arrestin2 has also been reported to inhibit the inflammation process after myocardial infarction [127]. However, one study has shown conflicting results, showing that β-arrestin2 is involved in cell death signaling after ischemic cardiac injury [128].

The importance of the exclusive AT_1/β-arrestin pathway at the cardiovascular level has been studied through the use of various ligands biased towards β-arrestins, such as TRV027 and TRV023 (Figures 3 and 6a) [129,130] and has been recently reviewed by Turu et al. [92]. Only TRV027 has been studied in clinical trials for heart failure (NCT01187836), kidney disease (NCT01444872) and currently for COVID-19/SARS-CoV-2 infection (NCT04419610; NCT04924660).

TRV027 increases cardiac contractility in vitro and reduces blood pressure in rats [131]. In addition, in a canine model of cardiac insufficiency, TRV027 reduces systemic and renovascular resistance and promotes cardiac unloading [132,133]. Based on these promising results, TRV027 has also been tested in humans, both in healthy subjects [134] and in patients with acute heart failure in the BLAST-AHF (Biased Ligand of the Angiotensin receptor STudy in Acute Heart Failure) study [135]. The beneficial effects of TRV027 were not confirmed by this first clinical study [136]. However, the interest of such β-arrestin-biased agonists of AT_1 remains, since many other ligands with similar bias and convincing preclinical data are still to be tested.

Hence, TRV023 is another AT_1 agonist that blocks G protein signaling and promotes the recruitment of β-arrestins (Figure 6a). In mice, TRV023 increases cardiac contractility in a β-arrestin2-dependent manner while it decreases blood pressure independently of β-arrestin2 (most likely through inhibition of the G_q pathway) [130]. TRV023 reduces cell death both ex vivo (intraventricular balloon-induced membrane stretch injury) and in vivo (left ventricular ischemia-reperfusion injury) by activating the MAPK and AKT pathways. These cytoprotective effects were not observed with losartan or in β-arrestin2 KO mice [130]. These results are strengthened by previous works showing that mechanical stretching in cardiac myocytes facilitates β-arrestin2 biased pro-survival signaling via EGFR transactivation mediated by AT_1 independently of G protein or Ang II [137]. Moreover, TRV023 prevents Ang II-induced cardiac hypertrophy while preserving contractility more efficiently than losartan by improving the calcium response of myofilaments [138]. Finally, TRV023 also induces an increase in myocardiac contractility and in ventricular myosin light chain-2 phosphorylation in a transgenic mouse model of familial dilated cardiomyopathy [139].

Thus, the beneficial actions of these β-arrestin biased AT_1 ligands appear promising, although not yet fully understood. These biased agonists also seem to bind to AT_2, which could contribute to counteracting the cardiovascular harmful effects of AT_1. Although AT_2 does not couple to heterotrimeric G proteins and does not recruit β-arrestins [76,140], this receptor may play a role in the in vivo effects of these biased agonists, e.g., by modulating

AT_1/AT_2 heterodimer signaling. However, to date no comprehensive study has been conducted to support this hypothesis.

5.2. Biased Agonists towards AT_1/β-Arrestins in Cerebrovascular Diseases

To the best of our knowledge, no study has focused on the impact of specific β-arrestin biased agonists of AT_1 on cerebrovascular diseases. The literature, however, supports the idea that these drugs might represent new hope for these clinical situations in which alternative treatments are lacking.

Interestingly, Ang-(1–7), a major component of the Ang-(1–7)/MasR/ACE2 protective axis of the renin–angiotensin system, has also been described as a β-arrestin biased ligand of AT_1 [74,141]. Numerous studies report cardioprotective effects of Ang-(1–7) [141–144] as well as cerebroprotective effects in ischemic and hemorrhagic strokes [60,145,146]. Ang-(1–7) protects against central nervous system damage and neurological deficits induced by experimental ischemic strokes [145]. It reduces the infarct volume, oxidative stress, as well as the release of pro-inflammatory cytokines through Mas receptor stimulation [147]. However, even if MasR antagonists were used to prevent Ang-(1–7) effects, this does not completely rule out that its weak, exclusive β-arrestin biased agonist properties on AT_1, together with its AT_2 agonistic properties might contribute to the cerebrovascular beneficial effects of Ang-(1–7) [76,140,148,149]. The heterodimeric complexes between AT_1/AT_2 or AT_1/MasR seem to inhibit AT_1 signaling by Ang II, β-arrestin recruitment and receptor internalization [150–153]. It would be interesting to investigate how Ang-(1–7) and other β-arrestin biased ligands affect the signaling of these heterodimers.

Unlike reports at the cardiac level, both β-arrestin1 and β-arrestin2 seem to have neuroprotective effects on cerebrovascular diseases. The MCAo ischemic stroke model in mouse revealed an increase in protein expression of the two β-arrestins, suggesting their involvement in the pathophysiological process [154]. This study also reported that β-arrestin1 deletion worsens ischemic brain damage assessed by neuronal deficits, infarct size and mortality. These effects are correlated with the suppression of autophagy and induced neuronal apoptosis and necrosis in vitro and in vivo [154]. These results suggest that β-arrestin1 has neuroprotective effects related to autophagy. However, we should remain cautious, since β-arrestin1 deletion may affects a very wide variety of cellular functions, whether beneficial or deleterious.

Studies exploring the alterations of β-arrestin2 expression in strokes and neurovascular disease are scarce and the role of β-arrestin2 in neurological disorders is not yet clear. One study showed that β-arrestin2 plays a pivotal role in the immunodeficiency syndrome induced by strokes [155]. In particular, β-arrestin2 is believed to be a key intracellular mediator of adrenergic activity in monocytes after a stroke and may therefore be implicated in the stroke-induced adrenergic-mediated monocyte dysfunction [155]. However, these in vitro results concluding that there is a harmful role of β-arrestin2 after a stroke are not supported by in vivo experiments. Indeed, a more recent study suggests that β-arrestin2 signaling improves endothelial function and blood–brain barrier integrity after a stroke [156]. Using APC (activated protein C), a β-arrestin2 biased agonist of the PAR-1 receptor (protease-activated receptor 1), the authors showed that β-arrestin2 signaling has protective effects in mice under ischemic conditions (MCAo), notably as it increases angiogenesis. A high fat diet reduced β-arrestin2 expression in mice and the β-arrestin2 levels in the penumbra were inversely correlated with the severity of ischemic lesions after MCAo [156]. The authors identified PDFG-β as one of the key target molecules activated by β-arrestin2 to promote angiogenesis [156].

6. Conclusions

The pathophysiological role of AT_1 in cerebrovascular diseases has been increasingly highlighted in recent years; however, therapeutic advances in this area have not followed. The development of new therapeutic approaches requires a better understanding of AT_1 signaling pathways and its possible interactions with other components. Since β-arrestin-

biased AT_1 agonists have showed promising results in the cardiovascular disease context, it would be interesting to study them in models of cerebrovascular diseases such as strokes.

There is still much to learn about the regulation of AT_1 signaling, whether through β-arrestin signaling or characterization of the potential beneficial effects of β-arrestin biased agonists.

Funding: This work was funded by the French Ministry of Education, Research and Technology (Paris, France, EA3452). The authors acknowledge support of CITHEFOR by the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence" (Investissements d'avenir—ANR). Part of this work was supported by the IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002) and by the SFRI-STRAT'US project (ANR-20-SFRI-0012) under the framework of the French Program "Investments for the Future" given to the Strasbourg drug discovery and development Institute (IMS), as part of the Interdisciplinary Thematic Institute (ITI) 2021-2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Frédéric Simonin, head of the GPCR, pain and inflammation team in Strasbourg for his support on the AT_1 project and Jeremy Garwood for his critical reading of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

ACE	Angiotensin-converting enzyme
AKT	protein kinase B
Ang II	angiotensin II
ARB	AT_1 receptor blocker
AT_1	angiotensin II type 1 receptor
AT_2	angiotensin II type 2 receptor;
GPCR	G protein-coupled receptor
GRKs	G protein-coupled receptor kinases
GSNO	*S*-nitrosoglutathione
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MCAo	middle cerebral artery occlusion
PKC	protein kinase C
RAS	renin–angiotensin system
ROS	reactive oxygen species
SNP	sodium nitroprusside
TBI	traumatic brain injury
TM (1 to 7)	transmembrane domain (1 to 7);
VSMC	vascular smooth muscle cells

References

1. Mukoyama, M.; Nakajima, M.; Horiuchi, M.; Sasamura, H.; Pratt, R.E.; Dzau, V.J. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24539–24542. [CrossRef]
2. Kambayashi, Y.; Bardhan, S.; Takahashi, K.; Tsuzuki, S.; Inui, H.; Hamakubo, T.; Inagami, T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24543–24546. [CrossRef]
3. Inagami, T.; Iwai, N.; Sasaki, K.; Yamano, Y.; Bardhan, S.; Chaki, S.; Guo, D.F.; Furuta, H.; Ohyama, K.; Kambayashi, Y.; et al. Cloning, Expression and Regulation of Angiotensin II Receptors. *Eur. Hear. J.* **1994**, *15*, 104–107. [CrossRef] [PubMed]
4. Hunyady, L.; Catt, K.J. Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* **2006**, *20*, 953–970. [CrossRef]
5. Kawai, T.; Forrester, S.J.; O'Brien, S.; Baggett, A.; Rizzo, V.; Eguchi, S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* **2017**, *125*, 4–13. [CrossRef]

6. de Gasparo, M.; Catt, K.J.; Inagami, T.; Wright, J.W.; Unger, T. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 415–472.
7. Kobori, H.; Nangaku, M.; Navar, L.G.; Nishiyama, A. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacol. Rev.* **2007**, *59*, 251–287. [CrossRef]
8. Coble, J.P.; Grobe, J.L.; Johnson, A.K.; Sigmund, C.D. Mechanisms of brain renin angiotensin system-induced drinking and blood pressure: Importance of the subfornical organ. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2015**, *308*, R238–R249. [CrossRef]
9. Tsutsumi, K.; Saavedra, J.M. Characterization of AT2 angiotensin II receptors in rat anterior cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **1991**, *261*, H667–H670. [CrossRef]
10. Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 639–672.
11. Dimitropoulou, C.; White, R.E.; Fuchs, L.; Zhang, H.; Catravas, J.D.; Carrier, G.O. Angiotensin II Relaxes Microvessels Via the AT 2 Receptor and Ca 2+ -Activated K + (BK Ca) Channels. *Hypertension* **2001**, *37*, 301–307. [CrossRef]
12. Enzo, R.P. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: An enigmatic seven transmembrane receptor. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 958–972. [CrossRef]
13. Matavelli, L.C.; Siragy, H.M. AT2 Receptor Activities and Pathophysiological Implications. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2015**, *65*, 226–232. [CrossRef]
14. Carey, R.M. AT2Receptors: Potential Therapeutic Targets for Hypertension. *Am. J. Hypertens.* **2016**, *30*, 339–347. [CrossRef]
15. Povlsen, A.L.; Grimm, D.; Wehland, M.; Infanger, M.; Krüger, M. The Vasoactive Mas Receptor in Essential Hypertension. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 267. [CrossRef]
16. Dupuis, F.; Atkinson, J.; Limiñana, P.; Chillon, J.-M. Captopril improves cerebrovascular structure and function in old hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *144*, 349–356. [CrossRef]
17. Dupuis, F.; Atkinson, J.; Limiñana, P.; Chillon, J.-M. 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.* **2005**, *23*, 1061–1066. [CrossRef]
18. Vincent, J.-M.; Kwan, Y.W.; Chan, S.-L.; Perrin-Sarrado, C.; Atkinson, J.; Chillon, J.-M. Constrictor and Dilator Effects of Angiotensin II on Cerebral Arterioles. *Stroke* **2005**, *36*, 2691–2695. [CrossRef]
19. Kalra, J.; Prakash, A.; Kumar, P.; Majeed, A.B.A. Cerebroprotective effects of RAS inhibitors: Beyond their cardio-renal actions. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* **2015**, *16*, 459–468. [CrossRef]
20. Gironacci, M.; Vicario, A.; Cerezo, G.; Silva, M.G. The depressor axis of the renin–angiotensin system and brain disorders: A translational approach. *Clin. Sci.* **2018**, *132*, 1021–1038. [CrossRef]
21. Feigin, V.L.; Forouzanfar, M.H.; Krishnamurthi, R.; Mensah, G.A.; Connor, M.; Bennett, D.A.; Moran, A.E.; Sacco, R.L.; Anderson, L.; Truelsen, T.; et al. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **2014**, *383*, 245–255. [CrossRef]
22. Peisker, T.; Koznar, B.; Stetkarova, I.; Widimsky, P. Acute stroke therapy: A review. *Trends Cardiovasc. Med.* **2017**, *27*, 59–66. [CrossRef]
23. Näveri, L.; Strömberg, C.; Saavedra, J.M. Angiotensin II AT, receptor mediated contraction of the perfused rat cerebral artery. *NeuroReport* **1994**, *5*, 2278–2280. [CrossRef]
24. Stenman, E.; Edvinsson, L. Cerebral Ischemia Enhances Vascular Angiotensin AT 1 Receptor–Mediated Contraction in Rats. *Stroke* **2004**, *35*, 970–974. [CrossRef] [PubMed]
25. Kagiyama, T.; Kagiyama, S.; Phillips, M.I. Expression of angiotensin type 1 and 2 receptors in brain after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Regul. Pept.* **2003**, *110*, 241–247. [CrossRef]
26. Walther, T.; Olah, L.; Harms, C.; Maul, B.; Bader, M.; Hörtnagl, H.; Schultheiss, H.-P.; Mies, G. Ischemic injury in experimental stroke depends on angiotensin II. *FASEB J.* **2001**, *16*, 169–176. [CrossRef] [PubMed]
27. Baumbach, G.L.; Sigmund, C.D.; Faraci, F.M. Cerebral Arteriolar Structure in Mice Overexpressing Human Renin and Angiotensinogen. *Hypertension* **2003**, *41*, 50–55. [CrossRef] [PubMed]
28. Dupuis, F.; Vincent, J.-M.; Limiñana, P.; Chillon, J.-M.; 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. [CrossRef] [PubMed]
29. Chillon, J.-M.; Baumbach, G. Effects of an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor and a β-Blocker on Cerebral Arterioles in Rats. *Hypertension* **1999**, *33*, 856–861. [CrossRef]
30. Zhang, M.; Mao, Y.; Ramirez, S.; Tuma, R.; Chabrashvili, T. Angiotensin II induced cerebral microvascular inflammation and increased blood–brain barrier permeability via oxidative stress. *Neuroscience* **2010**, *171*, 852–858. [CrossRef]
31. Kazama, K.; Anrather, J.; Zhou, P.; Girouard, H.; Frys, K.; Milner, T.A.; Iadecola, C. Angiotensin II Impairs Neurovascular Coupling in Neocortex Through NADPH Oxidase–Derived Radicals. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 1019–1026. [CrossRef]
32. De Silva, T.M.; Faraci, F.M. Effects of angiotensin II on the cerebral circulation: Role of oxidative stress. *Front. Physiol.* **2013**, *3*, 484. [CrossRef]
33. Wanderer, S.; Grüter, B.E.; Strange, F.; Sivanrupan, S.; Di Santo, S.; Widmer, H.R.; Fandino, J.; Marbacher, S.; Andereggen, L. The Role of Sartans in the Treatment of Stroke and Subarachnoid Hemorrhage: A Narrative Review of Preclinical and Clinical Studies. *Brain Sci.* **2020**, *10*, 153. [CrossRef]

34. Inci, S.; Spetzler, R.F. Intracranial aneurysms and arterial hypertension: A review and hypothesis. *Surg. Neurol.* **2000**, *53*, 530–542. [CrossRef]
35. Daugherty, A.; Cassis, L. Angiotensin II and abdominal aortic aneurysms. *Curr. Hypertens. Rep.* **2004**, *6*, 442–446. [CrossRef]
36. Daugherty, A.; Rateri, D.L.; Cassis, L.A. Role of the Renin-Angiotensin System in the Development of Abdominal Aortic Aneurysms in Animals and Humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1085*, 82–91. [CrossRef]
37. Ohkuma, H.; Suzuki, S.; Fujita, S.; Nakamura, W. Role of a Decreased Expression of the Local Renin-Angiotensin System in the Etiology of Cerebral Aneurysms. *Circulation* **2003**, *108*, 785–787. [CrossRef]
38. Nishimura, M.; Aoki, T.; Kataoka, H.; Ishibashi, R.; Miyake, T.; Takagi, Y.; Morishita, R.; Hashimoto, N. Role of angiotensin II type 1 receptor in cerebral aneurysm formation in rats. *Int. J. Mol. Med.* **2009**, *24*, 353–359. [CrossRef]
39. Ishibashi, R.; Aoki, T.; Nishimura, M.; Miyamoto, S. Imidapril Inhibits Cerebral Aneurysm Formation in an Angiotensin-Converting Enzyme–Independent and Matrix Metalloproteinase-9–Dependent Manner. *Neurosurgery* **2012**, *70*, 722–730. [CrossRef]
40. Tada, Y.; Wada, K.; Shimada, K.; Makino, H.; Liang, E.I.; Murakami, S.; Kudo, M.; Kitazato, K.T.; Nagahiro, S.; Hashimoto, T. Roles of Hypertension in the Rupture of Intracranial Aneurysms. *Stroke* **2014**, *45*, 579–586. [CrossRef]
41. Kehoe, A.D.; Eleftheriou, K.I.; Heron, M.; Coats, T.J.; Montgomery, H. Angiotensin-converting enzyme genotype may predict survival following major trauma. *Emerg. Med. J.* **2008**, *25*, 759–761. [CrossRef] [PubMed]
42. Ando, H.; Zhou, J.; Macova, M.; Imboden, H.; Saavedra, J.M. Angiotensin II AT 1 Receptor Blockade Reverses Pathological Hypertrophy and Inflammation in Brain Microvessels of Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke* **2004**, *35*, 1726–1731. [CrossRef] [PubMed]
43. Iwai, N.; Inagami, T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* **1992**, *298*, 257–260. [CrossRef]
44. Yamasaki, E.; Thakore, P.; Krishnan, V.; Earley, S. Differential expression of angiotensin II type 1 receptor subtypes within the cerebral microvasculature. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2020**, *318*, H461–H469. [CrossRef] [PubMed]
45. Johren, O.; Saavedra, J.M. Expression of AT1A and AT1B angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-wk-old rats. *Am. J. Physiol. Metab.* **1996**, *271*, E104–E112. [CrossRef]
46. Villapol, S.; Balarezo, M.G.; Affram, K.; Saavedra, J.M.; Symes, A.J. Neurorestoration after traumatic brain injury through angiotensin II receptor blockage. *Brain* **2015**, *138*, 3299–3315. [CrossRef]
47. Villapol, S.; Saavedra, J.M. Neuroprotective Effects of Angiotensin Receptor Blockers. *Am. J. Hypertens.* **2015**, *28*, 289–299. [CrossRef]
48. Benicky, J.; Hafko, R.; Sanchez-Lemus, E.; Aguilera, G.; Saavedra, J.M. Six Commercially Available Angiotensin II AT1 Receptor Antibodies are Non-specific. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2012**, *32*, 1353–1365. [CrossRef]
49. Herrera, M.; Sparks, M.A.; Alfonso-Pecchio, A.R.; Harrison-Bernard, L.M.; Coffman, T.M. Lack of Specificity of Commercial Antibodies Leads to Misidentification of Angiotensin Type 1 Receptor Protein. *Hypertension* **2013**, *61*, 253–258. [CrossRef]
50. Bouressam, M.-L.; Lartaud, I.; Dupuis, F.; Lecat, S. No answer to the lack of specificity: Mouse monoclonal antibody targeting the angiotensin II type 1 receptor AT1 fails to recognize its target. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2018**, *391*, 883–889. [CrossRef]
51. Takezako, T.; Unal, H.; Karnik, S.S.; Node, K. Current topics in angiotensin II type 1 receptor research: Focus on inverse agonism, receptor dimerization and biased agonism. *Pharmacol. Res.* **2017**, *123*, 40–50. [CrossRef]
52. Zhou, J.; Pavel, J.; Macova, M.; Yu, Z.-X.; Imboden, H.; Ge, L.; Nishioku, T.; Dou, J.; Delgiacco, E.; Saavedra, J.M. AT 1 Receptor Blockade Regulates the Local Angiotensin II System in Cerebral Microvessels From Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke* **2006**, *37*, 1271–1276. [CrossRef]
53. Lou, M.; Blume, A.; Zhao, Y.; Gohlke, P.; Deuschl, G.; Herdegen, T.; Culman, J. Sustained Blockade of Brain AT1 Receptors before and after Focal Cerebral Ischemia Alleviates Neurologic Deficits and Reduces Neuronal Injury, Apoptosis, and Inflammatory Responses in the Rat. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *24*, 536–547. [CrossRef]
54. Nishimura, Y.; Ito, T.; Saavedra, J.M. Angiotensin II AT1Blockade Normalizes Cerebrovascular Autoregulation and Reduces Cerebral Ischemia in Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke* **2000**, *31*, 2478–2486. [CrossRef]
55. Ito, T.; Yamakawa, H.; Bregonzio, C.; Terrón, J.A.; Falcón-Neri, A.; Saavedra, J.M. Protection Against Ischemia and Improvement of Cerebral Blood Flow in Genetically Hypertensive Rats by Chronic Pretreatment With an Angiotensin II AT 1 Antagonist. *Stroke* **2002**, *33*, 2297–2303. [CrossRef]
56. Groth, W.; Blume, A.; Gohlke, P.; Unger, T.; Culman, J. Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J. Hypertens.* **2003**, *21*, 2175–2182. [CrossRef]
57. Stier, C.T.; Adler, L.A.; Levine, S.; Chander, P.N. Stroke prevention by losartan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **1993**, *11*, 37–42.
58. Villapol, S.; Yaszemski, A.K.; Logan, T.T.; Sanchez-Lemus, E.; Saavedra, J.M.; Symes, A.J. Candesartan, an Angiotensin II AT1-Receptor Blocker and PPAR-γ Agonist, Reduces Lesion Volume and Improves Motor and Memory Function After Traumatic Brain Injury in Mice. *Neuropsychopharmacology* **2012**, *37*, 2817–2829. [CrossRef]
59. Li, J.-M.; Mogi, M.; Iwanami, J.; Min, L.-J.; Tsukuda, K.; Sakata, A.; Fujita, T.; Iwai, M.; Horiuchi, M. Temporary Pretreatment With the Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker, Valsartan, Prevents Ischemic Brain Damage Through an Increase in Capillary Density. *Stroke* **2008**, *39*, 2029–2036. [CrossRef]

60. Arroja, M.M.C.; Reid, E.; McCabe, C. Therapeutic potential of the renin angiotensin system in ischaemic stroke. *Exp. Transl. Stroke Med.* **2016**, *8*, 1–14. [CrossRef]
61. Hansson, L.; Lindholm, L.H.; Niskanen, L.; Lanke, J.; Hedner, T.; Niklason, A.; Luomanmäki, K.; Dahlöf, B.; de Faire, U.; Mörlin, C.; et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: The Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* **1999**, *353*, 611–616. [CrossRef]
62. Bosch, J.; Yusuf, S.; Pogue, J.; Sleight, P.; Lonn, E.; Rangoonwala, B.; Davies, R.; Ostergren, J.; Probstfield, J. Use of ramipril in preventing stroke: Double blind randomised trial. *BMJ* **2002**, *324*, 699. [CrossRef] [PubMed]
63. PROGRESS Collaborative Group. Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet* **2001**, *358*, 1033–1041. [CrossRef]
64. Dahlöf, B.; Devereux, R.B.; Kjeldsen, S.E.; Julius, S.; Beevers, G.; de Faire, U.; Fyhrquist, F.; Ibsen, H.; Kristiansson, K.; Lederballe-Pedersen, O.; et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): A randomised trial against atenolol. *Lancet* **2002**, *359*, 995–1003. [CrossRef]
65. Lithell, H.; Hansson, L.; Skoog, I.; Elmfeldt, D.; Hofman, A.; Olofsson, B.; Trenkwalder, P.; Zanchetti, A. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE). *J. Hypertens.* **2003**, *21*, 875–886. [CrossRef]
66. Schrader, J.; Lüders, S.; Kulschewski, A.; Hammersen, F.; Plate, K.; Berger, J.; Zidek, W.; Dominiak, P.; Diener, H.C. The MOSES Study Group Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared with Nitrendipine for Secondary Prevention. *Stroke* **2005**, *36*, 1218–1224. [CrossRef]
67. Yusuf, S.; Teo, K.; Anderson, C.S.; Pogue, J.; Dyal, L.; Copland, I.; Schumacher, H.; Dagenais, G.; Sleight, P. 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* **2008**, *372*, 1174–1183. [CrossRef]
68. Yusuf, S.; Diener, H.-C.; Sacco, R.L.; Cotton, D.; Ôunpuu, S.; Lawton, W.A.; Palesch, Y.; Martin, R.H.; Albers, G.W.; Bath, P.; et al. Telmisartan to Prevent Recurrent Stroke and Cardiovascular Events. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1225–1237. [CrossRef]
69. Schrader, J.; Lüders, S.; Kulschewski, A.; Berger, J.; Zidek, W.; Treib, J.; Einhäupl, K.; Diener, H.C.; Dominiak, P. The ACCESS Study. *Stroke* **2003**, *34*, 1699–1703. [CrossRef]
70. Sandset, E.C.; Bath, P.; Boysen, G.; Jatuzis, D.; Kõrv, J.; Lüders, S.; Murray, G.D.; Richter, P.S.; Roine, R.O.; Terént, A.; et al. The angiotensin-receptor blocker candesartan for treatment of acute stroke (SCAST): A randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet* **2011**, *377*, 741–750. [CrossRef]
71. Cabana, J.; Holleran, B.; Leduc, R.; Escher, E.; Guillemette, G.; Lavigne, P. 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.* **2015**, *290*, 15835–15854. [CrossRef]
72. Guilluy, C.; Brégeon, J.; Toumaniantz, G.; Rolli-Derkinderen, M.; Retailleau, K.; Loufrani, L.; Henrion, D.; Scalbert, E.; Bril, A.; Torres, R.M.; et al. The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 183–190. [CrossRef]
73. Miura, S.-I.; Zhang, J.; Boros, J.; Karnik, S.S. TM2-TM7 Interaction in Coupling Movement of Transmembrane Helices to Activation of the Angiotensin II Type-1 Receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 3720–3725. [CrossRef]
74. Galandrin, S.; Denis, C.; Boularan, C.; Marie, J.; M'Kadmi, C.; Pilette, C.; Dubroca, C.; Nicaise, Y.; Seguelas, M.-H.; N'Guyen, D.; et al. Cardioprotective Angiotensin-(1–7) Peptide Acts as a Natural-Biased Ligand at the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Hypertension* **2016**, *68*, 1365–1374. [CrossRef]
75. Namkung, Y.; LeGouill, C.; Kumar, S.; Cao, Y.; Teixeira, L.B.; Lukasheva, V.; Giubilaro, J.; Simões, S.C.; Longpré, J.-M.; Devost, D.; et al. Functional selectivity profiling of the angiotensin II type 1 receptor using pathway-wide BRET signaling sensors. *Sci. Signal.* **2018**, *11*, eaat1631. [CrossRef]
76. Connolly, A.; Holleran, B.J.; Simard, É.; Baillargeon, J.-P.; Lavigne, P.; Leduc, R. Interplay between intracellular loop 1 and helix VIII of the angiotensin II type 2 receptor controls its activation. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *168*, 330–338. [CrossRef]
77. Wirth, A.; Benyó, Z.; Lukasova, M.; Leutgeb, B.; Wettschureck, N.; Gorbey, S.; Örsy, P.; Horváth, B.; Maser-Gluth, C.; Greiner, E.; et al. G12-G13–LARG–mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 64–68. [CrossRef]
78. Freeman, E.J.; Ruehr, M.L.; Dorman, R.V. ANG II-induced translocation of cytosolic PLA2 to the nucleus in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Content* **1998**, *274*, C282–C288. [CrossRef]
79. Zafari, A.M.; Ushio-Fukai, M.; Minieri, C.A.; Akers, M.; Lassègue, B.; Griendling, K.K. Arachidonic Acid Metabolites Mediate Angiotensin II-Induced NADH/NADPH Oxidase Activity and Hypertrophy in Vascular Smooth Muscle Cells. *Antioxid. Redox Signal.* **1999**, *1*, 167–179. [CrossRef]
80. Cat, A.N.D.; Montezano, A.C.; Burger, D.; Touyz, R.M. Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 1110–1120. [CrossRef]
81. Lohse, M.; Andexinger, S.; Pitcher, J.; Trukawinski, S.; Codina, J.; Faure, J.; Caron, M.; Lefkowitz, R. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8558–8564. [CrossRef]
82. Gurevich, V.V.; Gurevich, E.V. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 125. [CrossRef]

83. Reiter, E.; Ahn, S.; Shukla, A.; Lefkowitz, R.J. Molecular Mechanism of β-Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *52*, 179–197. [CrossRef]
84. Bologna, Z.; Teoh, J.-P.; Bayoumi, A.S.; Tang, Y.; Kim, I.-M. Biased G Protein-Coupled Receptor Signaling: New Player in Modulating Physiology and Pathology. *Biomol. Ther.* **2017**, *25*, 12–25. [CrossRef]
85. Galandrin, S.; Oligny-Longpré, G.; Bouvier, M. The evasive nature of drug efficacy: Implications for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 423–430. [CrossRef]
86. Roth, B.L.; Chuang, D.-M. Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction. *Life Sci.* **1987**, *41*, 1051–1064. [CrossRef]
87. Zhou, X.E.; He, Y.; de Waal, P.W.; Gao, X.; Kang, Y.; Van Eps, N.; Yin, Y.; Pal, K.; Goswami, D.; White, T.A.; et al. Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell* **2017**, *170*, 457–469.e13. [CrossRef]
88. Whalen, E.J.; Rajagopal, S.; Lefkowitz, R.J. Therapeutic potential of β-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 126–139. [CrossRef]
89. Grundmann, M.; Merten, N.; Malfacini, D.; Inoue, A.; Preis, P.; Simon, K.; Rüttiger, N.; Ziegler, N.; Benkel, T.; Schmitt, N.K.; et al. Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–16. [CrossRef]
90. Luttrell, L.M.; Wang, J.; Plouffe, B.; Smith, J.S.; Yamani, L.; Kaur, S.; Jean-Charles, P.-Y.; Gauthier, C.; Lee, M.-H.; Pani, B.; et al. Manifold roles of β-arrestins in GPCR signaling elucidated with siRNA and CRISPR/Cas9. *Sci. Signal.* **2018**, *11*, eaat7650. [CrossRef]
91. Gurevich, V.V. Arrestin-mediated signaling: Is there a controversy? *World J. Biol. Chem.* **2018**, *9*, 25–35. [CrossRef] [PubMed]
92. Turu, G.; Balla, A.; Hunyady, L. The Role of β-Arrestin Proteins in Organization of Signaling and Regulation of the AT1 Angiotensin Receptor. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 519. [CrossRef] [PubMed]
93. Violin, J.D.; Lefkowitz, R.J. β-Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 416–422. [CrossRef] [PubMed]
94. Wingler, L.; Elgeti, M.; Hilger, D.; Latorraca, N.R.; Lerch, M.T.; Staus, D.P.; Dror, R.O.; Kobilka, B.K.; Hubbell, W.L.; Lefkowitz, R.J. Angiotensin Analogs with Divergent Bias Stabilize Distinct Receptor Conformations. *Cell* **2019**, *176*, 468–478.e11. [CrossRef] [PubMed]
95. Wingler, L.; McMahon, C.; Staus, D.P.; Lefkowitz, R.J.; Kruse, A.C. Distinctive Activation Mechanism for Angiotensin Receptor Revealed by a Synthetic Nanobody. *Cell* **2019**, *176*, 479–490.e12. [CrossRef] [PubMed]
96. Wingler, L.M.; Skiba, M.A.; McMahon, C.; Staus, D.P.; Kleinhenz, A.L.W.; Suomivuori, C.-M.; Latorraca, N.R.; Dror, R.O.; Lefkowitz, R.J.; Kruse, A.C. Angiotensin and biased analogs induce structurally distinct active conformations within a GPCR. *Science* **2020**, *367*, 888–892. [CrossRef] [PubMed]
97. Modestia, S.M.; De Sa, M.M.; Auger, E.; Trossini, G.H.G.; Krieger, J.E.; Rangel-Yagui, C.D.O.; Rangel-Yagui, C.O. Biased Agonist TRV027 Determinants in AT1R by Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *59*, 797–808. [CrossRef]
98. Suomivuori, C.-M.; Latorraca, N.R.; Wingler, L.M.; Eismann, S.; King, M.C.; Kleinhenz, A.L.W.; Skiba, M.A.; Staus, D.P.; Kruse, A.C.; Lefkowitz, R.J.; et al. Molecular mechanism of biased signaling in a prototypical G protein–coupled receptor. *Science* **2020**, *367*, 881–887. [CrossRef]
99. Zhang, H.; Unal, H.; Gati, C.; Han, G.W.; Liu, W.; Zatsepin, N.; James, D.; Wang, D.; Nelson, G.; Weierstall, U.; et al. Structure of the Angiotensin Receptor Revealed by Serial Femtosecond Crystallography. *Cell* **2015**, *161*, 833–844. [CrossRef]
100. Valero, T.R.; Sturchler, E.; Jafferjee, M.; Rengo, G.; Magafa, V.; Cordopatis, P.; McDonald, P.; Koch, W.J.; Lymperopoulos, A. Structure–activity relationship study of angiotensin II analogs in terms of β -arrestin-dependent signaling to aldosterone production. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2016**, *4*, e00226. [CrossRef]
101. Rajagopal, S.; Kim, J.; Ahn, S.; Craig, S.; Lam, C.M.; Gerard, N.P.; Gerard, C.; Lefkowitz, R.J. β-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 628–632. [CrossRef]
102. Galzi, J.-L.; Hachet-Haas, M.; Bonnet, D.; Daubeuf, F.; Lecat, S.; Hibert, M.; Haiech, J.; Frossard, N. Neutralizing endogenous chemokines with small molecules: Principles and potential therapeutic applications. *Pharmacol. Ther.* **2010**, *126*, 39–55. [CrossRef]
103. Stamler, J.S.; Simon, D.I.; Osborne, J.A.; Mullins, M.E.; Jaraki, O.; Michel, T.; Singel, D.J.; Loscalzo, J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 444–448. [CrossRef]
104. Ferro, A. S-Nitrosothiols as Nitric Oxide-Donors: Chemistry, Biology and Possible Future Therapeutic Applications. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2679–2690. [CrossRef]
105. 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. [CrossRef]
106. Leclerc, P.C.; Lanctot, P.M.; 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. [CrossRef]
107. Bouressam, M.-L.; Lecat, S.; Raoul, A.; Gaucher, C.; Perrin-Sarrado, C.; Lartaud, I.; Dupuis, F. S-nitrosoglutathione inhibits cerebrovascular angiotensin II-dependent and -independent AT 1 receptor responses: A possible role of S -nitrosation. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 2049–2062. [CrossRef]
108. Khan, M.; Sekhon, B.; Giri, S.; Jatana, M.; Gilg, A.G.; Ayasolla, K.; Elango, C.; Singh, A.K.; Singh, I. S-Nitrosoglutathione Reduces Inflammation and Protects Brain against Focal Cerebral Ischemia in a Rat Model of Experimental Stroke. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *25*, 177–192. [CrossRef]

109. Khan, M.; Dhammu, T.S.; Sakakima, H.; Shunmugavel, A.; Gilg, A.G.; Singh, A.K.; Singh, I. The inhibitory effect of S-nitrosoglutathione on blood-brain barrier disruption and peroxynitrite formation in a rat model of experimental stroke. *J. Neurochem.* **2012**, *123*, 86–97. [CrossRef]
110. Parent, M.; Boudier, A.; Perrin, J.; Vigneron, C.; Maincent, P.; Violle, N.; Bisson, J.-F.; Lartaud, I.; Dupuis, F. In Situ Microparticles Loaded with S-Nitrosoglutathione Protect from Stroke. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144659. [CrossRef]
111. Pinheiro, L.C.; Oliveira-Paula, G.H.; Ferreira, G.C.; de Paula, T.D.-C.; Duarte, D.A.; Costa-Neto, C.M.; Tanus-Santos, J.E. Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II. *Redox Biol.* **2021**, *38*, 101769. [CrossRef]
112. Schnitzler, M.M.Y.; Storch, U.; Meibers, S.; Nurwakagari, P.; Breit, A.; Essin, K.; Gollasch, M.; Gudermann, T. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J.* **2008**, *27*, 3092–3103. [CrossRef]
113. Hansen, J.L.; Haunsø, S.; Brann, M.R.; Sheikh, S.P.; Weiner, D.M. Loss-of-Function Polymorphic Variants of the Human Angiotensin II Type 1 Receptor. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 770–777. [CrossRef]
114. Cao, Y.; Kumar, S.; Namkung, Y.; Gagnon, L.; Cho, A.; Laporte, S.A. Angiotensin II type 1 receptor variants alter endosomal receptor–β-arrestin complex stability and MAPK activation. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 13169–13180. [CrossRef]
115. Thomas, W.G.; Qian, H. Arresting angiotensin type 1 receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **2003**, *14*, 130–136. [CrossRef]
116. Gáborik, Z.; Hunyady, L. Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **2004**, *15*, 286–293. [CrossRef]
117. Christensen, G.L.; Kelstrup, C.D.; Lyngsø, C.; Sarwar, U.; Bøgebo, R.; Sheikh, S.P.; Gammeltoft, S.; Olsen, J.V.; Hansen, J.L. Quantitative Phosphoproteomics Dissection of Seven-transmembrane Receptor Signaling Using Full and Biased Agonists. *Mol. Cell. Proteom.* **2010**, *9*, 1540–1553. [CrossRef]
118. Kendall, R.T.; Strungs, E.G.; Rachidi, S.M.; Lee, M.-H.; El-Shewy, H.M.; Luttrell, D.K.; Janech, M.G.; Luttrell, L.M. The β-Arrestin Pathway-selective Type 1A Angiotensin Receptor (AT1A) Agonist [Sar1,Ile4,Ile8]Angiotensin II Regulates a Robust G Protein-independent Signaling Network. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19880–19891. [CrossRef]
119. Pfeiffer, C.T.; Wang, J.; Paulo, J.A.; Jiang, X.; Gygi, S.P.; Rockman, H.A. Mapping Angiotensin II Type 1 Receptor-Biased Signaling Using Proximity Labeling and Proteomics Identifies Diverse Actions of Biased Agonists. *J. Proteome Res.* **2021**, *20*, 3256–3267. [CrossRef]
120. Sanni, S.; Hansen, J.; Bonde, M.; Speerschneider, T.; Christensen, G.L.; Munk, S.; Gammeltoft, S.; Hansen, J. β-Arrestin 1 and 2 stabilize the angiotensin II type I receptor in distinct high-affinity conformations. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 150–161. [CrossRef]
121. Srivastava, A.; Gupta, B.; Gupta, C.; Shukla, A.K. Emerging Functional Divergence of β-Arrestin Isoforms in GPCR Function. *Trends Endocrinol. Metab.* **2015**, *26*, 628–642. [CrossRef] [PubMed]
122. McCrink, K.A.; Maning, J.; Vu, A.; Jafferjee, M.; Marrero, C.; Brill, A.; Bathgate-Siryk, A.; Dabul, S.; Koch, W.J.; Lymperopoulos, A. β-Arrestin2 Improves Post–Myocardial Infarction Heart Failure via Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca 2+ -ATPase–Dependent Positive Inotropy in Cardiomyocytes. *Hypertension* **2017**, *70*, 972–981. [CrossRef] [PubMed]
123. Revankar, C.M.; Vines, C.M.; Cimino, D.F.; Prossnitz, E.R. Arrestins Block G Protein-coupled Receptor-mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24578–24584. [CrossRef] [PubMed]
124. Lefkowitz, R.J.; Rajagopal, K.; Whalen, E.J. New Roles for β-Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors. *Mol. Cell* **2006**, *24*, 643–652. [CrossRef]
125. DeWire, S.; Ahn, S.; Lefkowitz, R.J.; Shenoy, S.K. β-Arrestins and Cell Signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*, 483–510. [CrossRef]
126. Peterson, Y.K.; Luttrell, L.M. The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol. Rev.* **2017**, *69*, 256–297. [CrossRef]
127. Watari, K.; Nakaya, M.; Nishida, M.; Kim, K.-M.; Kurose, H. β-arrestin2 in Infiltrated Macrophages Inhibits Excessive Inflammation after Myocardial Infarction. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68351. [CrossRef]
128. Wang, Y.; Jin, L.; Song, Y.; Zhang, M.; Shan, D.; Liu, Y.; Fang, M.; Lv, F.; Xiao, R.-P.; Zhang, Y. β-arrestin 2 mediates cardiac ischemia-reperfusion injury via inhibiting GPCR-independent cell survival signalling. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 1615–1626. [CrossRef]
129. Rajagopal, K.; Whalen, E.J.; Violin, J.D.; Stiber, J.A.; Rosenberg, P.B.; Premont, R.; Coffman, T.M.; Rockman, H.A.; Lefkowitz, R.J. β-Arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16284–16289. [CrossRef]
130. Kim, K.-S.; Abraham, D.; Williams, B.; Violin, J.D.; Mao, L.; Rockman, H.A. β-Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2012**, *303*, H1001–H1010. [CrossRef]
131. Violin, J.D.; DeWire, S.; Yamashita, D.; Rominger, D.H.; Nguyen, L.; Schiller, K.; Whalen, E.J.; Gowen, M.; Lark, M.W. Selectively Engaging β-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *335*, 572–579. [CrossRef] [PubMed]
132. Boerrigter, G.; Lark, M.W.; Whalen, E.J.; Soergel, D.G.; Violin, J.D.; Burnett, J.C.; Jr, J.C.B. Cardiorenal Actions of TRV120027, a Novel ß-Arrestin–Biased Ligand at the Angiotensin II Type I Receptor, in Healthy and Heart Failure Canines. *Circ. Hear. Fail.* **2011**, *4*, 770–778. [CrossRef] [PubMed]
133. Boerrigter, G.; Soergel, D.G.; Violin, J.D.; Lark, M.W.; Burnett, J.C. 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. Hear. Fail.* **2012**, *5*, 627–634. [CrossRef] [PubMed]

134. Soergel, D.; Subach, R.A.; James, I.E.; Cowan, C.L.; Gowen, M.; Lark, M. Trvo27, a beta-arrestin biased ligand at the angiotensin 2 type 1 receptor, produces rapid, reversible changes in hemodynamics in patients with stable systolic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *61*, E683. [CrossRef]
135. Felker, G.M.; Butler, J.; Collins, S.P.; Cotter, G.; Davison, B.A.; Ezekowitz, J.A.; Filippatos, G.; Levy, P.D.; Metra, M.; Ponikowski, P.; et al. Heart Failure Therapeutics on the Basis of a Biased Ligand of the Angiotensin-2 Type 1 Receptor. *JACC Hear. Fail.* **2015**, *3*, 193–201. [CrossRef]
136. Pang, P.S.; Butler, J.; Collins, S.P.; Cotter, G.; Davison, B.A.; Ezekowitz, J.A.; Filippatos, G.; Levy, P.D.; Metra, M.; Ponikowski, P.; et al. 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. Hear. J.* **2017**, *38*, 2364–2373. [CrossRef]
137. Rakesh, K.; Yoo, B.; Kim, I.-M.; Salazar, N.C.; Kim, K.-S.; Rockman, H.A. β-Arrestin-Biased Agonism of the Angiotensin Receptor Induced by Mechanical Stress. *Sci. Signal.* **2010**, *3*, ra46. [CrossRef]
138. Monasky, M.M.; Taglieri, D.M.; Henze, M.; Warren, C.M.; Utter, M.S.; Soergel, D.G.; Violin, J.D.; Solaro, R.J. The β-arrestin-biased ligand TRV120023 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy while preserving enhanced myofilament response to calcium. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2013**, *305*, H856–H866. [CrossRef]
139. Tarigopula, M.; Davis, R.T.; Mungai, P.T.; Ryba, D.M.; Wieczorek, D.F.; Cowan, C.L.; Violin, J.D.; Wolska, B.M.; Solaro, R.J. Cardiac myosin light chain phosphorylation and inotropic effects of a biased ligand, TRV120023, in a dilated cardiomyopathy model. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *107*, 226–234. [CrossRef]
140. Zhang, H.; Han, G.W.; Batyuk, A.; Ishchenko, A.; White, K.L.; Patel, N.; Sadybekov, A.; Zamlynny, B.; Rudd, M.T.; Hollenstein, K.; et al. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *544*, 327–332. [CrossRef]
141. Teixeira, L.B.; Parreiras-E-Silva, L.T.; Bruder-Nascimento, T.; Duarte, D.A.; Simões, S.C.; Costa, R.M.; Rodríguez, D.Y.; Ferreira, P.A.B.; Silva, C.A.A.; Abrao, E.P.; et al. Ang-(1-7) is an endogenous β-arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10. [CrossRef]
142. Ferreira, A.J.; Santos, R.A.; Almeida, A.P. Angiotensin-(1-7): Cardioprotective Effect in Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Hypertension* **2001**, *38*, 665–668. [CrossRef]
143. Grobe, J.L.; Mecca, A.P.; Lingis, M.; Shenoy, V.; Bolton, T.A.; Machado, J.M.; Speth, R.C.; Raizada, M.K.; Katovich, M.J. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1–7). *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H736–H742. [CrossRef]
144. Ferreira, A.J.; Jacoby, B.A.; Araújo, C.A.A.; Macedo, F.A.F.F.; Silva, G.A.B.; Almeida, A.P.; Caliari, M.; Santos, R.A.S. The nonpeptide angiotensin-(1–7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H1113–H1119. [CrossRef]
145. Mecca, A.P.; Regenhardt, R.; O'Connor, T.E.; Joseph, J.P.; Raizada, M.K.; Katovich, M.J.; Sumners, C. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Exp. Physiol.* **2011**, *96*, 1084–1096. [CrossRef]
146. Regenhardt, R.; Bennion, D.; Sumners, C. Cerebroprotective action of angiotensin peptides in stroke. *Clin. Sci.* **2014**, *126*, 195–205. [CrossRef]
147. Jiang, T.; Gao, L.; Guo, J.; Lu, J.; Wang, Y.; Zhang, Y. Suppressing inflammation by inhibiting the NF-κB pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 1520–1532. [CrossRef] [PubMed]
148. Turu, G.; Szidonya, L.; Gáborik, Z.; Buday, L.; Spät, A.; Clark, A.J.; Hunyady, L. Differential β-arrestin binding of AT1and AT2angiotensin receptors. *FEBS Lett.* **2005**, *580*, 41–45. [CrossRef]
149. Villela, D.; Leonhardt, J.; Patel, N.; Joseph, J.; Kirsch, S.; Hallberg, A.; Unger, T.; Bader, M.; Santos, R.A.; Sumners, C.; et al. Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: A complex liaison. *Clin. Sci.* **2014**, *128*, 227–234. [CrossRef]
150. Lyngsø, C.; Erikstrup, N.; Hansen, J.L. Functional interactions between 7TM receptors in the Renin-Angiotensin System—Dimerization or crosstalk? *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *302*, 203–212. [CrossRef]
151. Porrello, E.R.; Pfleger, K.; Seeber, R.M.; Qian, H.; Oro, C.; Abogadie, F.; Delbridge, L.M.; Thomas, W.G. Heteromerization of angiotensin receptors changes trafficking and arrestin recruitment profiles. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 1767–1776. [CrossRef] [PubMed]
152. Szalai, B.; Barkai, L.; Turu, G.; Szidonya, L.; Várnai, P.; Hunyady, L. Allosteric interactions within the AT1 angiotensin receptor homodimer: Role of the conserved DRY motif. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 477–485. [CrossRef] [PubMed]
153. Durdagi, S.; Erol, I.; Salmas, R.E.; Aksoydan, B.; Kantarcioglu, I. Oligomerization and cooperativity in GPCRs from the perspective of the angiotensin AT1 and dopamine D2 receptors. *Neurosci. Lett.* **2019**, *700*, 30–37. [CrossRef] [PubMed]
154. Wang, P.; Xu, T.-Y.; Wei, K.; Guan, Y.-F.; Wang, X.; Xu, H.; Su, D.-F.; Pei, G.; Miao, C.-Y. ARRB1/β-arrestin-1 mediates neuroprotection through coordination of BECN1-dependent autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy* **2014**, *10*, 1535–1548. [CrossRef]
155. Wang, H.; Deng, Q.-W.; Peng, A.-N.; Xing, F.-L.; Zuo, L.; Li, S.; Gu, Z.-T.; Yan, F.-L. β-arrestin2 functions as a key regulator in the sympathetic-triggered immunodepression after stroke. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 1–11. [CrossRef]
156. Kanki, H.; Sasaki, T.; Matsumura, S.; Yokawa, S.; Yukami, T.; Shimamura, M.; Sakaguchi, M.; Furuno, T.; Suzuki, T.; Mochizuki, H. β-arrestin-2 in PAR-1-biased signaling has a crucial role in endothelial function via PDGF-β in stroke. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 1–16. [CrossRef]

molecules

MDPI

Review

The AT_1/AT_2 Receptor Equilibrium Is a Cornerstone of the Regulation of the Renin Angiotensin System beyond the Cardiovascular System

Mélissa Colin [1,2], Céline Delaitre [1], Sébastien Foulquier [2,3] and François Dupuis [1,*]

[1] CITHEFOR, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; melissa.colin@univ-lorraine.fr (M.C.); celine.delaitre@univ-lorraine.fr (C.D.)
[2] Department of Pharmacology and Toxicology, MHeNS—School for Mental Health and Neuroscience, Maastricht University, 6200 MD Maastricht, The Netherlands; s.foulquier@maastrichtuniversity.nl
[3] CARIM—School for Cardiovascular Diseases, Maastricht University, 6200 MD Maastricht, The Netherlands
* Correspondence: francois.dupuis@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-372747274

Abstract: The AT_1 receptor has mainly been associated with the pathological effects of the renin-angiotensin system (RAS) (e.g., hypertension, heart and kidney diseases), and constitutes a major therapeutic target. In contrast, the AT_2 receptor is presented as the protective arm of this RAS, and its targeting via specific agonists is mainly used to counteract the effects of the AT_1 receptor. The discovery of a local RAS has highlighted the importance of the balance between AT_1/AT_2 receptors at the tissue level. Disruption of this balance is suggested to be detrimental. The fine tuning of this balance is not limited to the regulation of the level of expression of these two receptors. Other mechanisms still largely unexplored, such as *S*-nitrosation of the AT_1 receptor, homo- and heterodimerization, and the use of AT_1 receptor-biased agonists, may significantly contribute to and/or interfere with the settings of this AT_1/AT_2 equilibrium. This review will detail, through several examples (the brain, wound healing, and the cellular cycle), the importance of the functional balance between AT_1 and AT_2 receptors, and how new molecular pharmacological approaches may act on its regulation to open up new therapeutic perspectives.

Keywords: AT_1 receptor; AT_2 receptor; angiotensin II; AT_1/AT_2 balance; biased agonism; TRV120027; *S*-nitrosation

check for updates

Citation: Colin, M.; Delaitre, C.; Foulquier, S.; Dupuis, F. The AT_1/AT_2 Receptor Equilibrium Is a Cornerstone of the Regulation of the Renin Angiotensin System beyond the Cardiovascular System. *Molecules* **2023**, *28*, 5481. https://doi.org/10.3390/molecules28145481

Academic Editor: Aaron T. Wright

Received: 6 June 2023
Revised: 11 July 2023
Accepted: 14 July 2023
Published: 18 July 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Over the past decades, the team of Professor Jeffrey Atkinson, who recently passed away (1943–2023) and who taught Pharmacology at the Faculty of Pharmacy of Nancy for over 25 years, has contributed to demonstrating the major role of the renin angiotensin system (RAS) in the regulation of the cardiovascular system and the cerebral circulation [1–4].

The RAS is an important hormonal system involved in numerous physiological processes, as shown by the copious literature devoted to the exploration and comprehension of this system since the discovery of renin in the late 19th century by Robert Tigerstedt [5]. The systemic RAS is known for its involvement in vascular homeostasis, blood pressure regulation, and sodium and water retention in the kidney [6]. Angiotensinogen, a glycoprotein produced by the liver and released in the blood is the first element of the systemic RAS. When blood pressure drops, the juxtaglomerular apparatus in the kidney releases renin, an enzyme which cleaves angiotensinogen into angiotensin I (Ang I), an inactive decapeptide. Subsequently, Ang I will be turned into angiotensin II (Ang II) by the angiotensin I-converting enzyme (ACE) [7], mainly expressed at the surface of endothelial cells. Ang II, an octapeptide, is the main endogenous ligand of the RAS, and binds to two main receptors: the angiotensin II type 1 receptor (AT_1) and the angiotensin II type 2 receptor (AT_2), both belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) family [8,9]. The

hydrolysis of Ang II [10] by the angiotensin II-converting enzyme 2 (ACE2) produces the heptapeptide Ang-(1-7). Ang-(1-7) mediates signaling via the Mas receptor (MasR) and the Mas-related G protein-coupled receptor member D (MrgD receptor) (Figure 1). In addition, decarboxylation of Ang-(1-7) transforms it into alamandin, which is also able to bind to the MrGD receptor. These two axes have been the subject of many recent reviews, and will not be discussed in this article [11–13]. The AT_4 receptor, whose ligand is Ang IV, has been identified as a transmembrane enzyme, insulin-regulated membrane aminopeptidase (IRAP) [14]. In addition to its vasorelaxant effect in cerebral [15] and renal [16] vascular beds, the AT_4 receptor seems to be involved in memory and in Alzheimer's disease [17,18].

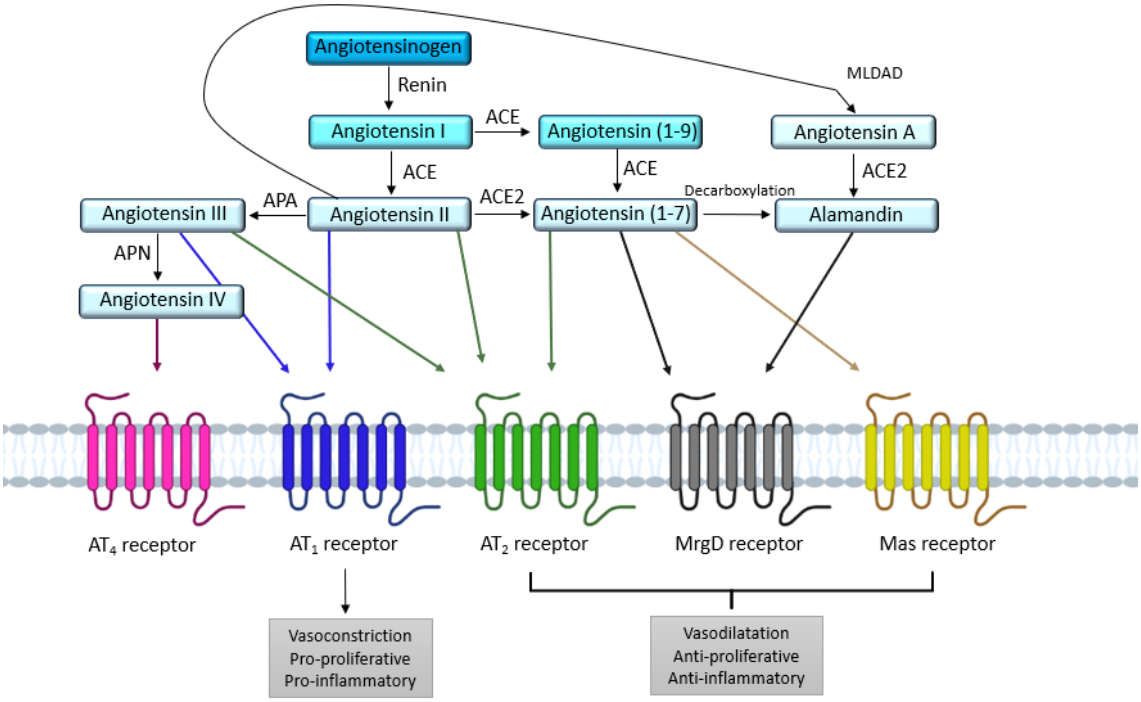


Figure 1. Overview of the different receptors and enzymes involved in the renin angiotensin system. ACE: angiotensin I-converting enzyme; ACE2: angiotensin II-converting enzyme 2; APA: aminopeptidase A; APN: aminopeptidase N; AT_1: angiotensin II type 1 receptor; AT_2: angiotensin II type 2 receptor; MLDAD: mononuclear leukocyte-derived aspartate decarboxylase; MrgD: Mas-related G protein-coupled receptor, member D.

The two main receptors for Ang II, the AT_1 and AT_2 receptors, share a similar affinity for Ang II [9] but exert opposite actions [19,20]. These characteristics suggest that the stimulation of RAS and Ang II production may lead to physiological responses that directly reflect the functional balance between AT_1 and AT_2 receptors. From a systemic point of view, most of the known effects of RAS activation (elevated blood pressure, water and sodium retention, aldosterone release…) are subsequent to AT_1 receptor activation, as the expression and activity of AT_2 receptor seem too low to counteract AT_1 receptor stimulation. Apart from the systemic RAS, many studies have shown the existence of a localized expression of RAS components in various tissues. For instance, Campbell and Habener in 1986 measured angiotensinogen mRNA levels in 17 different organs in rats; brain, spinal cord, aorta, and mesentery levels were similar to hepatic levels, whereas the levels were lower in the kidney, adrenal, atria, lung, large intestine, spleen, and stomach [21]. Moreover, in humans, the expression of angiotensinogen mRNA is also found in different organs as indicated by the Human Protein Atlas.

These results indicate that many of the tissue-specific actions of angiotensin II may be mediated by local tissue RAS, independently of the circulating RAS. Thus, at this tissue

level, a possible balance of these AT_1/AT_2 receptor appears to be of major importance in the regulation of RAS activity, and the fine tuning of this AT_1/AT_2 balance seems critical.

The objective of this review is to emphasize the importance of this local functional balance between AT_1 and AT_2 receptors in physiological and pathophysiological processes. After a brief analysis of the structure and signalization of these two receptors, which have been recently reviewed [22,23], we will highlight the importance of the AT_1/AT_2 equilibrium. We will not illustrate this point through a systematic review, but through several examples chosen to emphasize the ubiquitous aspect of this major regulation of physiological functions. As we are interested in the vascular and cerebrovascular effects of this system, these will be described first, followed by the cell cycle/cancerization process and wound healing. In the last chapters, we will discuss the mechanisms of this AT_1/AT_2 balance, as well as different perspectives to be considered in order to modulate it.

2. AT_1 and AT_2 Angiotensin II Receptors

2.1. AT_1 Receptor

The AT_1 receptor is responsible for vasoconstriction, cell growth and proliferation, oxidative stress, inflammation, and also hypertrophy and hyperplasia [24,25]. Most of these actions result from the activation of intracellular signaling pathways involving several phospholipases and kinases (see below).

This receptor is expressed in several organs such as artery walls (smooth muscle cells), wherein it is highly expressed [26], but also in the heart (cardiomyocytes) [27], kidney (glomeruli, proximal convoluted tubules) [28] and brain (neurons, microglia cells) [29]. Two isoforms, the AT_{1A} and AT_{1B} receptors [30], have been identified in rodents, showing a sequence homology of more than 96%, and identical functions. In humans, only one isoform has been identified.

The AT_1 receptor is a GPCR classically described to activate the phospholipase C (PLC) via G_q protein, although it also interacts with G_i, $G_{12/13}$, and G_s proteins [20].

2.1.1. Structure

Advances in protein crystallization have led to the elucidation of crystalline structures for GPCRs, providing insight into activation and signaling mechanisms. As GPCRs are often involved in diseases, these crystalline structures also pave the way for structured drug design. The emergence of X-ray crystallography allowed the first crystalline structure of the AT_1 receptor to be co-crystallized with an angiotensin II receptor blocker (ARB) [31].

AT_1 receptor is a member of the seven transmembrane or GPCR family. Its sequence of 359 amino acids includes three *N*-glycosylation sites (that enable the proper folding of the receptor and account for its trafficking to the membrane) and four cysteine residues at the extracellular regions [20] (Figure 2). In addition to the two cysteines involved in a disulfide bridge between the first and second extracellular loops as for all GPCRs, the AT_1 receptor contains an additional pair of extracellular cysteine residues. These cysteine residues are located on the N-terminal part and the third extracellular loop, and thus form a second disulfide bridge responsible for maintaining the conformation of the AT_1 receptor and its binding to Ang II [32]. The cytoplasmic region of the receptor, composed of three intracellular loops and the C-terminal tail, contains sites that can be phosphorylated by several serine/threonine kinases, such as protein kinase C (PKC), and also has four cysteine residues which are involved in disulfide bridges [20].

The AT_1 receptor can adopt three different conformations that directly influence its activity [33]. The inactive conformation is stabilized by ARBs and does not lead to any downstream signaling. The "canonical active" conformation is observed after the binding of the endogenous ligand (Ang II), and allows the activation of many different signaling pathways (see below). The binding of Ang II results in a movement of the seventh transmembrane domain on the intracellular side, allowing the recruitment of G proteins or of β-arrestin. Finally, the "active alternative" conformation (incomplete movement of the seventh transmembrane domain on the intracellular side) prevents G protein coupling to

the DRY motif of the receptor (Figure 1), and only allows recruitment and stimulation of the β-arrestin signaling pathway [33,34].

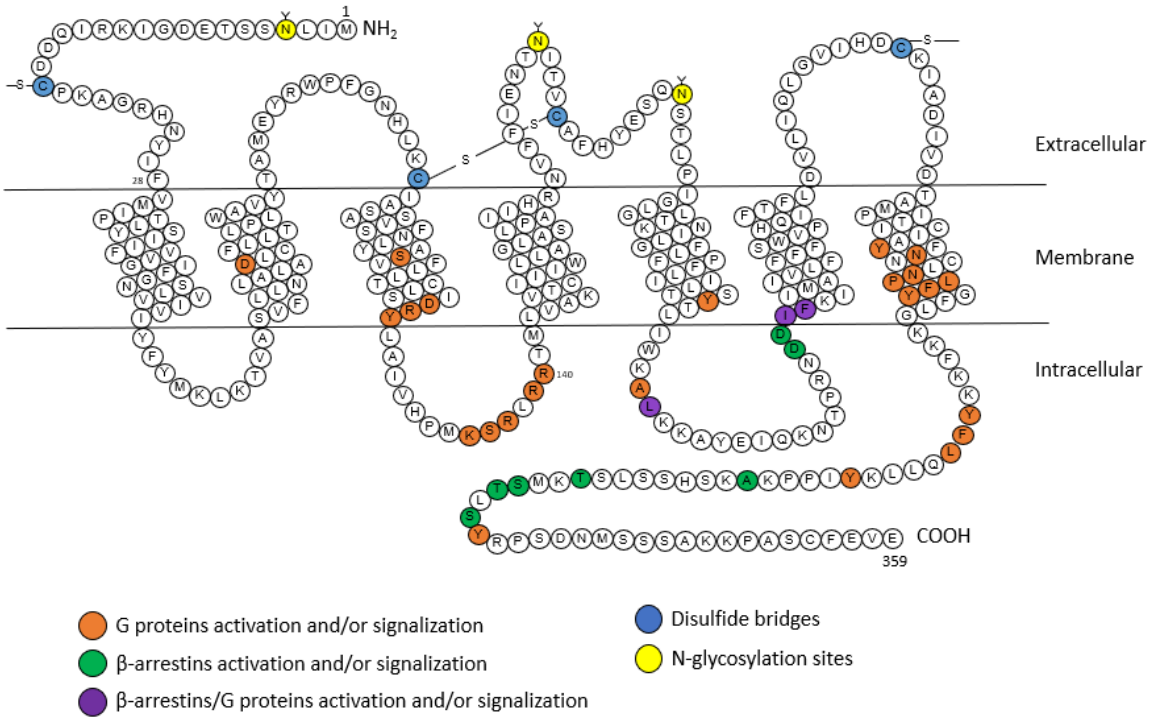


Figure 2. Snake plot of the rat AT_1A receptor (modified from [20,35,36]). Orange: amino acids for the activation of G proteins, green: amino acids for the activation of β-arrestins, purple: amino acids for the activation of G proteins and β-arrestins, blue: disulfide bridges, yellow: N-glycosylation sites. A: alanine; C: cysteine; D: aspartic acid; E: glutamic acid; F: phenylalanine; G: glycine; H: histidine; I: isoleucine; K: lysine; L: leucine; M: methionine; N: asparagine; P: proline; Q: glutamine; R: arginine; S: serine; T: threonine; V: valine; W: tryptophane; Y: tyrosine.

2.1.2. Signaling

G Protein Pathway

As evoked above, the AT_1 receptor, once activated by Ang II, adopts the canonical active conformation, allowing its coupling to G proteins (Figure 3).

The activation of phospholipase C (PLC) is subsequent to $G\alpha_q$ protein activation. This activation releases the α_q and β_γ subunits of the $G\alpha_q$ protein. The α_q subunit activates the PLC, leading to the hydrolysis of phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate (PIP_2) into inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG) [37]. The production of IP_3 induces a release of calcium (Ca^{2+}) from the endoplasmic reticulum, and then Ca^{2+} complexes with calmodulin; this then activates myosin light-chain kinase (MLCK). Phosphorylation of myosin light chains (MLC) leads to muscle cell contraction and thus vasoconstriction. Following the elevation in Ca^{2+} induced by the PLC, the phospholipase D (PLD) is activated, causing hydrolysis of phospholipids (mainly phosphatidylcholine) to generate phosphatidic acid, which is itself transformed into DAG [38]. Subsequently, DAG activates PKC, which induces the activation of PLC; thus, this positive feedback allows the continuous maintenance of PLC activity [39]. The $G\alpha_q$ subunit can also stimulate cell growth and proliferation through the activation via phosphorylation of several downstream proteins such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), janus kinases (JAKs), and transcription signal transducer and activator (STAT) proteins [40].

AT_1 receptor stimulation also induces the activation of phospholipase A_2 (PLA_2) via the activation of the $G\alpha_q$ protein. Once activated, PLA_2 allows the release of arachidonic acid from membrane phospholipids [41]. Arachidonic acid is then transformed into

eicosanoids such as prostaglandins or thromboxane [42] by cyclooxygenases or lipooxygenases. Several of these eicosanoids play a role in Ang II-induced contraction, whereas others (PGI2, PGE2) oppose it [42]. The AT_1 receptor may also recruit other G proteins, such as the $G_{12/13}$ protein, involved in the activation of the RhoA/ROCK (Rho-associated protein kinase) signaling. These ROCKs are serine-threonine kinases with targets involved in the regulation of contractility [43,44].

β-Arrestins

After stimulation by Ang II, the AT_1 receptor is phosphorylated on its intracellular C-terminal serine and threonine residues by GPCR kinases (GRKs). This phosphorylation increases the affinity of β-arrestin-1 and β-arrestin-2 equally for the AT_1 receptor. The β-arrestins' recruitment is known to inhibit G protein-induced signaling by interfering with the conformation of the receptor; it is also known to initiate, with the help of clathrins and AP-2 adaptor proteins, the internalization and sequestration of the AT_1 receptor coupled to its ligand, as well as the membrane recycling of the receptors [34,45].

Originally, arrestins were identified as central players in the desensitization and internalization of GPCRs. In addition to modulating GPCR signaling, in 1999, Robert Lefkowitz's team showed that β-arrestins can also initiate a second wave of signaling [46]. Other studies, such as that of Tohgo, have shown that overexpression of β-arrestin-1 or β-arrestin-2 leads to a decrease in inositol-phosphate (IP) production following AT_1 receptor stimulation [47]. In addition to the modulation of GPCR signaling through desensitization and internalization, β-arrestins also act as signaling scaffolds for various signaling pathways.

For example, β-arrestins are able to recruit at the plasma membrane proteins belonging to the Src family (internalization of the receptor is not necessary) [48]. These Src allow the activation of different kinases such as ERKs, leading to a decrease in the production of IP following the stimulation of AT_1 receptor [47].

NADPH

Griendling et al. were the first to demonstrate the implication of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) in oxidative stress mediated by the AT_1 receptor [49]. Using rat aortic VSMCs, they showed that treatment of VSMCs with Ang II for 4–6 h caused a nearly threefold increase in intracellular O_2^- consumption. Ang II stimulates the activity of NAD(P)H oxidase (NOX), and thus generates reactive oxygen species (ROS) [49].

NOX comprises five subunits, and in the absence of stimulation, some of its subunits are cytosolic, while others are membrane-bound [50]. Ang II, via processes involving several players such as c-Src, PLD, PKC, PI3K, and transactivation of EGFR (epidermal growth factor receptor), induces phosphorylation of the p47phox subunit, which causes the formation of a complex between cytosolic subunits, followed by transfer to the membrane, wherein the complex associates with membrane subunits to give the active form of the oxidase [50]. This will lead to the production of reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 or superoxide. These ROS are able to activate transcription factors such as activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor kβ (NF-kβ), which will induce the expression of pro-inflammatory genes [44].

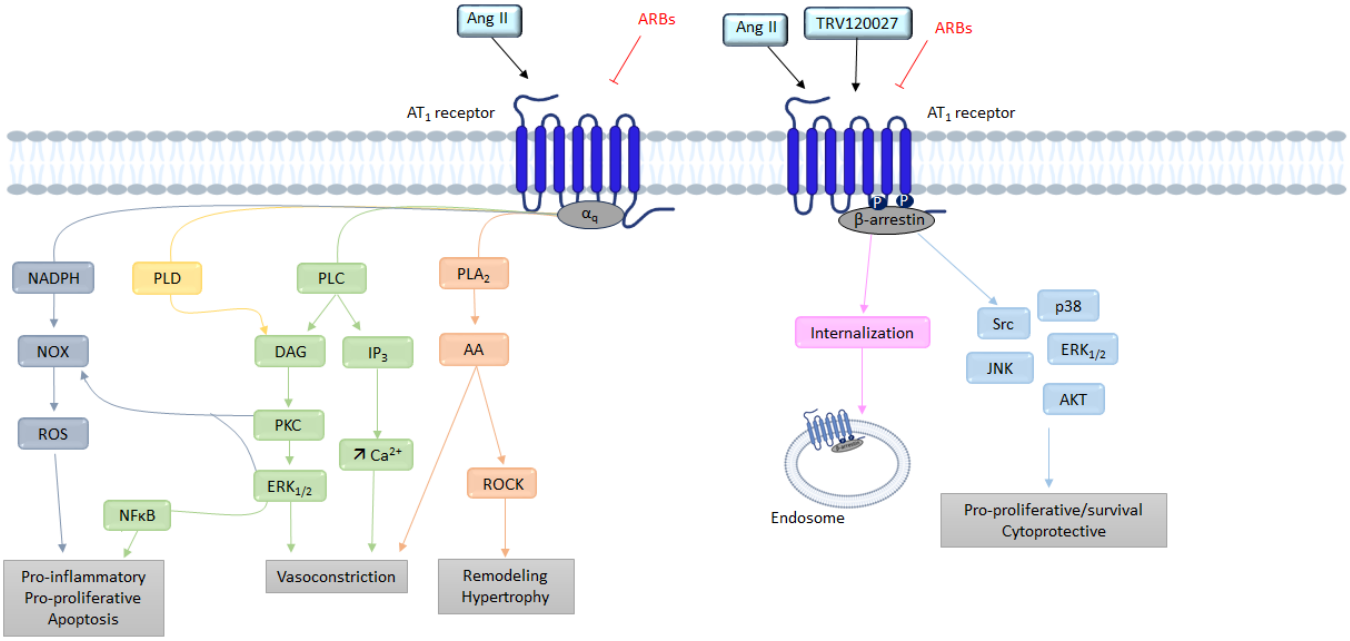


Figure 3. Overview of the different signaling pathways following AT_1 receptor activation. AA: arachidonic acid; Ang II: angiotensin II; ARBs: angiotensin receptor blockers; AT_1: angiotensin II type 1 receptor; AT_2: angiotensin II type 2 receptor; Ca^{2+}: calcium; DAG: diacylglycerol; $ERK_{1/2}$: extracellular signal regulated kinase 1/2 ; IP_3: inositol triphosphate; JNK: c-Jun N-terminal kinase; NFκB: nuclear factor kappa B; NOX: NADPH oxidase; PLA2: phospholipase A2; PLC: phospholipase C; PLD: phospholipase D; PKC: protein kinase; ROCK: Rho-associated protein kinase; ROS: reactive oxygen species; TRV120027: β-arrestin-biased AT_1 agonists.

2.2. AT_2 Receptor

The AT_2 receptor was initially not widely studied because of its low abundance in tissues making its study more difficult. However, it seems to play an important role in the development of the circulatory system, in particular by allowing the differentiation of precursor cells into smooth muscle cells during gestation, thus influencing the structure and function of blood vessels [19]. After birth, AT_2 receptors are restricted to certain tissues such as those of the brain, heart, vascular endothelium, kidney, uterus, and ovary [20]. Besides their decrease in locomotion and exploratory behavior associated with a decrease in spontaneous movements and rearing activity, AT_2 receptor-KO mice suffer from impaired drinking response to water deprivation [51,52]. Moreover, AT_2 receptor expression is upregulated during inflammation, and its stimulation reduces organ damage [53].

2.2.1. Structure

The first crystalline structures of the AT_2 receptor were published in 2017 [54] demonstrating commonalities such as an extracellular loop 2 (ECL2) β-hairpin conformation.

The AT_2 receptor is composed of 363 amino acids and shares 34% homology with the AT_1 receptor. The AT_2 receptor has seven transmembrane domains, an extracellular amino terminus and an intracellular carboxy terminus (Figure 4) [9]. However the AT_2 receptor seems to have unique structural and functional differences, unlike other GPCRs (including AT_1 receptor), the AT_2 receptor is not internalized after stimulation by its endogenous agonist (Ang II) and this stimulation does not lead to the binding of stable GTP analogues [20].

The AT_2 receptor also has a nanomolar affinity for Ang II, similar to that of the AT_1 receptor (Table 1). At the N-terminal part AT_2 receptor has five n-glycosylation sites and 14 cysteine residues [20]. The second intracellular loop consists of a potential PKC phosphorylation site. The cytoplasmic tail contains three consensus PKC phosphorylation

sites but also a phosphorylation site for the cyclic AMP-dependent protein kinase [55]. The third intracellular loop of the receptor is involved in coupling to G_i proteins [56], and thus is responsible for inhibiting AT_1 receptor-dependent IP3 production. This third loop is also essential for the signal transduction of AT_2 receptor via MAPK, and extracellular signal-regulated kinase (ERK) inactivation [55].

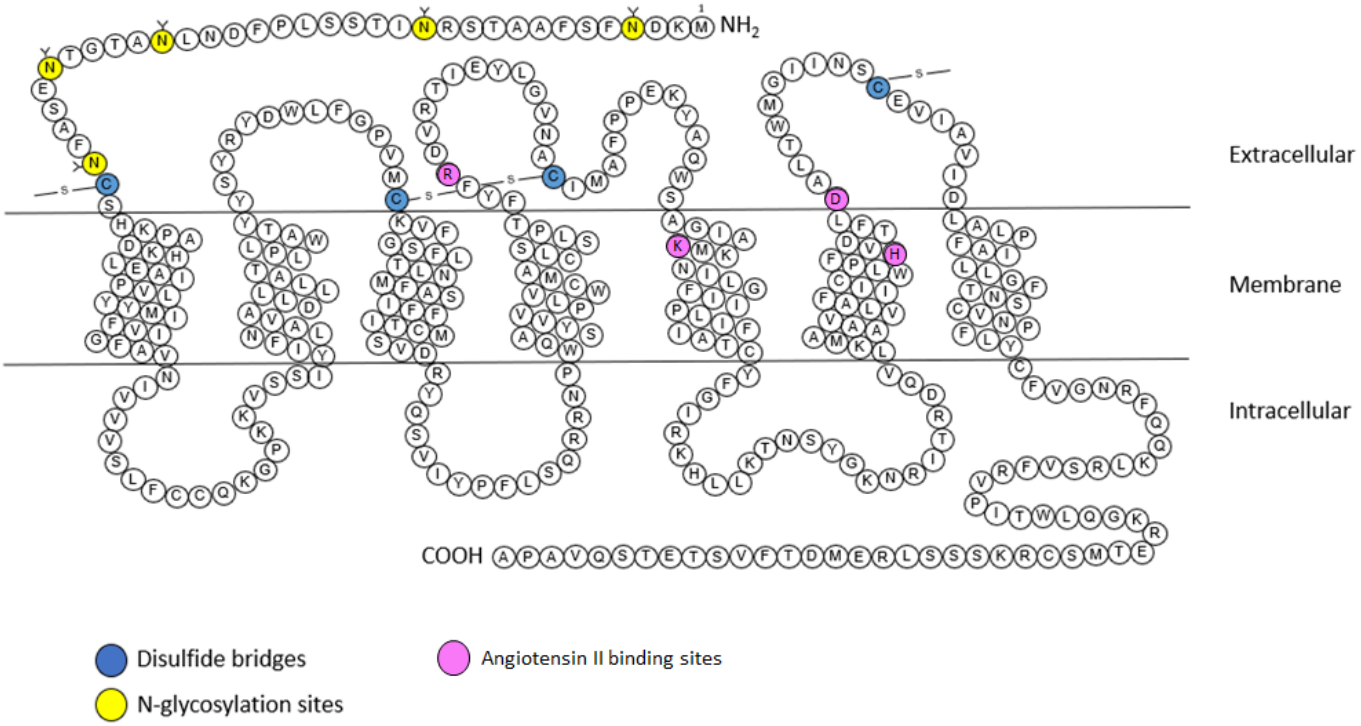


Figure 4. Snake plot of the rat AT_2 receptor (modified from [57–60]). Blue: disulfide bridges; yellow: *N*-glycosylation sites. Purple: Angiotensin II binding sites. A: alanine; C: cysteine; D: aspartic acid; E: glutamic acid; F: phenylalanine; G: glycine; H: histidine; I: isoleucine; K: lysine; L: leucine; M: methionine; N: asparagine; P: proline; Q: glutamine; R: arginine; S: serine; T: threonine; V: valine; W: tryptophane; Y: tyrosine.

2.2.2. Signaling

The effects produced by stimulation of the AT_2 receptor are the result of the activation of intracellular signaling pathways different from those of the AT_1 receptor [61]. It is interesting to note that unlike most other GPCRs, the AT_2 receptor does not associate with β-arrestins [62]. Although the AT_2 receptor-induced signaling pathways are not yet well understood, they involve in particular the NO, the bradykinin (BK), and the activation of several proteins with tyrosine phosphatase activity [63] (Figure 5).

G Protein Pathway

Before being cloned and identified, this receptor was considered independent of any interaction with G proteins [64]. Nevertheless, several biochemical and functional studies have indicated that the AT_2 receptor may recruit G_i [19,56], thereby resulting in activation of the NO-cyclic GMP (cGMP)-protein kinase G_i pathway [65]. Subsequently cGMP activates PKG_i, which dephosphorylates myosin light chains via MLCK, thus preventing calcium from leaving the endoplasmic reticulum.

Moreover, G_i recruitment leads to downstream activation of various phosphatases, such as MAPks, SH2-domain-containing phosphatase 1 (SHP-1), and serine/threonine phosphatase 2A (PP2A), resulting in the opening of delayed rectifier K^+ channels and inhibition of T-type Ca^{2+} channels [40]. The activation of $G_{\beta\gamma}$ subunits by the AT_2 receptor can induce the release of arachidonic acid via the PLA_2. The metabolites produced by

arachidonic acid (prostaglandins or thromboxane) appear to contribute to AT_2 receptor-mediated vasodilation [66].

We have seen previously that AT_1 receptor-mediated vasoconstriction is mediated by the RhoA/ROCK pathway, among others,. Studies by Savoia have shown that the AT_2 receptor decreases the activation of the RhoA/ROCK pathway [67], and that this decrease seems to be associated with an increase in the expression of PKGI, which inactivates RhoA by phosphorylating it [68].

Bradykinin

Siragy et al. has suggested that AT_2 receptor activity is mediated by stimulation of bradykinin (BK) production [69]. This hypothesis was later confirmed by showing that AT_2 receptor inhibits the activity of Na^+/H^+ exchangers, resulting in acidification of the cell environment, which ultimately results in the release of BK [70]. AT_2 receptor-dependent stimulation of BK receptors (B_2 receptor) seems to activate protein kinase A (PKA), which phosphorylates eNOS [71]. Furthermore, the proximity of the two receptors allows heterodimerization of AT_2 receptors and B_2 receptors, increasing the production of cGMP and NO [72]. In addition to these pathways, the AT_2 receptor is capable of inducing NO-independent vasodilation. Indeed, AT_2 receptor is able to induce hyperpolarization of smooth muscle cells by inducing vasodilation mediated by potassium channels [73]. Inhibition of these channels would abolish this vasodilation.

In conclusion, via activation of the AT_2 receptor, Ang II leads to vasodilation, anti-proliferative, and pro-apoptotic effects, meaning the effects of AT_1 receptor activation can be counteracted [74].

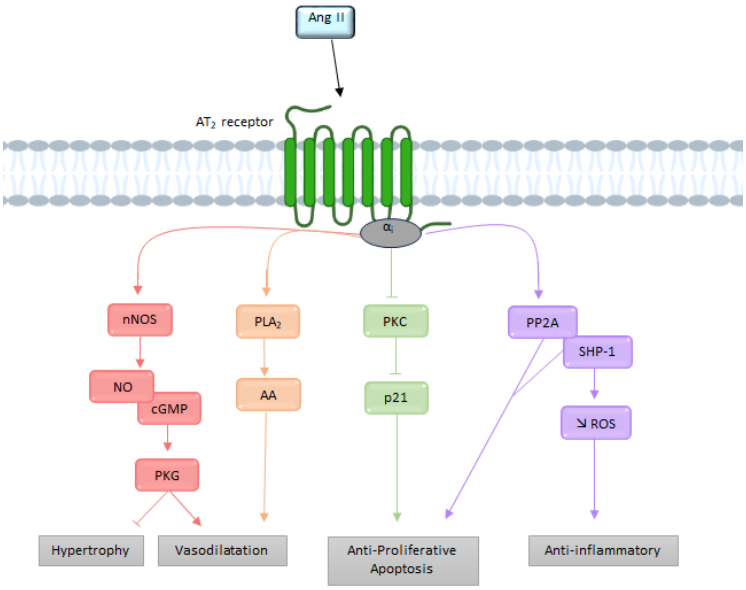


Figure 5. Overview of the different signaling pathways following AT_2 receptor activation. AA: arachidonic acid; Ang II: angiotensin II; AT_2: angiotensin II type 2 receptor; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; NO: nitric oxide; nNOS: neuronal nitric oxide synthase; PLA2: phospholipase A2; PKC: protein kinase; PP2A: serine/threonine phosphatase 2A; ROS: reactive oxygen species; SHP-1: SH2-domain-containing phosphatase 1.

3. The Functional AT_1/AT_2 Receptors Balance

We have seen previously that the RAS is expressed in several tissues. We will now discuss, through four different examples, the physiological and pathophysiological implication of the AT_1/AT_2 functional balance [75]. Several phenomena may interfere with this balance, such as a change in receptors' expression, or an increase of the production of Ang II.

3.1. Systemic Cardiovascular Impact

Most of the known physiological and pathological actions of Ang II are mediated by AT_1 receptors. One of the first systemic effects of the AT_1 receptor to be discovered was the regulation of blood pressure. A decrease in blood pressure will induce a decrease in renal perfusion, leading to a release of renin. The renin will then cleave angiotensinogen (in excess) into Ang I, which will in turn be cleaved into Ang II, which will cause vasoconstriction of the vessels, thereby increasing peripheral resistance with the effect of increasing blood pressure [76]. In addition, Ang II can also increase blood pressure via a decrease in renal excretion of water and sodium [6].

In 1999, Horiuchi and his team showed that AT_2 receptors have opposite effects to those of AT_1 receptors [19]. AT_2 receptors also play an important role in the regulation of renal function, particularly with respect to Na^+ and water excretion, leading to a reduction in blood pressure. However, studies have shown that stimulation of the AT_2 receptors by an agonist does not always lead to a reduction in blood pressure, but that it depends on the model, as shown in this review [77].

In physiological conditions, the AT_1 receptor's effects predominate during Ang II stimulation, due to its higher abundance in tissues.

3.2. AT_1/AT_2 Balance in the Brain and Cerebral Circulation

3.2.1. Cerebral Circulation

The discovery of the presence of cerebral Ang II in 1971 revealed a cerebral RAS in dogs and rats [78]. Subsequently, AT_1 and AT_2 receptors were localized in cerebral blood vessels in rats [51], and then in the human brain [79].

In a rat cranial window model, Vincent et al. showed that Ang II-induced vasoconstriction of cerebral arterioles was abolished when an AT_1 receptor antagonist was used, resulting in vasodilation, which was itself abolished when AT_2 receptor antagonists were used [80]. In physiological conditions, the AT_1 receptor will allow vasoconstriction of cerebral arterioles while the AT_2 receptor has the opposite effect. Moreover, in the same cranial window model, our team showed that the AT_1 receptor was involved in the structural remodeling of cerebral arterioles in hypertensive rats [81]. This remodeling of cerebral arterioles induces a decrease in the internal diameter of vessels that is reversed when AT_1 receptor antagonists are used [82].

The AT_1 and AT_2 receptors and changes in the AT_1/AT_2 equilibrium are particularly important contributors to the regulation of cerebral circulation. Indeed, the vasoconstriction of cerebral arterioles observed during Ang II stimulation is the sum of AT_1 receptor-dependent vasoconstriction and AT_2 receptor-dependent vasodilation in physiological conditions.

Importantly, under pathological conditions with deregulation of the cerebral circulation, such as cerebral ischemia, altered function and expression of RAS components in the cerebral vasculature is observed. During ischemic stroke, increased AT_1 receptor-dependent vasoconstriction of cerebral vessels has been shown in the presence of Ang II, despite decreased AT_1 receptor gene expression [83]. To counteract this, it has been shown that AT_2 receptor gene expression is increased following stroke, but AT_2 receptor protein expression remains unchanged in the middle cerebral arteries, which limits the beneficial impact that AT_2 receptor agonists may have [84].

3.2.2. Cardiovascular Regulation

The two receptors are expressed inside or near the medulla oblongata, the brain region which regulates cardiac rhythm and blood pressure. They are exclusively found in the neurons rather than the glia.

The localization of AT_1 receptors in the brain has been determined primarily by receptor autoradiography [32,85,86]. These studies demonstrated a wide distribution of AT_1 receptors' expression in the brain, including several regions involved in cardiovascular regulation. This distribution of AT_1 receptors in the brain was confirmed by the development of transgenic mice expressing the AT_1 receptor fused with eGFP [87]. High densities of AT_1

receptors are found in the subfornical organ (SFO), the paraventricular nucleus (PVN), the area postrema (AP), the nucleus of the solitary tract (NTS), and the rostral ventrolateral medulla (RVLM) [87]. AT_1 receptors are almost exclusively localized in neurons rather than in microglia, or astrocytes in these cardiovascular control centers [88]. Furthermore, the AT_1 receptor appears to be predominantly expressed on glutamatergic neurons [89].

Similarly, the results obtained with AT_2 receptor-eGFP mice demonstrate the localization of AT_2 receptor-positive cells in or near brain areas that directly influence sympathetic output and blood pressure control. For example, the use of this mouse not only confirmed the presence of AT_2 receptor-containing neurons in the intermediate NTS, but also demonstrated that these neurons are predominantly GABAergic [90]. The AT_2 receptor–eGFP mouse also revealed a high concentration of AT_2 receptor-positive neurons in the AP, as well as AT_2 receptor neuronal fibers in the RVLM and PVN [90]. Furthermore, a number of AT_2 receptor-positive neuronal fibers and terminals in the PVN were found to be derived from the AT_2 receptor-containing GABAergic neurons that surround this nucleus [89].

It has been shown that AT_1 receptors can directly influence the neurons of the cardiovascular centers to induce sympatho-excitation and increase blood pressure, indeed; the mRNA expression levels of the AT_1 receptor in the RVLM and the NTS were higher in hypertensive rats in comparison to normotensive rats [91]. Furthermore, the administration of the AT_1 receptor antagonist losartan into the brain reduces blood pressure in hypertensive rats [91]. The first evidence that stimulation of the brain of AT_2 receptors lowers blood pressure was demonstrated by the fact that AT_1 receptor-mediated pressor responses to Ang II were amplified in the presence of the AT_2 receptor antagonist PD123319 [92]. Furthermore, the stimulation of RVLM AT_2 receptor by a specific agonist (CGP42112A) results in a drop in blood pressure [93].

3.2.3. Neuroinflammation

Inflammation is another example of the dysregulation of the AT_1/AT_2 receptors' balance in the brain. Cells present in the brain such as astrocytes or microglial cells are the main sources of inflammation. In general, the activation of the AT_1 receptor in macrophages leads to the activation of the pro-inflammatory axis of the RAS, while activation of the AT_2 receptor promotes the activation of an anti-inflammatory axis [94,95].

In contrast, in pathological conditions such as inflammation, these receptors (and in particular, AT_1/NOX signaling) are upregulated. NOX-derived superoxides are amplified by the activation of NF-kβ and the RhoA/ROCK pathway, leading to the production of ROS. In addition, through a feedback mechanism, activation of the RhoA/ROCK pathway enables increased expression of the AT_1 receptor via NF-kβ [96]. To compensate for this mechanism, it was shown by Rompe et al. that the AT_2 receptor can induce the dephosphorylation of I-κB (NF-κβ inhibitor), thus allowing it to bind to NF-κβ to prevent its nuclear translocation (and transcription of the AT_1 receptor) [53].

However, it has been shown that although AT_2 receptor expression is generally upregulated, as the AT_1 receptor as a compensatory mechanism, this phenomenon attenuates during aging. For example, in young and healthy brains of rats, and as previously described, there is a balance between the pro-oxidative and pro-inflammatory axis induced by AT_1 receptor, and between the protective axis mediated by the AT_2 receptor [97]. Aging causes an overactivation of the pro-inflammatory axis of the RAS, while the protective axis is unchanged. Indeed, a significant increase in NOX activity and levels of the pro-inflammatory cytokines was observed in aged rats, which revealed a pro-oxidative and pro-inflammatory state in the aged substantia nigra [97]. Moreover, aged rats also showed upregulation of AT_1 receptor expression, which was inhibited by administration of candesartan (an AT_1 receptor blocker), and downregulation of AT_2 receptor expression [98].

Through these examples, we have seen different mechanisms of deregulation of the AT_1/AT_2 balance in the brain. Although the upregulation of the two receptors can partly explain this deregulation, it is certainly not the only element involved in the appearance of pathologies, as we will see in the following example.

3.3. Cellular Cycle

The proliferation of normal cells is regulated by kinases called cyclin-dependent kinases (CDKs). The main actors in this cell cycle are cyclins, which regulate CDKs, enabling cells to progress through the cell cycle [99]. We have seen previously that AT_1 receptors promote cell proliferation pathways, in particular via the MAPK pathway, which allows the expression of cyclin and CDKs, itself allowing the advancement of cells in the cell cycle (Figure 6) [100]. Diep et al. studied the expression of cell cycle proteins in Ang II-infused rats. A significant increase in ^{3}H-thymidine incorporation in the mesenteric arteries was observed, reflecting the entry of cells into DNA replication phase (S phase). Furthermore, this incorporation was associated with high expression of cyclin D_1 and CDK4 [101]. The use of losartan in these animals completely abolished ^{3}H-thymidine incorporation and restored the expression level of cyclin D_1 and CDK4.

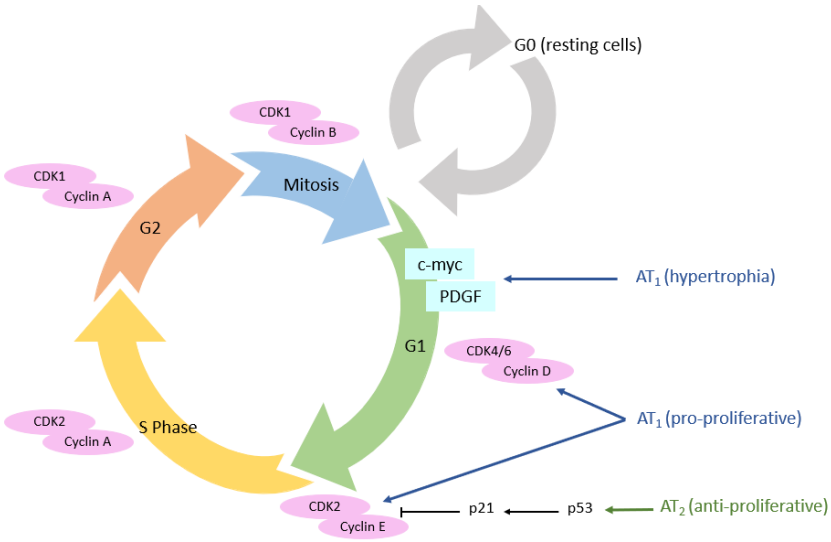


Figure 6. AT_1 and AT_2 receptors' expression and their impact on cell cycle. AT_1 receptor: angiotensin II type 1 receptor; AT_2 receptor: angiotensin II type 2 receptor; CDK: cyclin-dependent kinases.

Conversely, AT_2 receptors are involved in the activation of anti-proliferative pathways [102]. In human aortic endothelial cells and after stimulation with C21 (an AT_2 receptor agonist), an activation of p53 protein was observed [103]. This protein is a key tumor suppressor which can lead either to a transient arrest of cell proliferation (to repair DNA damages, for example) or to an irreversible arrest of cell proliferation called senescence, leading to cell death [104]. When p53 is not activated, histone deacetylase-1 (HDAC1) deacetylates p53, resulting in its degradation; in contrast, HDAC1 inhibitors (such as the vorinostat) sensitize cells to apoptosis by increasing p53 acetylation. This AT_2 receptor-coupled HDAC1/p53 signaling pathway appears to have a role in physiological apoptosis and cell turnover involving p53 [103].

The AT_1 receptor directly induces cell hypertrophy, notably through the MAPk pathway, but also through the β-catenin pathway [105,106]. Cyclin D_1 will enable the transition from the G_0 to the G_1 phase of the cell cycle. The next expected step for cells in G_1, is the S phase, leading to cell proliferation. However, Geisterfer et al. reported that Ang II induces hypertrophy, but not proliferation, in confluently cultured rat aortic smooth muscle cells [107]. Subsequently, several studies revealed that Ang II stimulates the expression of immediate early genes exclusively expressed in the G_1 phase (c-myc and PDGF (platelet-derived growth factor)) [108]. Thus, these genes, once expressed after Ang II stimulation, will allow the return of resting cells to the G_1 phase, and not necessarily progression to S phase, which consists of G_1 phase arrest and hypertrophy [109].

In esophageal adenocarcinomal cells (EACs), Fujihara et al. showed that telmisartan induces antitumoral effects in EAC, both in vitro and in vivo. Following inhibition of

the AT_1 receptor by telmisartan, cell cycle arrest in the G_0/G_1 phase is induced via the Akt/mTOR pathway in EAC cells [110]. Similar results were obtained in breast cancer and cholangiocarcinoma cells [111]. Moreover, this stop in the cell cycle was accompanied by a high decrease in cell cycle-related proteins, such as cyclin E, cyclin D_1, and their catalytic sub-units, Cdk4 and Cdk6. These experiments show that increased cell proliferation in cancer is at least partially related to actions mediated by the AT_1 receptor. In contrast, overexpression of AT_2 receptors in SMMC7721 cells was shown to reduce S-phase cells and increase G_1-phase cells via suppression of CDK4 and cyclin D_1 expression, thereby reducing proliferation [112].

Many studies have reported that an increase in the presence of AT_1 and AT_2 receptors is found in different types of cancer, and is directly linked to a worse prognosis in terms of tumor aggressiveness [113–115]. The overexpression of the AT_1 receptor has been demonstrated in several in vitro models, such as mammary carcinoma cells in culture, pancreatic adenocarcinoma cells, and hepatocarcinoma cells, but also in vivo in various tumors including estrogen receptor positive breast cancers, glioblastoma, and ovarian cancers [116,117]. Despite its anti-proliferative effect, the AT_2 receptor has also been shown to be overexpressed by several cancers such as astrocytomas [113] and lung tumors [118] in vivo. In an astrocytoma model, it was shown that out of 133 tumors, 10% of low-grade tumors were positive for the AT_1 receptor, versus 67% for high-grade tumors; 17% of low-grade tumors were positive for the AT_2 receptor, versus 53% for high-grade tumors [113].

It has been shown in several models of cancer cells overexpressing the AT_2 receptor that this overexpression promotes apoptosis of these cells [112,119,120]. In addition, the effects of C21 were studied in prostate cancer (using human LNCaP prostate cancer cells and prostate adenocarcinoma transgenic rats) and leiomyosarcoma cells. In both studies, the authors were able to find antiproliferative and pro-apoptotic effects of the AT_2 receptor [121,122].

3.4. Wound Healing

Several studies reported dynamic changes in angiotensin receptor expression during the different phases of wound healing [123,124].

The expression of AT_1 and AT_2 receptors in the skin of young rats was first shown in 1992 by Viswanathan and Saavedra [125]. AT_1 and AT_2 receptors are expressed in human fibroblasts, keratinocytes, and vascular endothelial cells. Both AT_1 and AT_2 receptors are found in myofibroblasts and keratinocytes in rodents [126]. RAS components are present in the epidermal and dermal layers, but also in subcutaneous fat tissues, in microvessels, and in appendages such as hair follicles [126,127]. However, expression of RAS components in skin has also been demonstrated at the protein level, with results confirmed at the mRNA level [128].

Regarding the functional role of the RAS in skin physiology, a recent study by Jiang et al. reported that Ang II promotes differentiation of keratinocytes from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMdSC) under physiological conditions [129]. Moreover, Ang II has been shown to increase vascular permeability to recruit inflammatory cells and to induce angiogenesis [130]; the AT_1 receptor promotes migration, while the AT_2 receptor inhibits it.

During wound healing, an organism will regulate the expression levels of AT_1 and AT_2 receptors, enabling a response to Ang II that is adapted to the situation. Immediately after wounding, an increase in both AT_1 and AT_2 receptor expression is observed, which seems slightly delayed and weaker for AT_2 receptors [131]. In cultured keratinocytes, this regulation is detectable at the mRNA level 1 h after wounding, but the protein expression of AT_1 receptor peaks at 3 h, and that of AT_2 receptor peaks at 12 h after wounding [126]. This specific early increase in AT_1 receptors could play a role in promoting blood clotting, initiating the inflammatory phase and inducing re-epithelialization by stimulating keratinocyte proliferation and migration [132,133].

In vivo, the wound healing process leads to an increase in receptor expression; this is higher for the AT_1 receptor than for the AT_2 receptor during the early phases of wound closure. Subsequently, there is a decrease in the expression of both receptors during the inflammation process, followed by an increase during re-epithelization.

Finally, during the last phase (remodeling), an increase in AT_1 and AT_2 receptors has been demonstrated, but this time with a dominance of the AT_2 receptor over the AT_1 receptor (Figure 7) [123,133].

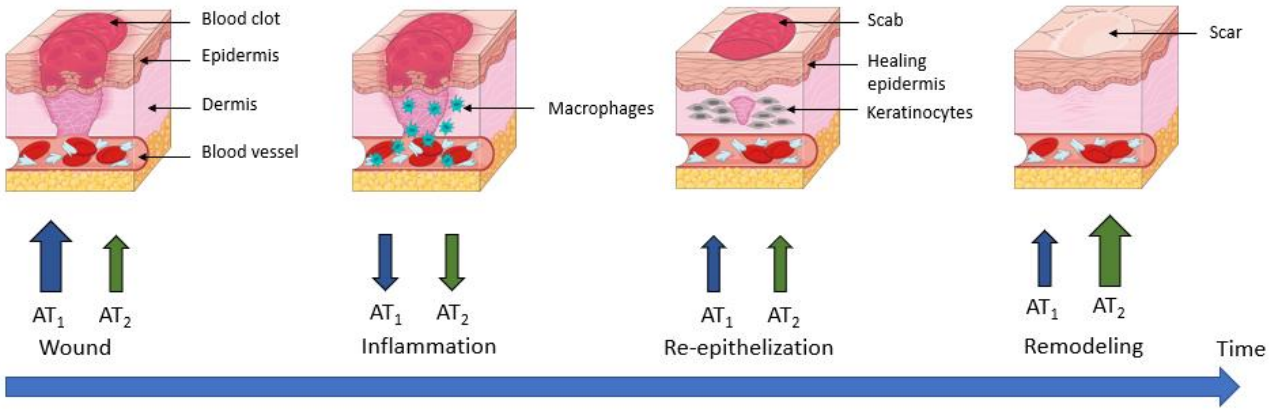


Figure 7. AT_1 and AT_2 receptors' expression during wound healing. AT_1 receptor: angiotensin II type 1 receptor; AT_2 receptor: angiotensin II type 2 receptor.

This is consistent with what is known about both receptors, since in the early phases of wound healing and re-epithelization, a pro-proliferative action of AT_1 receptors is required to allow wound closure. Therefore, it has been shown that in mice KO for AT_1 receptors and rats treated with an AT_1 receptor antagonist, wound closure was delayed [134,135]. In contrast, in AT_2 receptor KO mice, re-epithelization was accelerated. These results support that during the wound healing process, the antiproliferative effect of AT_2 receptors is complementary to the pro-proliferative effects of AT_1 receptors under physiological conditions.

During the remodeling phase of wound healing, AT_2 receptor expression is stronger than AT_1 receptor expression. The antifibrotic properties seem essential for the formation of a resistant scar tissue. Indeed, in AT_2 receptor-KO mice, the skin breaks under lower tension than in wild-type mice [135]. This increased expression of the two receptors contributes to the localized Ang II action in the wounded area rather than in the unaffected skin. Thus, the changes in the AT_1/AT_2 receptor ratio observed in tissue repair may cause a switch in the dominating subtype, and consequently a change in the response to Ang II [136].

The formation of hypertrophic scars or keloids is a recurrent problem resulting from an insufficient control of proliferative and fibrotic processes in wound healing [137]. Indeed, it has been shown that it is the overactivated cutaneous RAS that is involved in this process via the AT_1 receptor [20,138]. Indeed, these receptors, once stimulated by Ang II, are known to act in a pro-fibrotic manner. Studies have also shown that the level of Ang II and AT_1 receptor expression were increased in hypertrophic scars and keloids in both rodents and humans. As a result, several experiments were conducted to inhibit the profibrotic effect of AT_1 receptor by using ARBs to prevent or treat hypertrophic scars and keloids in preclinical models. All these studies, regardless of the species, resulted in a reduction in scar size [139,140].

As evoked above, AT_1 and AT_2 receptors have the same affinity for Ang II, but induce opposite physiological responses. Thus, the physiological response to Ang II production will reflect the functional balance between these two receptors. In the next section, we will discuss the different mechanisms that may contribute to the fine tuning of this functional AT_1/AT_2 receptor balance.

4. Mechanisms Regulating the AT_1/AT_2 Functional Balance

4.1. Functional Opposition vs. Expression Level

The response to Ang II results from the balance between the effects of each of these receptors. As we have seen previously, the effects of the AT_1 receptor predominate because it is the most abundant.

This functional balance was confirmed in vivo using knockout mice for either the AT_1 receptor or AT_2 receptor. In AT_{1A} receptor KO mice, there was an absence of hypertensive response following Ang II injection, which is normally observed in wild-type mice. In addition, systemic blood pressure was markedly decreased in these mice [141]. In the same AT_{1A} receptor KO mice and after treatment with an AT_1 receptor antagonist, a decrease in blood pressure was observed in mice pretreated with ACE, thus showing that AT_{1B} receptors also seem to play a role in the regulation of blood pressure. In contrast, in AT_2 receptor KO mice, vasoconstriction to Ang II is more important than in wild-type mice [142]. Thus, in cerebral arteries, the effects observed are the sum of constrictor effects mediated by the AT_1 receptor and dilator effects mediated by the AT_2 receptor.

Furthermore, as we have seen in Section 3.4, during the wound healing phenomenon, there is a modification of the expression of the receptors according to the phase of the process: a stronger expression of the AT_1 receptor at the time of re-epithelization, and a stronger expression of the AT_2 receptor at the time of the remodeling phase.

The expression level of the receptors is also related to the mechanisms that regulate them. At the AT_1 receptor level, overexpression of ATRAP (AT_1 receptor-associated protein) inhibits AT_1 receptor-dependent PLC activation [143], inositol phosphate production, and cell proliferation [144], indicating that ATRAP acts as a negative regulator of AT_1 receptor signaling [145]. In addition, overexpression of ATRAP decreases membrane expression of the AT_1 receptor due to its increased internalization [146]. In contrast, expression of ARAP-1 (ankyrin repeat and pleckstrin homology domain-containing protein 1) restores receptor membrane expression [147]. Moreover, at the renal level, overexpression of ARAP1 in mice causes hypertension and renal hypertrophy, effects that are suppressed by an ARB, suggesting that ARAP1 potentiates AT_1 receptor signaling [148].

The AT_2 receptor interacts with ATIP (AT_2 receptor interaction protein) [149]. Decreased expression of this protein results in retention of the AT_2 receptor in cellular compartments, reducing their expression on the cell surface, and reducing AT_2 receptor-related effects. Expression of the AT_2 receptor at the membrane induces an increase in ATIP expression, creating a positive feedback loop [149]. PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1) plays an important role in the regulation of AT_2 receptor expression. Indeed, in addition to repressing the transcription of the gene coding for the AT_2 receptor, it activates the transcription of the ATIP gene [150]. The AT_2 receptor also interacts with another protein: the transcription factor PLZF (promyelocytic zinc finger protein). Once bound to the AT_2 receptor, PLZF will cause its internalization, thus decreasing its membrane expression; then, PLZF will migrate to the nucleus, allowing the transcription of PI3K [151], which is involved in the activation of eNOS (endothelial nitric oxide synthase).

Although the level of expression may partly explain the predominance of the effects of one receptor over the other, it turns out that in some cases, this is more complex. For example, we have seen that after stroke, there is an increase in AT_1 receptor-dependent vasoconstriction, despite a decrease in AT_1 receptor gene expression [83]. Furthermore, Foulquier et al. showed that high salt intake for 4 days was associated with abolition of AT_2 receptor-mediated vasodilation because of decreased aldosterone levels, but also with decreased cerebrovascular AT_2 receptor protein levels without mRNA changes [152]. If this high salt intake is maintained for 30 days, in addition to the abolition of AT_2 receptor-mediated vasodilation, we observe AT_2 receptor-mediated vasoconstriction, although neither the mRNA nor protein levels of the AT_2 receptor are altered by high salt intake.

4.2. Direct AT_1/AT_2 Receptors Interactions

GPCRs have the ability to form homodimers and heterodimers that can change receptor properties. In this section, we will discuss the implication of these homodimers and heterodimers on AT_1 and AT_2 receptor signaling (Figure 8).

4.2.1. AT_1 Receptor Dimerization

Abdallah et al. showed that increased levels of AT_1 receptor homodimers were present on monocytes from patients with hypertension, which is an atherogenic risk factor, and that they were related to increased Ang II-dependent monocyte activity and adhesiveness [153]. This increase leads to the formation of atherosclerotic lesions. In this study, in addition to showing that inhibition of Ang II release prevents the formation of AT_1 receptor homodimers, they observed that dimerized receptors increase $G_{q/11}$-mediated inositol phosphate signaling [153]. In addition, the constitutive formation of homodimers of the AT_1 receptor are formed during biosynthesis, as the receptors are trafficked through the endoplasmic reticulum. Furthermore, the constitutive nature of receptor dimerization was not affected by treatment with agonists or antagonists [154]. These data show that AT_1 receptor homodimerization can enhance Ang II-mediated signaling, which may have a pathological effect (e.g., arthrosclerosis), but that these homodimers are not affected by receptor agonists and antagonists.

The AT_1 receptor and B_2 receptor can form a heterodimeric complex. This heterodimerization between the AT_1 receptor and B_2 receptor in HEK-293 cells increased the efficacy and potency of Ang II, but decreased the potency and the efficacy of BK. To confirm this, the authors compared the Ang II- or BK-stimulated increase in inositol phosphates in HEK-293 cells expressing the indicated receptors. Furthermore, AT_1/B_2 heteromerization is also involved in the increase in Ang II hypersensitivity in preeclampsia [155]. Preeclampsia is a pregnancy complication characterized by high blood pressure, and it may cause serious complications for the mother and fetus [156]. The presence of AT_1/B_2 heterodimers has been reported in human placental biopsies from pregnancies with preeclampsia [157].

In 2005, Kostenis et al. showed that the AT_1 receptor could form a heterodimer with the MasR [158]. In their study, they transfected the human forms of Mas and AT_1 receptors, individually and in combination, into CHO-K1 cells, and then assessed intracellular Ca^{2+} mobilization after stimulation with different doses of Ang II. The MasR alone did not respond to Ang II stimulation, while cells expressing the AT_1 receptor increased their intracellular Ca^{2+} level. Upon coexpression of MasR with the AT_1 receptor, a reduction in the potency and maximal efficiency of Ang II in increasing Ca^{2+} mobilization was observed. In the same model, increasing concentrations of losartan induced significant rightward shifts in Ang II concentration–response curves in cells expressing both the AT_1 receptor alone and the AT_1/MasR heterodimer. In contrast, the Ang II-induced elevation of intracellular Ca^{2+} and its decrease in the presence of MasR were not affected by the presence of Ang-(1-7). Furthermore, in vivo data corroborate the results obtained in cell lines, as MasR-KO animals demonstrated a significant increase in the vasoactive properties of Ang II [158].

4.2.2. AT_2 Receptor Dimerization

AT_2 receptor homodimerization was first described by Miura et al. in PC12W cells and CHO cells transfected with AT_2R [159]. They also showed that these AT_2 receptor homodimers allow constitutive signaling that leads to apoptosis. Furthermore, dimerization and pro-apoptotic signaling were not altered following AT_2 receptor stimulation, suggesting that this homodimerization is ligand-independent, which has also been reported in transfected HEK-293 cells [160]. Zha et al. showed in NRK-52E rat kidney epithelial cells that AT_2 receptor homodimerization is observed under high-glucose conditions, which may be a direct effect of receptor dimerization susceptibility or an indirect effect due to increased AT_2 receptor expression under high-glucose conditions [161].

Like AT_1 receptors, AT_2 receptors can form heterodimers with B_2 receptors. We have already seen that AT_2 receptors mediate a vasodilatory cascade that includes BK, NO, and cGMP. Using a KO mouse model for B_2R, they showed that when AT_2 and B_2 receptors are simultaneously activated in vivo, NO and cGMP production increases [162]. In a PC12W cell model, heterodimerization of these receptors was shown without any stimulation, suggesting the presence of constitutive heterodimers [72]. Furthermore, the use of an AT_2 receptor agonist (CGP42112A) combined with a B_2 receptor agonist (BK) or antagonist (icatibant) allows for an increase in receptor expression alone, but also for the formation of heterodimers [72]. Thus, the maximal increase in cGMP and NO production is observed when AT_2 receptor is stimulated and the B_2 receptor is blocked; this result is in agreement with another study showing that B_2 receptor blockade increases the effect of AT_2 receptors on cGMP and NO production [163]. Since the rate of heterodimer formation depends on the expression level of AT_2 and B_2 receptors, controlling the expression level of these receptors would influence the formation of dimers, thus increasing (or not) the AT_2 receptors' effects.

The AT_2 receptors is also able to form a heterodimeric complex with MasR [164]. This dimerization influences the RAS-protective Ang II/AT_2 axis, resulting in increased NO production and promoting diuretic–natriuretic response in obese Zucker rats [164]. Several studies suggest that these receptors may be functionally interdependent; indeed, the AT_2 receptor antagonist (PD123319) reduced the vasodepressor effects of the MasR agonist Ang-(1-7) [165]. Similarly, Ang-(1-7) mediated endothelium-dependent vasodilation in the cerebral arteries [166] and aortic rings of salt-fed animals [167] was inhibited by PD123319 as well as the MasR antagonist (A-779). In mouse astrocytes isolated from AT_2 receptor KO, MasR was not responsive to Ang-(1–7), and in astrocytes isolated from MasR KO, AT_2 receptors were not responsive to C21, suggesting that in murine astrocytes in primary culture, AT_2 and MasR are functionally dependent on each other [168]. In contrast, another study showed that the vasoconstriction effect induced by Ang II was slightly increased, and the vasodilation induced by the AT_2 receptor agonist CGP42112A was not altered in mice KO for MasR [169].

Furthermore, using bioluminescence resonance energy transfer (BRET), the AT_2 receptor was found to form a heterodimer with the relaxin family peptide receptor 1 (RXFP1). Relaxin, by binding to RXFP1, is known to be antifibrotic by interfering with transforming growth factor β1 (TGF-β1). Ang II is also known to in-hibit TGF-β1 via the AT_2 receptor. Chow et al. investigated the potential interactions of relaxin with the AT_2 receptor. The antifibrotic action of relaxin in primary rat kidney myofibroblasts was reduced when combined with an AT_2 receptor antagonist (PD123319). This heterodimerization results in the activation of the NO-cGMP-dependent pathway. Although relaxin does not interact directly with the AT_2 receptor, AT_2/RXFP1 heterodimerization results in the activation of the NO-cGMP-dependent pathway, leading to the disruption of TGF-β1 signaling and thus the latter's pro-fibrotic effect.

Last but not least, AT_2/AT_1 heterodimerization was first described by AbdAlla et al. in PC-12 cells, rat fetal fibroblasts, and human myometrial tissue samples [170]. They showed that AT_2/AT_1 dimerization was constitutive and led to inhibition of the AT_1 receptor-mediated G protein pathway. This inhibition of AT_1 receptor signaling does not require AT_2 receptor activation, as shown by the fact that AT_2/AT_1 heterodimerization is not affected by AT_2 receptor antagonists such as PD123319, and by the persistence of the effect in cells with dimers containing an AT_2 receptor mutant that is unable to bind agonists or to initiate AT_2 signaling. The authors concluded that the AT_2 receptor acts as a kind of reverse agonist of the AT_1 receptor by constitutively preventing the conformational changes necessary to initiate AT_1 receptor signaling [170].

Attenuation of AT_1 receptor signaling by the AT_2 receptor (via calcium signaling, ERK1/2 MAPK activation) as well as constitutive AT_2/AT_1 dimerization has been confirmed in studies by other groups in HeLa cells [171] or HEK-293 transfected with AT_2/AT_1 [172]. AT_2/AT_1 dimerization also appears to impact AT_2 intracellular trafficking, as AT_2/AT_1 dimers internalize upon Ang II stimulation (whereas AT_2 alone is unable to do so) [171].

More recently, a study demonstrated that AT_1 and AT_2 receptors form heterodimers that are expressed in the cells of the central nervous system (striatal neurons and microglia). These dimers are new functional units with specific signaling properties, because on the one hand, coactivation of the two receptors reduces Ang II signaling, and on the other hand, they exhibit cross-potentiation: i.e., candesartan (AT_1 receptor antagonist), increases the effect of AT_2 receptor agonists [172].

In a model of Parkinson's disease (6-OH-dopamine hemi-lesioned rat), the authors wanted to quantify the quantity of AT_2/AT_1 dimers in striatal sections of naïve and 6-OH-dopamine hemi-lesioned rats, treated or not with L-DOPA and divided into two groups: those that are dyskinetic and those that are resistant to L-DOPA-induced dyskinesia. First, they demonstrated that the quantity of AT_2/AT_1 dimers found in the non-lesioned striatum was negligible compared to the lesioned striatum. Furthermore, dyskinetic animals on L-DOPA showed an approximately 2-fold increase in AT_2/AT_1 dimers (compared to the lesioned rat hemisphere), and dyskinesia-resistant animals showed an approximately 10-fold increase (compared to the non-lesioned control hemisphere) [172]. In this context of Parkinson's disease, the use of AT_1 receptor antagonists coupled to AT_2 receptor agonists could potentiate the neuroprotective effects via the AT_2 receptor.

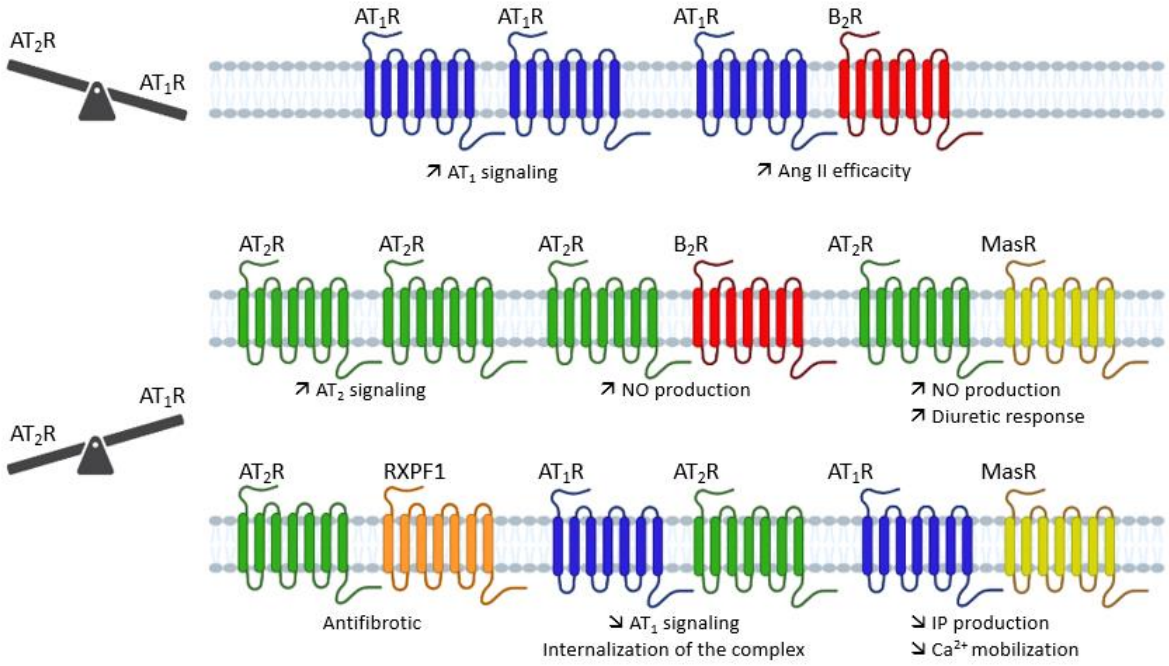


Figure 8. Overview of the different dimerizations of AT_1 and AT_2 receptors and their functional impact. Ang II: angiotensin II; AT_1R: angiotensin type 1 receptor; AT_2R: angiotensin type 2 receptor; B_2R: bradikynin receptor B2; Ca^{2+}: calcium; IP: inositol phosphate; MasR: Mas receptor; NO: nitric oxide; RXPF1: relaxin family peptide receptor 1.

In conclusion, the different dimerizations of AT_1 or AT_2 receptors, depending on the tissue and the co-expressed receptor (AT_1, AT_2, B_2R, MasR), cause a functional change in the activity of the receptors, modifying the AT_1/AT_2 balance without changing the expression of these receptors.

4.3. Post-Translational Modifications

Post-translational modifications are also mechanisms to modulate GPCR functions, AT_1 and AT_2 receptors being no exception.

4.3.1. *N*-Glycosylation

AT_1 receptor function is regulated by various post-translational modifications such as *N*-glycosylation [173]. To study the effects of *N*-glycosylation on extracellular loops (ECL), artificial *N*-glycosylation sequences were incorporated into ECL1, ECL2 and ECL3 [174]. In ECL1, *N*-glycosylation causes a very significant decrease in the ligand affinity and surface expression of the receptor; in ECL2, it leads to the synthesis of a misfolded receptor, and in ECL3 *N*-glycosylation produces mutant receptors with normal affinity and low surface expression. These results show that *N*-glycosylation sites alter many properties of the AT_1 receptor, such as targeting, folding, affinity, and surface expression [174].

Like the AT_1 receptor, the AT_2 receptor contains multiple glycosylation sites. The variability in AT_2 receptor molecular weight has been shown to be due to different degrees of *N*-glycosylation [175]. However, this glycosylation does not appear to be involved in AT_2 receptor binding and membrane addressing [176]. On the other hand, glycosylation of AT_2 receptor could nevertheless play a role in the stability of the receptor and its coupling with its intracellular effectors [176].

4.3.2. Phosphorylation

Phosphorylation is another post-translational modification that can occur on the AT_1 receptor [177]. Phosphorylation of AT_1 receptor serine/threonine residues is required for β-arrestin recruitment and receptor internalization [178]. In contrast, in the kidneys and arteries, GRK4 has been shown to exacerbate urinary sodium retention and vasoconstriction by increasing AT_1 receptor expression [179].

The AT_2 receptor is rapidly phosphorylated on a serine by PKC after activation by Ang II. The functional role of AT_2 receptor phosphorylation is not known. When triggered by AT_1 receptor activation, it appears to modulate the AT_2 receptor's effects, as opposed to AT_1's effects [180].

A more recent study showed that GRK4, by increasing AT_2 receptor phosphorylation, impairs AT_2 receptor-mediated diuresis and natriuresis without decreasing mRNA or protein levels [181]

4.3.3. *S*-Nitrosation

S-nitrosation is a mode of post-translational modification that allows the addition of a NO group to the sulfur atom of specific cysteine residues.

The AT_1 receptor contains ten cysteine residues. Four of these cysteines are involved in disulfide bridges at the extracellular loops, one is located on the cytoplasmic tail, and the other five are distributed in the transmembrane domains of the receptor (see Section 2.1.1). The affinity of the AT_1 receptor for Ang II is decreased in the presence of sodium nitroprusside (SNP), an NO donor. An assessment of the affinity of different mutated AT_1 receptors for each of five cysteines revealed the cysteine involved in sensitivity to sodium nitroprusside, cysteine residue 289 [182].

The AT_2 receptor has 14 cysteine residues. We have seen that the four cysteines in the extracellular loops are engaged in disulfide bridges. The remaining ten cysteines are distributed on the transmembrane domains and the cytoplasmic tail.

In 2015, Jang showed that the AT_1 receptor, AT_2 receptor, and ROS appear to be involved in increasing nNOS (neuronal nitric oxide synthase) activity [183]. After stimulation with Ang II, membrane expression of the AT_1 receptor decreases, while that of the AT_2 receptor increases. In addition, losartan and L-NAME (eNOS inhibitor) inhibit translocation to the membrane of AT_2 receptor, suggesting that AT_2 receptor translocation may be NO-dependent. The SNP allows for the *S*-nitrosation of the AT_2 receptor, as it does for the AT_1 receptor. In addition, a mutation in cysteine 349 induces increased surface expression of the AT_2 receptor, suggesting that it plays a role in the translocation of the receptor to the membrane [183].

5. Possible Ways to Tune the AT_1/AT_2 Functional Balance

5.1. Pushing the Balance Using Agonist/Antagonist Ligands

One of the most obvious means to act on the AT_1/AT_2 functional balance is to use agonists or antagonists towards one or the other receptor.

In order to rebalance the AT_1/AT_2 balance, the use of specific molecules targeting our receptors seems to be an interesting avenue. Indeed, this would make it possible to block or activate one specific receptor, which cannot be achieved with ACE inhibitors, for example, as they prevent both receptors' activation by inhibiting Ang I cleavage.

AT_1 receptor antagonists were the first molecules discovered in this sense (Table 1). In the case of pathologies associated with AT_1 receptor, the ideal is to be able to abolish the overexpression of the receptor responsible for the imbalance in order to orient it in favor of the AT_2 receptor. AT_1 receptor antagonists are widely used to treat hypertension as well as cardiac diseases (heart failure or myocardial infarction). In vitro and in vivo, losartan is a reversible competitive AT_1 receptor antagonist that inhibits the Ang II-induced vasoconstriction of blood [184]. However, complete blockade of the receptor then amounts to promoting activation of the AT_2 receptor, which will tip the balance in the other direction instead of bringing it back to equilibrium.

Another method would be to act on the AT_2 receptor itself by using an agonist of the latter. For this, molecules capable of specifically activating the receptor have been developed, such as CGP42112A, which is a peptide, or C21, which is a synthetic compound. A study on the effects of CGP42112A in the same SHR model was performed, and the authors tested CGP42112A in the presence or absence of candesartan. The results showed that the use of candesartan alone at a high concentration lowered blood pressure in SHR rats, and that CGP42112A only provided a depressant effect in the presence of candesartan [185]. Another study on CGP42112A showed that intravenous infusion of the molecule increased NO production in pigs [186]. Wan et al. showed that the use of C21 in hypertensive rats reduced blood pressure [187]; however Foulquier et al. showed that this reduction in blood pressure was dependent on the experimental model used [77].

These studies show that the use of an AT_2 receptor agonist alone would not be sufficient to regulate the balance given the predominance of the AT_1 receptor in the pathological context. However, it would appear that combining the effects of an AT_1 receptor antagonist and an AT_2 receptor agonist would be more effective in certain pathologies such as hypertension [188,189].

We have seen that the AT_2 receptor has a rather protective role in case of pathology, but a study has shown that the use of PD123319 can reduce the inflammatory response and oxidative stress in rats with induced colitis [190]. In this same study and another one, it was demonstrated that PD123319 may have partial agonistic properties in relation to the AT_2 receptor, thus biasing the interpretation of functional data [190,191]. Another study conducted by our group showed that in an SHR model, the combination of the effects of an ARB with an ACE inhibitor induced an exacerbated decrease in middle cerebral artery contraction in SHR [192]. In this specific case, by blocking the AT_1 receptor, the AT_2 receptor will become dominant, thereby reversing the balance. This phenomenon has been described by Budzyn et al. [193].

Table 1. Angiotensin receptor ligands.

Agonists			
Compounds	AT_1 affinity	AT_2 affinity	References
Ang II	pIC_{50} = 8.1	pIC_{50} = 9.2	[194]
Ang III	pIC_{50} = 7.6	pIC_{50} = 9.2	[194]
Ang IV	N.A.	pIC_{50} = 7.3	[194]
Ang-(1-7)	pKi = 6.66	pIC_{50} = 6.6	[194,195]
SII	pKd = 6.5	N.A.	[196]
TRV120023	pEC_{50} = 7.4	N.A.	[197]
TRV120026	pEC_{50} = 7.6	N.A.	[197]
TRV120027	pEC_{50} = 7.7	Ki = 7 nM	[197]
CGP42112A	N.A.	pIC_{50} = 9.6	[194]
C21	N.A.	pIC_{50} = 8.6	[194]
Antagonists			
Compounds	AT_1 affinity	AT_2 affinity	References
Losartan	pIC_{50} = 7.4–8.7	N.A.	[198]
Candesartan	pIC_{50} = 9.5–9.7	N.A.	[199]
Valsartan	pIC_{50} = 8.6	N.A.	[200]
Telmisartan	pIC_{50} = 8.4	N.A.	[201]
PD123177	N.A.	pIC_{50} = 8.5–9.5	[202]
PD123319	N.A.	pIC_{50} = 8.25	[194]

N.A.: non-applicable. EC_{50}: half maximum effective concentration; IC_{50}: half maximum inhibitory concentration; Kd: dissociation constant. Ki: inhibition constant.

5.2. Selective Activation of the β-Arrestin Pathway

The use of biased agonists is another strategy to regulate the AT_1/AT_2 receptors' balance. A biased agonist is a receptor-specific ligand capable of selectively activating a single signaling pathway by preferentially stabilizing one of the receptor conformations. This phenomenon is also called "functional selectivity". In the case of the AT_1 receptor, several biased agonists have been developed that allow AT_1 receptor to adopt an alternative active conformation [45]. For example SII, TRV120027, and TRV120023 selectively activate the β-arrestin pathway while inhibiting the G protein pathway [197].

SII is a modified Ang II peptide, which can trigger the phosphorylation of the AT_1 receptor, and thus β-arrestin recruitment [203]. SII elicits GRK6 and β-arrestin 2-dependent ERK activation, and promotes β-arrestin-regulated Akt activity and mTOR phosphorylation to stimulate protein synthesis [204]. TRV120023 has been reported to only recruit β-arrestin while blocking G protein activation, enhancing myocyte contractility but without promoting hypertrophy, as seen with Ang II [205]. For example, an acute infusion of Ang II increased mean arterial pressure in male SHR, accompanied by a reduction in glomerular filtration rate, whereas TRV120023 blocked the acute infusion of an Ang II-induced hypertensive state in a dose-dependent manner [205].

TRV120027 has been studied in several preclinical studies in a heart failure model, and has shown promising results [206]. A recent study just demonstrated that β-arrestin signaling, mediated by the PAR-1 receptor, produces prolonged activation of MAPK 42/44, which increases PDGF-β secretion. It has been shown that after ischemic stroke, PDGF-β secretion can provide increased protection of endothelial function and barrier integrity [207]. Similarly, there are biased agonists that selectively activate the G protein pathway, such as TRV120055 or TRV120056 [33].

The use of biased agonists could be interesting in a pathological setting. Indeed, unlike ARBs, which completely inhibit the effects of the AT_1 receptor, β-arrestin-biased agonists will allow the activation of the β-arrestin pathway, with potentially protective effects. Activation of the β-arrestin pathway to mediate internalization could furthermore reduce the number of AT_1 receptors present at the surface. On the other hand, if AT_1 receptors are already occupied by a biased agonist, Ang II could then be able to bind to the

AT_2 receptor. These combined effects could restore the functional balance without blocking the AT_1 receptor. In addition to this internalization, β-arrestin may activate beneficial secondary signaling pathways [207].

Although TRV120027 is able to bind to the AT_2 receptor with an affinity comparable to that of the AT_1 receptor [197], no functional studies have been carried out. Furthermore, as the receptor is unable to interact with β-arrestin and be internalized, most signaling pathways function through the stimulation of the G protein pathway.

5.3. Post-Translational Regulation

We have previously shown that AT_1 and AT_2 receptors can undergo different post-translation changes (see Section 4.3).

Regarding phosphorylation, we have already established that the AT_2 receptor was not able to recruit β-arrestins as would classically be the case for GPCRs, including the AT_1 receptor. On the other hand, intervention on certain GRKs, such as GRK4, could have an effect on the AT_1/AT_2 balance because it would allow, on the one hand, the inhibition of the overexpression of AT_1 receptors at the membrane, and on the other hand, a decrease in the phosphorylation of the AT_2 receptor and thus the restoration of AT_2 receptor signaling.

Although the glycosylations of the AT_1 receptor are very important for its membrane addressing and ligand binding, for the AT_2 receptor, the role of these glycosylations remains unknown.

AT_1 and AT_2 receptors both have four cysteines involved in disulfide bridges. It has been shown that reduction of these disulfide bridges by dithiothreitol (DTT) strongly decreases Ang II binding for the AT_1 receptor, but not for the AT_2 receptor [32].

AT_1 and AT_2 receptors can undergo *S*-nitrosation. In a study of our group, rat middle cerebral arteries were pretreated with an NO donor, *S*-nitrosoglutathione (GSNO), and this led to abolition of Ang II-induced vasoconstriction [208]. The following results were found in an ex vivo rat aortic ring model. A decrease in Ang II-induced vascular contraction was observed when arteries were pretreated with GSNO. In vivo, a decrease in blood pressure response to Ang II was also detected after oral administration of GSNO [209]. In vitro experiments showed that pretreatment of HEK293 cells with GSNO seems not to alter the internalization of activated AT_1 receptors [208]. Similar to biased agonists, S-nitrosation disrupts AT_1 receptor G protein signaling, the advantage here being that NO is an endogenous product.

This post-translational modification seems to be an interesting tool for directing a rather protective response by not altering the AT_1/AT_2 balance as antagonists and/or agonists can. Indeed, we have seen that NO is one of the main second messengers of AT_2 receptors. We can envisage that the NO produced by the AT_2 receptor, which is even more important when the AT_2 receptor and B_2 receptor form a dimer, could *S*-nitrosate the AT_1 receptor.

In general, the use of biased agonists of the β-arrestin pathway and *S*-nitrosation of the AT_1 receptor allow for the interruption of the G-protein pathway. In addition, biased agonists allow the activation of signaling pathways with protective effects similar to those of the AT_2 receptor.

6. Conclusions

In summary, we have seen through several examples that the AT_1/AT_2 balance is very important from a physiological point of view, and that the disturbance of this balance leads to the appearance of pathologies, most often as a result of the dominance of the AT_1 receptor over the AT_2 receptor. However, emerging studies have shown that secondary signaling of β-arrestins could have beneficial effects. This is why a finer regulation of this balance via *S*-nitrosation of the receptors or the use of biased agonists seems to be interesting, and could open new therapeutic perspectives.

Author Contributions: Conceptualization, F.D., M.C. and C.D.; writing—original draft preparation, M.C.; writing—review and editing, F.D., S.F. and C.D.; supervision, F.D. and S.F.; project administration, F.D. and S.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the French Ministry of Education, Research and Technology (Paris, France, EA3452).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Abbreviations

ACE	Angiotensin-converting enzyme
Ang II	angiotensin II
ARB	AT_1 receptor blocker
AT_1	angiotensin II type 1 receptor
AT_2	angiotensin II type 2 receptor
B2	bradykinin receptor
BK	bradykinin
C21	compound 21
GPCR	G protein-coupled receptor
GRKs	G protein-coupled receptor kinases
KO	knock-out
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MasR	Mas receptor
NF-kβ	nuclear factor kβ
PKC	protein kinase C
PLA2	phospholipase A_2
PLC	phospholipase C
RAS	renin-angiotensin system
ROS	reactive oxygen species
VSMC	vascular smooth muscle cells

References

1. Henrion, D.; Chillon, J.-M.; Capdeville-Atkinson, C.; Vinceneux-Feugier, M.; Atkinson, J. Chronic treatment with the angiotensin I converting enzyme inhibitor, perindopril, protects in vitro carbachol-induced vasorelaxation in a rat model of vascular calcium overload. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, *104*, 966–972. [CrossRef]
2. Lartaud, I.; Bray-des-Boscs, L.; Chillon, J.M.; Atkinson, J.; Capdeville-Atkinson, C. In vivo cerebrovascular reactivity in Wistar and Fischer 344 rat strains during aging. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **1993**, *264*, H851–H858. [CrossRef]
3. Régrigny, O.; Atkinson, J.; Capdeville-Atkinson, C.; Limiñana, P.; Chillon, J.-M. Effect of Lovastatin on Cerebral Circulation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **2000**, *35*, 1105–1110. [CrossRef]
4. Atkinson, J. Stroke, high blood pressure and the renin–angiotensin–aldosterone system—New developments. *Front. Pharm.* **2011**, *2*, 22. [CrossRef]
5. Tigerstedt, R.; Bergman, P.Q. Niere und Kreislauf [1]. *Skand. Arch. Für Physiol.* **1898**, *8*, 223–271. [CrossRef]
6. Guyton, A.C. Blood Pressure Control—Special Role of the Kidneys and Body Fluids. *Science* **1991**, *252*, 1813–1816. [CrossRef] [PubMed]
7. Skeggs, L.T.; Lentz, K.E.; Gould, A.B.; Hochstrasser, H.; Kahn, J.R. Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system. *Fed. Proc.* **1967**, *26*, 42–47.
8. Murphy, T.J.; Alexander, R.W.; Griendling, K.K.; Runge, M.S.; Bernstein, K.E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **1991**, *351*, 233–236. [CrossRef] [PubMed]
9. Mukoyama, M.; Nakajima, M.; Horiuchi, M.; Sasamura, H.; Pratt, R.E.; Dzau, V.J. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24539–24542. [CrossRef]

10. Sevá Pessôa, B.; van der Lubbe, N.; Verdonk, K.; Roks, A.J.M.; Hoorn, E.J.; Danser, A.H.J. Key developments in renin–angiotensin–aldosterone system inhibition. *Nat. Rev. Nephrol.* **2013**, *9*, 26–36. [CrossRef]
11. Simões e Silva, A.; Silveira, K.; Ferreira, A.; Teixeira, M. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis: Angiotensin-(1-7) in inflammation and fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 477–492. [CrossRef] [PubMed]
12. Povlsen, A.; Grimm, D.; Wehland, M.; Infanger, M.; Krüger, M. The Vasoactive Mas Receptor in Essential Hypertension. *JCM* **2020**, *9*, 267. [CrossRef]
13. Schleifenbaum, J. Alamandine and Its Receptor MrgD Pair Up to Join the Protective Arm of the Renin-Angiotensin System. *Front. Med.* **2019**, *6*, 107. [CrossRef] [PubMed]
14. Chai, S.Y.; Fernando, R.; Peck, G.; Ye, S.-Y.; Mendelsohn, F.A.O.; Jenkins, T.A.; Albiston, A.L. What's new in the renin-angiotensin system?: The angiotensin IV/AT4 receptor. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2728–2737. [CrossRef]
15. Kramár, E.A.; Krishnan, R.; Harding, J.W.; Wright, J.W. Role of nitric oxide in angiotensin IV-induced increases in cerebral blood flow. *Regul. Pept.* **1998**, *74*, 185–192. [CrossRef] [PubMed]
16. Hamilton, T.A.; Handa, R.K.; Harding, J.W.; Wright, J.W. A role for the angiotensin IV/AT4 system in mediating natriuresis in the rat. *Peptides* **2001**, *22*, 935–944. [CrossRef]
17. Wilson, W.L.; Munn, C.; Ross, R.C.; Harding, J.W.; Wright, J.W. The role of the AT4 and cholinergic systems in the Nucleus Basalis Magnocellularis (NBM): Effects on spatial memory. *Brain Res.* **2009**, *1272*, 25–31. [CrossRef]
18. Royea, J.; Hamel, E. Brain angiotensin II and angiotensin IV receptors as potential Alzheimer's disease therapeutic targets. *GeroScience* **2020**, *42*, 1237–1256. [CrossRef]
19. Horiuchi, M.; Akishita, M.; Dzau, V.J. Recent Progress in Angiotensin II Type 2 Receptor Research in the Cardiovascular System. *Hypertension* **1999**, *33*, 613–621. [CrossRef]
20. Gasparo, M.D.; Catt, K.J.; Inagami, T.; Wright, J.W.; Unger, T. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 415–472.
21. Campbell, D.J.; Habener, J.F. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J. Clin. Investig.* **1986**, *78*, 31–39. [CrossRef] [PubMed]
22. Delaitre, C.; Boisbrun, M.; Lecat, S.; Dupuis, F. Targeting the Angiotensin II Type 1 Receptor in Cerebrovascular Diseases: Biased Signaling Raises New Hopes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6738. [CrossRef] [PubMed]
23. Steckelings, U.M.; Widdop, R.E.; Sturrock, E.D.; Lubbe, L.; Hussain, T.; Kaschina, E.; Unger, T.; Hallberg, A.; Carey, R.M.; Sumners, C. The Angiotensin AT_2 Receptor: From a Binding Site to a Novel Therapeutic Target. *Pharmacol. Rev.* **2022**, *74*, 1051–1135. [CrossRef] [PubMed]
24. Hunyady, L.; Catt, K.J. Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* **2006**, *20*, 953–970. [CrossRef] [PubMed]
25. Forrester, S.J.; Booz, G.W.; Sigmund, C.D.; Coffman, T.M.; Kawai, T.; Rizzo, V.; Scalia, R.; Eguchi, S. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 1627–1738. [CrossRef]
26. Pueyo, M.E.; N'Diaye, N.; Michel, J.-B. Angiotensin Il-elicited signal transduction via AT1 receptors in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *118*, 79–84. [CrossRef]
27. Busche, S.; Gallinat, S.; Bohle, R.-M.; Reinecke, A.; Seebeck, J.; Franke, F.; Fink, L.; Zhu, M.; Sumners, C.; Unger, T. Expression of Angiotensin AT1 and AT2 Receptors in Adult Rat Cardiomyocytes after Myocardial Infarction. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 605–611. [CrossRef]
28. Siragy, H.M. AT1 and AT2 receptor in the kidney: Role in health and disease. *Semin. Nephrol.* **2004**, *24*, 93–100. [CrossRef]
29. Lenkei, Z.; Palkovits, M.; Corvol, P.; Llorens-Cortès, C. Expression of Angiotensin Type-1 (AT1) and Type-2 (AT2) Receptor mRNAs in the Adult Rat Brain: A Functional Neuroanatomical Review. *Front. Neuroendocrinol.* **1997**, *18*, 383–439. [CrossRef]
30. Johren, O.; Saavedra, J.M. Expression of AT1A and AT1B angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-wk-old rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **1996**, *271*, E104–E112. [CrossRef]
31. Zhang, H.; Unal, H.; Gati, C.; Han, G.W.; Liu, W.; Zatsepin, N.A.; James, D.; Wang, D.; Nelson, G.; Weierstall, U.; et al. Structure of the Angiotensin Receptor Revealed by Serial Femtosecond Crystallography. *Cell* **2015**, *161*, 833–844. [CrossRef]
32. Ohyama, K.; Yamano, Y.; Sano, T.; Nakagomi, Y.; Hamakubo, T.; Morishima, I.; Inagami, T. Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA. *Regul. Pept.* **1995**, *57*, 141–147. [CrossRef] [PubMed]
33. Wingler, L.M.; Skiba, M.A.; McMahon, C.; Staus, D.P.; Kleinhenz, A.L.W.; Suomivuori, C.-M.; Latorraca, N.R.; Dror, R.O.; Lefkowitz, R.J.; Kruse, A.C. Angiotensin and biased analogs induce structurally distinct active conformations within a GPCR. *Science* **2020**, *367*, 888–892. [CrossRef] [PubMed]
34. Suomivuori, C.-M.; Latorraca, N.R.; Wingler, L.M.; Eismann, S.; King, M.C.; Kleinhenz, A.L.W.; Skiba, M.A.; Staus, D.P.; Kruse, A.C.; Lefkowitz, R.J.; et al. Molecular mechanism of biased signaling in a prototypical G protein–coupled receptor. *Science.* **2020**, *367*, 881–887. [CrossRef]
35. Aplin, M.; Bonde, M.M.; Hansen, J.L. Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**, *46*, 15–24. [CrossRef] [PubMed]
36. Balakumar, P.; Jagadeesh, G. Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *53*, R71–R92. [CrossRef]
37. Kaschina, E.; Unger, T. Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signalling and Function. *Blood Press.* **2003**, *12*, 70–88. [CrossRef]

38. Freeman, E.J.; Chisolm, G.M.; Tallant, E.A. Role of calcium and protein kinase C in the activation of phospholipase D by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *319*, 84–92. [CrossRef]
39. Lassegue, B.; Alexander, R.W.; Clark, M.; Akers, M.; Griendling, K.K. Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin Il-stimulated vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* **1993**, *292*, 509–517. [CrossRef]
40. Vinturache, A.E.; Smith, F.G. Angiotensin type 1 and type 2 receptors during ontogeny: Cardiovascular and renal effects. *Vasc. Pharmacol.* **2014**, *63*, 145–154. [CrossRef]
41. Rao, G.N.; Lassegue, B.; Alexander, R.W.; Griendling, K.K. Angiotensin 11 stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* **1994**, *299*, 197–201. [CrossRef]
42. Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 639–672. [PubMed]
43. Ohtsu, H.; Suzuki, H.; Nakashima, H.; Dhobale, S.; Frank, G.D.; Motley, E.D.; Eguchi, S. Angiotensin II Signal Transduction Through Small GTP-Binding Proteins: Mechanism and Significance in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* **2006**, *48*, 534–540. [CrossRef] [PubMed]
44. Kawai, T.; Forrester, S.J.; O'Brien, S.; Baggett, A.; Rizzo, V.; Eguchi, S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* **2017**, *125*, 4–13. [CrossRef] [PubMed]
45. Violin, J.D.; Lefkowitz, R.J. β-Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 416–422. [CrossRef]
46. Luttrell, L.M.; Lefkowitz, R.J. The role of β-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 455–465. [CrossRef]
47. Tohgo, A.; Pierce, K.L.; Choy, E.W.; Lefkowitz, R.J.; Luttrell, L.M. β-Arrestin Scaffolding of the ERK Cascade Enhances Cytosolic ERK Activity but Inhibits ERK-mediated Transcription following Angiotensin AT1a Receptor Stimulation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9429–9436. [CrossRef]
48. Peterson, Y.K.; Luttrell, L.M. The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol. Rev.* **2017**, *69*, 256–297. [CrossRef]
49. Griendling, K.K.; Minieri, C.A.; Ollerenshaw, J.D.; Alexander, R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **1994**, *74*, 1141–1148. [CrossRef]
50. Touyz, R.M.; Briones, A.M. Reactive oxygen species and vascular biology: Implications in human hypertension. *Hypertens. Res.* **2011**, *34*, 5–14. [CrossRef]
51. Tsutsumi, K.; Saavedra, J.M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am. J. Physiol.* **1991**, *261*, R209–R216. [CrossRef] [PubMed]
52. Ichiki, T.; Herold, C.L.; Kambayashi, Y.; Bardhan, S.; Inagami, T. Cloning of the cDNA and the genomic DNA of the mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* **1994**, *1189*, 247–250. [CrossRef]
53. Rompe, F.; Artuc, M.; Hallberg, A.; Alterman, M.; Ströder, K.; Thöne-Reineke, C.; Reichenbach, A.; Schacherl, J.; Dahlöf, B.; Bader, M.; et al. Direct Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation Acts Anti-Inflammatory Through Epoxyeicosatrienoic Acid and Inhibition of Nuclear Factor κB. *Hypertension* **2010**, *55*, 924–931. [CrossRef]
54. Zhang, H.; Han, G.W.; Batyuk, A.; Ishchenko, A.; White, K.L.; Patel, N.; Sadybekov, A.; Zamlynny, B.; Rudd, M.T.; Hollenstein, K.; et al. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature* **2017**, *544*, 327–332. [CrossRef]
55. Griendling, K.K.; Lassègue, B.; Alexander, R.W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 281–306. [CrossRef] [PubMed]
56. Zhang, J.; Pratt, R.E. The AT2 Receptor Selectively Associates with Giα2 and Giα3 in the Rat Fetus. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15026–15033. [CrossRef]
57. Feng, Y.-H.; Saad, Y.; Karnik, S.S. Reversible inactivation of AT_2 angiotensin II receptor from cysteine-disulfide bond exchange. *FEBS Lett.* **2000**, *484*, 133–138. [CrossRef]
58. Heerding, J.N.; Yee, D.K.; Jacobs, S.L.; Fluharty, S.J. Mutational analysis of the angiotensin II type 2 receptor: Contribution of conserved extracellular amino acids. *Regul. Pept.* **1997**, *72*, 97–103. [CrossRef]
59. Yee, D.K.; Kisley, L.R.; Heerding, J.N.; Fluharty, S.J. Mutation of a conserved fifth transmembrane domain lysine residue (Lys^{215}) attenuates ligand binding in the angiotensin II type 2 receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1997**, *51*, 238–241. [CrossRef]
60. Turner, C.A.; Cooper, S.; Pulakat, L. 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.* **1999**, *257*, 704–707. [CrossRef]
61. Steckelings, U.M.; Kaschina, E.; Unger, T. The AT2 receptor—A matter of love and hate. *Peptides* **2005**, *26*, 1401–1409. [CrossRef]
62. Turu, G.; Szidonya, L.; Gáborik, Z.; Buday, L.; Spät, A.; Clark, A.J.L.; Hunyady, L. Differential beta-arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 41–45. [CrossRef] [PubMed]
63. Padia, S.H.; Carey, R.M. AT2 receptors: Beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* **2013**, *465*, 99–110. [CrossRef] [PubMed]
64. Bottari, S.P.; Taylor, V.; King, I.N.; Bogdal, Y.; Whitebread, S.; de Gasparo, M. Angiotensin II AT2 receptors do not interact with guanine nucleotide binding proteins. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* **1991**, *207*, 157–163. [CrossRef]
65. Stennett, A.K.; Qiao, X.; Falone, A.E.; Koledova, V.V.; Khalil, R.A. Increased vascular angiotensin type 2 receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *296*, H745–H755. [CrossRef] [PubMed]

66. Alexander, L.D.; Ding, Y.; Alagarsamy, S.; Cui, X. Angiotensin II stimulates fibronectin protein synthesis via a Gβγ/arachidonic acid-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2014**, *307*, F287–F302. [CrossRef]
67. Savoia, C.; Tabet, F.; Yao, G.; Schiffrin, E.L.; Touyz, R.M. 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.* **2005**, *23*, 1037–1045. [CrossRef] [PubMed]
68. Savoia, C.; Ebrahimian, T.; He, Y.; Gratton, J.-P.; Schiffrin, E.L.; Touyz, R.M. Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J. Hypertens.* **2006**, *24*, 2417–2422. [CrossRef] [PubMed]
69. Siragy, H.M.; Carey, R.M. The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J. Clin. Investig.* **1997**, *100*, 264–269. [CrossRef]
70. Tsutsumi, Y.; Matsubara, H.; Masaki, H.; Kurihara, H.; Murasawa, S.; Takai, S.; Miyazaki, M.; Nozawa, Y.; Ozono, R.; Nakagawa, K.; et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J. Clin. Investig.* **1999**, *104*, 925–935. [CrossRef]
71. Yayama, K.; Hiyoshi, H.; Imazu, D.; Okamoto, H. Angiotensin II Stimulates Endothelial NO Synthase Phosphorylation in Thoracic Aorta of Mice With Abdominal Aortic Banding Via Type 2 Receptor. *Hypertension* **2006**, *48*, 958–964. [CrossRef] [PubMed]
72. Abadir, P.M.; Periasamy, A.; Carey, R.M.; Siragy, H.M. Angiotensin II Type 2 Receptor–Bradykinin B_2 Receptor Functional Heterodimerization. *Hypertension* **2006**, *48*, 316–322. [CrossRef] [PubMed]
73. Dimitropoulou, C.; White, R.E.; Fuchs, L.; Zhang, H.; Catravas, J.D.; Carrier, G.O. Angiotensin II Relaxes Microvessels Via the AT_2 Receptor and Ca^{2+}-Activated K^+ (BK_{Ca}) Channels. *Hypertension* **2001**, *37*, 301–307. [CrossRef] [PubMed]
74. Saavedra, J.M.; Armando, I. Angiotensin II AT2 Receptors Contribute to Regulate the Sympathoadrenal and Hormonal Reaction to Stress Stimuli. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2018**, *38*, 85–108. [CrossRef] [PubMed]
75. Foulquier, S.; Steckelings, U.M.; Unger, T. Perspective: A tale of two receptors. *Nature* **2013**, *493*, S9. [CrossRef]
76. Anderson, W.P.; Selig, S.E.; Korner, P.I. Role of Angiotensin II in the Hypertension Induced by Renal Artery Stenosis. *Clin. Exp. Hypertens. Part A Theory Pract.* **1984**, *6*, 299–314. [CrossRef]
77. Foulquier, S.; Steckelings, U.M.; Unger, T. Impact of the AT2 Receptor Agonist C21 on Blood Pressure and Beyond. *Curr. Hypertens. Rep.* **2012**, *14*, 403–409. [CrossRef]
78. Fischer-Ferraro, C.; Nahmod, V.E.; Goldstein, D.J.; Finkielman, S. Angiotensin and renin in rat and dog brain. *J. Exp. Med.* **1971**, *133*, 353–361. [CrossRef]
79. Barnes, J.M.; Steward, L.J.; Barber, P.C.; Barnes, N.M. Identification and characterisation of angiotensin II receptor subtypes in human brain. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *230*, 251–258. [CrossRef]
80. Vincent, J.-M.; Kwan, Y.W.; Lung Chan, S.; Perrin-Sarrado, C.; Atkinson, J.; Chillon, J.-M. Constrictor and Dilator Effects of Angiotensin II on Cerebral Arterioles. *Stroke* **2005**, *36*, 2691–2695. [CrossRef]
81. Dupuis, F.; Atkinson, J.; Limiñana, P.; Chillon, J.-M. 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.* **2005**, *23*, 1061–1066. [CrossRef]
82. Foulquier, S.; Dupuis, F.; Perrin-Sarrado, C.; Maguin Gatè, K.; Leroy, P.; Liminana, P.; Atkinson, J.; Capdeville-Atkinson, C.; Lartaud, I. Differential Effects of Short-Term Treatment with Two AT1 Receptor Blockers on Diameter of Pial Arterioles in SHR. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42469. [CrossRef]
83. Stenman, E.; Edvinsson, L. Cerebral Ischemia Enhances Vascular Angiotensin AT_1 Receptor–Mediated Contraction in Rats. *Stroke* **2004**, *35*, 970–974. [CrossRef]
84. Vikman, P.; Edvinsson, L. Gene expression profiling in the human middle cerebral artery after cerebral ischemia. *Eur. J. Neurol.* **2006**, *13*, 1324–1332. [CrossRef] [PubMed]
85. Chen, D.; Jancovski, N.; Bassi, J.K.; Nguyen-Huu, T.-P.; Choong, Y.-T.; Palma-Rigo, K.; Davern, P.J.; Gurley, S.B.; Thomas, W.G.; Head, G.A.; et al. Angiotensin Type 1A Receptors in C1 Neurons of the Rostral Ventrolateral Medulla Modulate the Pressor Response to Aversive Stress. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 2051–2061. [CrossRef] [PubMed]
86. De Kloet, A.D.; Wang, L.; Ludin, J.A.; Smith, J.A.; Pioquinto, D.J.; Hiller, H.; Steckelings, U.M.; Scheuer, D.A.; Sumners, C.; Krause, E.G. Reporter mouse strain provides a novel look at angiotensin type-2 receptor distribution in the central nervous system. *Brain Struct. Funct.* **2016**, *221*, 891–912. [CrossRef] [PubMed]
87. Gonzalez, A.D.; Wang, G.; Waters, E.M.; Gonzales, K.L.; Speth, R.C.; Van Kempen, T.A.; Marques-Lopes, J.; Young, C.N.; Butler, S.D.; Davisson, R.L.; et al. Distribution of angiotensin type 1a receptor-containing cells in the brains of bacterial artificial chromosome transgenic mice. *Neuroscience* **2012**, *226*, 489–509. [CrossRef] [PubMed]
88. Elsaafien, K.; de Kloet, A.D.; Krause, E.G.; Sumners, C. Brain Angiotensin Type-1 and Type-2 Receptors in Physiological and Hypertensive Conditions: Focus on Neuroinflammation. *Curr. Hypertens. Rep.* **2020**, *22*, 48. [CrossRef] [PubMed]
89. De Kloet, A.D.; Wang, L.; Pitra, S.; Hiller, H.; Smith, J.A.; Tan, Y.; Nguyen, D.; Cahill, K.M.; Sumners, C.; Stern, J.E.; et al. A Unique "Angiotensin-Sensitive" Neuronal Population Coordinates Neuroendocrine, Cardiovascular, and Behavioral Responses to Stress. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 3478–3490. [CrossRef]
90. De Kloet, A.D.; Pitra, S.; Wang, L.; Hiller, H.; Pioquinto, D.J.; Smith, J.A.; Sumners, C.; Stern, J.E.; Krause, E.G. Angiotensin Type-2 Receptors Influence the Activity of Vasopressin Neurons in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus in Male Mice. *Endocrinology* **2016**, *157*, 3167–3180. [CrossRef]

91. de Oliveira-Sales, E.B.; Nishi, E.E.; Boim, M.A.; Dolnikoff, M.S.; Bergamaschi, C.T.; Campos, R.R. Upregulation of AT1R and iNOS in the Rostral Ventrolateral Medulla (RVLM) Is Essential for the Sympathetic Hyperactivity and Hypertension in the 2K-1C Wistar Rat Model. *Am. J. Hypertens.* **2010**, *23*, 708–715. [CrossRef]
92. Li, Z.; Iwai, M.; Wu, L.; Shiuchi, T.; Jinno, T.; Cui, T.-X.; Horiuchi, M. Role of AT_2 receptor in the brain in regulation of blood pressure and water intake. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, *284*, H116–H121. [CrossRef] [PubMed]
93. Gao, L.; Wang, W.-Z.; Wang, W.; Zucker, I.H. Imbalance of Angiotensin Type 1 Receptor and Angiotensin II Type 2 Receptor in the Rostral Ventrolateral Medulla: Potential Mechanism for Sympathetic Overactivity in Heart Failure. *Hypertension* **2008**, *52*, 708–714. [CrossRef] [PubMed]
94. Valero-Esquitino, V.; Lucht, K.; Namsolleck, P.; Monnet-Tschudi, F.; Stubbe, T.; Lucht, F.; Liu, M.; Ebner, F.; Brandt, C.; Danyel, L.A.; et al. Direct angiotensin type 2 receptor (AT2R) stimulation attenuates T-cell and microglia activation and prevents demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Clin. Sci.* **2015**, *128*, 95–109. [CrossRef]
95. Kim, J.-H.; Afridi, R.; Cho, E.; Yoon, J.H.; Lim, Y.-H.; Lee, H.-W.; Ryu, H.; Suk, K. Soluble ANPEP Released From Human Astrocytes as a Positive Regulator of Microglial Activation and Neuroinflammation: Brain Renin–Angiotensin System in Astrocyte–Microglia Crosstalk. *Mol. Cell. Proteom.* **2022**, *21*, 100424. [CrossRef] [PubMed]
96. Rodriguez-Perez, A.I.; Borrajo, A.; Rodriguez-Pallares, J.; Guerra, M.J.; Labandeira-Garcia, J.L. Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation: NADPH-Oxidase and Rho-Kinase Interaction. *Glia* **2015**, *63*, 466–482. [CrossRef]
97. Villar-Cheda, B.; Valenzuela, R.; Rodriguez-Perez, A.I.; Guerra, M.J.; Labandeira-Garcia, J.L. Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 204.e1–204.e11. [CrossRef]
98. Labandeira-Garcia, J.L.; Rodríguez-Perez, A.I.; Garrido-Gil, P.; Rodriguez-Pallares, J.; Lanciego, J.L.; Guerra, M.J. Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 129. [CrossRef]
99. Campbell, G.J.; Hands, E.L.; Van de Pette, M. The Role of CDKs and CDKIs in Murine Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5343. [CrossRef]
100. Han, H.J.; Han, J.Y.; Heo, J.S.; Lee, S.H.; Lee, M.Y.; Kim, Y.H. ANG II-stimulated DNA synthesis is mediated by ANG II receptor-dependent Ca2+/PKC as well as EGF receptor-dependent PI3K/Akt/mTOR/p70S6K1 signal pathways in mouse embryonic stem cells. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *211*, 618–629. [CrossRef]
101. Diep, Q.N.; El Mabrouk, M.; Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. Expression of Cell Cycle Proteins in Blood Vessels of Angiotensin II–Infused Rats: Role of AT_1 Receptors. *Hypertension* **2001**, *37*, 604–608. [CrossRef]
102. Gingras, B.; Rodier, G.; Giasson, E.; Coulombe, P.; Chassagne, C.; Meloche, S. Expression of angiotensin type II receptor downregulates Cdk4 synthesis and inhibits cell-cycle progression. *Oncogene* **2003**, *22*, 2633–2642. [CrossRef] [PubMed]
103. Peluso, A.A.; Kempf, S.J.; Verano-Braga, T.; Rodrigues-Ribeiro, L.; Johansen, L.E.; Hansen, M.R.; Kitlen, G.; Haugaard, A.H.; Sumners, C.; Ditzel, H.J.; et al. Quantitative Phosphoproteomics of the Angiotensin AT_2-Receptor Signaling Network Identifies HDAC1 (Histone-Deacetylase-1) and p53 as Mediators of Antiproliferation and Apoptosis. *Hypertension* **2022**, *79*, 2530–2541. [CrossRef] [PubMed]
104. Cubillos-Rojas, M.; Schneider, T.; Bartrons, R.; Ventura, F.; Rosa, J.L. NEURL4 regulates the transcriptional activity of tumor suppressor protein p53 by modulating its oligomerization. *Oncotarget* **2017**, *8*, 61824–61836. [CrossRef]
105. Yu, L.; Meng, W.; Ding, J.; Cheng, M. Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through suppression of the AT1R/beta catenin pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *473*, 455–461. [CrossRef]
106. Zhou, L.; Liu, Y. Wnt/β-catenin signaling and renin–angiotensin system in chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2016**, *25*, 100–106. [CrossRef] [PubMed]
107. Geisterfer, A.A.; Peach, M.J.; Owens, G.K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* **1988**, *62*, 749–756. [CrossRef]
108. Naftilan, A.J.; Pratt, R.E.; Dzau, V.J. Induction of Platelet-derived Growth Factor A-chain and c-myc Gene Expressions by Angiotensin 11 in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Clin. Investig.* **1989**, *83*, 1419–1424. [CrossRef]
109. Wolf, G.; Wenzel, U.O. Angiotensin II and Cell Cycle Regulation. *Hypertension* **2004**, *43*, 693–698. [CrossRef]
110. Fujihara, S.; Morishita, A.; Ogawa, K.; Tadokoro, T.; Chiyo, T.; Kato, K.; Kobara, H.; Mori, H.; Iwama, H.; Masaki, T. The angiotensin II type 1 receptor antagonist telmisartan inhibits cell proliferation and tumor growth of esophageal adenocarcinoma via the AMPKα/mTOR pathway in vitro and in vivo. *Oncotarget* **2017**, *8*, 8536–8549. [CrossRef]
111. Samukawa, E.; Fujihara, S.; Oura, K.; Iwama, H.; Yamana, Y.; Tadokoro, T.; Chiyo, T.; Kobayashi, K.; Morishita, A.; Nakahara, M.; et al. Angiotensin receptor blocker telmisartan inhibits cell proliferation and tumor growth of cholangiocarcinoma through cell cycle arrest. *Int. J. Oncol.* **2017**, *51*, 1674–1684. [CrossRef] [PubMed]
112. Du, H.; Liang, Z.; Zhang, Y.; Jie, F.; Li, J.; Fei, Y.; Huang, Z.; Pei, N.; Wang, S.; Li, A.; et al. Effects of Angiotensin II Type 2 Receptor Overexpression on the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e83754. [CrossRef] [PubMed]
113. Arrieta, O.; Pineda-Olvera, B.; Guevara-Salazar, P.; Hernández-Pedro, N.; Morales-Espinosa, D.; Cerón-Lizarraga, T.L.; González-De la Rosa, C.H.; Rembao, D.; Segura-Pacheco, B.; Sotelo, J. Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *Br. J. Cancer* **2008**, *99*, 160–166. [CrossRef] [PubMed]

114. Dolley-Hitze, T.; Jouan, F.; Martin, B.; Mottier, S.; Edeline, J.; Moranne, O.; Le Pogamp, P.; Belaud-Rotureau, M.-A.; Patard, J.-J.; Rioux-Leclercq, N.; et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma? *Br. J. Cancer* **2010**, *103*, 1698–1705. [CrossRef]
115. Perini, M.V.; Dmello, R.S.; Nero, T.L.; Chand, A.L. Evaluating the benefits of renin-angiotensin system inhibitors as cancer treatments. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *211*, 107527. [CrossRef]
116. Suganuma, T.; Ino, K.; Shibata, K.; Kajiyama, H.; Nagasaka, T.; Mizutani, S.; Kikkawa, F. Functional Expression of the Angiotensin II Type1 Receptor in Human Ovarian Carcinoma Cells and Its Blockade Therapy Resulting in Suppression of Tumor Invasion, Angiogenesis, and Peritoneal Dissemination. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2686–2694. [CrossRef]
117. Rhodes, D.R.; Ateeq, B.; Cao, Q.; Tomlins, S.A.; Mehra, R.; Laxman, B.; Kalyana-Sundaram, S.; Lonigro, R.J.; Helgeson, B.E.; Bhojani, M.S.; et al. AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10284–10289. [CrossRef]
118. Tamura, M.; Yan, H.; Zegarra-Moro, O.; Edl, J.; Oursler, S.; Chard-Bergstrom, C.; Andrews, G.; Kanehira, T.; Takekoshi, S.; Mernaugh, R. Specific single chain variable fragment (ScFv) antibodies to angiotensin II AT2 receptor: Evaluation of the angiotensin II receptor expression in normal and tumor-bearing mouse lung. *J. Mol. Hist.* **2008**, *39*, 351–358. [CrossRef]
119. Pickel, L.; Matsuzuka, T.; Doi, C.; Ayuzawa, R.; Maurya, D.K.; Xie, S.-X.; Berkland, C.; Tamura, M. Over-expression of angiotensin II type 2 receptor gene induces cell death in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Biol. Ther.* **2010**, *9*, 277–285. [CrossRef]
120. Pei, N.; Mao, Y.; Wan, P.; Chen, X.; Li, A.; Chen, H.; Li, J.; Wan, R.; Zhang, Y.; Du, H.; et al. Angiotensin II type 2 receptor promotes apoptosis and inhibits angiogenesis in bladder cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 77. [CrossRef]
121. Ito, Y.; Naiki-Ito, A.; Kato, H.; Suzuki, S.; Kuno, T.; Ishiguro, Y.; Takahashi, S.; Uemura, H. Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the down-regulation of the androgen receptor. *Oncotarget* **2018**, *9*, 13859–13869. [CrossRef] [PubMed]
122. Zhao, Y.; Lützen, U.; Fritsch, J.; Zuhayra, M.; Schütze, S.; Steckelings, U.M.; Recanti, C.; Namsoleck, P.; Unger, T.; Culman, J. Activation of intracellular angiotensin AT_2 receptors induces rapid cell death in human uterine leiomyosarcoma cells. *Clin. Sci.* **2015**, *128*, 567–578. [CrossRef] [PubMed]
123. Aleksiejczuk, M.; Gromotowicz-Poplawska, A.; Marcinczyk, N.; Przylipiak, A.; Chabielska, E. The expression of the renin-angiotensin-aldosterone system in the skin and its effects on skin physiology and pathophysiology. *J. Physiol. Pharmacol.* **2019**, *70*. [CrossRef]
124. Silva, I.M.S.; Assersen, K.B.; Willadsen, N.N.; Jepsen, J.; Artuc, M.; Steckelings, U.M. The role of the renin-angiotensin system in skin physiology and pathophysiology. *Exp. Dermatol.* **2020**, *29*, 891–901. [CrossRef] [PubMed]
125. Viswanathan, M.; Saavedra, J.M. Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides* **1992**, *13*, 783–786. [CrossRef] [PubMed]
126. Steckelings, U.M.; Henz, B.M.; Wiehstutz, S.; Unger, T.; Artuc, M. Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. *Br. J. Dermatol.* **2005**, *153*, 887–893. [CrossRef]
127. Takeda, H.; Katagata, Y.; Kondo, S. Immunohistochemical study of angiotensin receptors in human anagen hair follicles and basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **2002**, *147*, 276–280. [CrossRef]
128. Nehme, A.; Zouein, F.A.; Zayeri, Z.D.; Zibara, K. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2019**, *6*, 14. [CrossRef]
129. Jiang, X.; Wu, F.; Xu, Y.; Yan, J.-X.; Wu, Y.-D.; Li, S.-H.; Liao, X.; Liang, J.-X.; Li, Z.-H.; Liu, H.-W. A novel role of angiotensin II in epidermal cell lineage determination: Angiotensin II promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into keratinocytes through the p38 MAPK, JNK and JAK2 signalling pathways. *Exp. Dermatol.* **2019**, *28*, 59–65. [CrossRef]
130. Rha, E.Y.; Kim, J.W.; Kim, J.H.; Yoo, G. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor, Captopril, Improves Scar Healing in Hypertensive Rats. *Int. J. Med. Sci.* **2021**, *18*, 975–983. [CrossRef]
131. Jadhav, S.S.; Sharma, N.; Meeks, C.J.; Mordwinkin, N.M.; Espinoza, T.B.; Roda, N.R.; DiZerega, G.S.; Hill, C.K.; Louie, S.G.; Rodgers, K.E. Effects of combined radiation and burn injury on the renin-angiotensin system: CRBI and renin-angiotensin system. *Wound Repair. Regen.* **2013**, *21*, 131–140. [CrossRef]
132. Kamińska, M.; Mogielnicki, A.; Stankiewicz, A.; Kramkowski, K.; Domaniewski, T.; Buczko, W.; Chabielska, E. Angiotensin Ii Via At1 Receptor Accelerates Arterial Thrombosis In Renovascular Hypertensive Rats. *J. Physiol. Pharmacol.* **2005**, *56*, 571–585. [PubMed]
133. Bernasconi, R.; Nyström, A. Balance and circumstance: The renin angiotensin system in wound healing and fibrosis. *Cell. Signal.* **2018**, *51*, 34–46. [CrossRef] [PubMed]
134. Yahata, Y.; Shirakata, Y.; Tokumaru, S.; Yang, L.; Dai, X.; Tohyama, M.; Tsuda, T.; Sayama, K.; Iwai, M.; Horiuchi, M.; et al. A Novel Function of Angiotensin II in Skin Wound Healing. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13209–13216. [CrossRef] [PubMed]
135. Faghih, M.; Hosseini, S.M.; Smith, B.; Ansari, A.M.; Lay, F.; Ahmed, A.K.; Inagami, T.; Marti, G.P.; Harmon, J.W.; Walston, J.D.; et al. Knockout of Angiotensin AT2 receptors accelerates healing but impairs quality. *Aging* **2015**, *7*, 1185–1197. [CrossRef]
136. Hedayatyanfard, K.; Haddadi, N.; Ziai, S.A.; Karim, H.; Niazi, F.; Steckelings, U.M.; Habibi, B.; Modarressi, A.; Dehpour, A. The renin-angiotensin system in cutaneous hypertrophic scar and keloid formation. *Exp. Dermatol.* **2020**, *29*, 902–909. [CrossRef] [PubMed]
137. Karppinen, S.-M.; Heljasvaara, R.; Gullberg, D.; Tasanen, K.; Pihlajaniemi, T. Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring. *F1000Res* **2019**, *8*, 787. [CrossRef]

138. Murphy, A.M.; Wong, A.L.; Bezuhly, M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenes. Tissue Repair.* **2015**, *8*, 7. [CrossRef]
139. Murphy, A.; LeVatte, T.; Boudreau, C.; Midgen, C.; Gratzer, P.; Marshall, J.; Bezuhly, M. Angiotensin II Type I Receptor Blockade Is Associated with Decreased Cutaneous Scar Formation in a Rat Model. *Plast. Reconstr. Surg.* **2019**, *144*, 803e–813e. [CrossRef]
140. Huang, Y.; Li, J.; Wang, Y.; Chen, D.; Huang, J.; Dai, W.; Peng, P.; Guo, L.; Lei, Y. Intradermal delivery of an angiotensin II receptor blocker using a personalized microneedle patch for treatment of hypertrophic scars. *Biomater. Sci.* **2023**, *11*, 583–595. [CrossRef]
141. Ito, M.; Oliverio, M.I.; Mannon, P.J.; Best, C.F.; Maeda, N.; Smithies, O.; Coffman, T.M. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3521–3525. [CrossRef]
142. Siragy, H.M.; Inagami, T.; Ichiki, T.; Carey, R.M. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT_2) angiotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6506–6510. [CrossRef] [PubMed]
143. Daviet, L.; Lehtonen, J.Y.; Tamura, K.; Griese, D.P.; Horiuchi, M.; Dzau, V.J. Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17058–17062. [CrossRef] [PubMed]
144. Lopez-Ilasaca, M.; Liu, X.; Tamura, K.; Dzau, V.J. The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Mol. Biol. Cell.* **2003**, *14*, 5038–5050. [CrossRef] [PubMed]
145. Mogi, M.; Iwai, M.; Horiuchi, M. Emerging Concepts of Regulation of Angiotensin II Receptors: New Players and Targets for Traditional Receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 2532–2539. [CrossRef]
146. Tanaka, Y.; Tamura, K.; Koide, Y.; Sakai, M.; Tsurumi, Y.; Noda, Y.; Umemura, M.; Ishigami, T.; Uchino, K.; Kimura, K.; et al. The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 1579–1586. [CrossRef]
147. Guo, D.-F.; Chenier, I.; Tardif, V.; Orlov, S.N.; Inagami, T. Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310*, 1254–1265. [CrossRef]
148. Guo, D.-F.; Chenier, I.; Lavoie, J.L.; Chan, J.S.D.; Hamet, P.; Tremblay, J.; Chen, X.M.; Wang, D.H.; Inagami, T. Development of hypertension and kidney hypertrophy in transgenic mice overexpressing ARAP1 gene in the kidney. *Hypertension* **2006**, *48*, 453–459. [CrossRef]
149. Wruck, C.J.; Funke-Kaiser, H.; Pufe, T.; Kusserow, H.; Menk, M.; Schefe, J.H.; Kruse, M.L.; Stoll, M.; Unger, T. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 57–64. [CrossRef]
150. Reinemund, J.; Seidel, K.; Steckelings, U.M.; Zaade, D.; Klare, S.; Rompe, F.; Katerbaum, M.; Schacherl, J.; Li, Y.; Menk, M.; et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) transcriptionally regulates angiotensin AT2 receptor (AT2R) and AT2R binding protein (ATBP) genes. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 1795–1805. [CrossRef]
151. Senbonmatsu, T.; Saito, T.; Landon, E.J.; Watanabe, O.; Price, E.J.; Roberts, R.L.; Imboden, H.; Fitzgerald, T.G.; Gaffney, F.A.; Inagami, T. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: Possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J.* **2003**, *22*, 6471–6482. [CrossRef]
152. Foulquier, S.; Dupuis, F.; Perrin-Sarrado, C.; Maguin Gaté, K.; Merhi-Soussi, F.; Liminana, P.; Kwan, Y.-W.; Capdeville-Atkinson, C.; Lartaud, I.; Atkinson, J. High salt intake abolishes AT2-mediated vasodilation of pial arterioles in rats. *J. Hypertens.* **2011**, *29*, 1392–1399. [CrossRef]
153. AbdAlla, S.; Lother, H.; Langer, A.; el Faramawy, Y.; Quitterer, U. Factor XIIIA Transglutaminase Crosslinks AT1 Receptor Dimers of Monocytes at the Onset of Atherosclerosis. *Cell* **2004**, *119*, 343–354. [CrossRef]
154. Oro, C.; Qian, H.; Thomas, W.G. Type 1 angiotensin receptor pharmacology: Signaling beyond G proteins. *Pharmacol. Ther.* **2007**, *113*, 210–226. [CrossRef]
155. AbdAlla, S.; Lother, H.; Quitterer, U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **2000**, *407*, 94–98. [CrossRef]
156. Bokslag, A.; van Weissenbruch, M.; Mol, B.W.; de Groot, C.J.M. Preeclampsia; short and long-term consequences for mother and neonate. *Early Hum. Dev.* **2016**, *102*, 47–50. [CrossRef] [PubMed]
157. Quitterer, U.; AbdAlla, S. Pathological AT1R-B2R Protein Aggregation and Preeclampsia. *Cells* **2021**, *10*, 2609. [CrossRef] [PubMed]
158. Kostenis, E.; Milligan, G.; Christopoulos, A.; Sanchez-Ferrer, C.F.; Heringer-Walther, S.; Sexton, P.M.; Gembardt, F.; Kellett, E.; Martini, L.; Vanderheyden, P.; et al. G-Protein–Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circulation* **2005**, *111*, 1806–1813. [CrossRef]
159. Miura, S.; Karnik, S.S.; Saku, K. Constitutively Active Homo-oligomeric Angiotensin II Type 2 Receptor Induces Cell Signaling Independent of Receptor Conformation and Ligand Stimulation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18237–18244. [CrossRef] [PubMed]
160. Porrello, E.R.; Pfleger, K.D.G.; Seeber, R.M.; Qian, H.; Oro, C.; Abogadie, F.; Delbridge, L.M.D.; Thomas, W.G. Heteromerization of angiotensin receptors changes trafficking and arrestin recruitment profiles. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 1767–1776. [CrossRef]
161. Zha, D.; Cheng, H.; Li, W.; Wu, Y.; Li, X.; Zhang, L.; Feng, Y.-H.; Wu, X. High glucose instigates tubulointerstitial injury by stimulating hetero-dimerization of adiponectin and angiotensin II receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 840–846. [CrossRef]

162. Abadir, P.M.; Carey, R.M.; Siragy, H.M. Angiotensin AT_2 Receptors Directly Stimulate Renal Nitric Oxide in Bradykinin B_2-Receptor–Null Mice. *Hypertension* **2003**, *42*, 600–604. [CrossRef]
163. Zhao, Y.; Biermann, T.; Luther, C.; Unger, T.; Culman, J.; Gohlke, P. Contribution of bradykinin and nitric oxide to AT2 receptor-mediated differentiation in PC12 W cells: Angiotensin II and PC12 W cell differentiation. *J. Neurochem.* **2003**, *85*, 759–767. [CrossRef] [PubMed]
164. Patel, S.N.; Ali, Q.; Samuel, P.; Steckelings, U.M.; Hussain, T. Angiotensin II Type 2 Receptor and Receptor Mas Are Colocalized and Functionally Interdependent in Obese Zucker Rat Kidney. *Hypertension* **2017**, *70*, 831–838. [CrossRef] [PubMed]
165. Walters, P.E.; Gaspari, T.A.; Widdop, R.E. Angiotensin-(1–7) Acts as a Vasodepressor Agent Via Angiotensin II Type 2 Receptors in Conscious Rats. *Hypertension* **2005**, *45*, 960–966. [CrossRef]
166. Durand, M.J.; Raffai, G.; Weinberg, B.D.; Lombard, J.H. Angiotensin-(1-7) and low-dose angiotensin II infusion reverse salt-induced endothelial dysfunction via different mechanisms in rat middle cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H1024–H1033. [CrossRef]
167. Roks, A.J.; Nijholt, J.; van Buiten, A.; van Gilst, W.H.; de Zeeuw, D.; Henning, R.H. Low sodium diet inhibits the local counter-regulator effect of angiotensin-(1-7) on angiotensin II. *J. Hypertens.* **2004**, *22*, 2355–2361. [CrossRef]
168. Leonhardt, J.; Villela, D.C.; Teichmann, A.; Münter, L.-M.; Mayer, M.C.; Mardahl, M.; Kirsch, S.; Namsolleck, P.; Lucht, K.; Benz, V.; et al. Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension* **2017**, *69*, 1128–1135. [CrossRef]
169. Lemos, V.S.; Silva, D.M.R.; Walther, T.; Alenina, N.; Bader, M.; Santos, R.A.S. The Endothelium-Dependent Vasodilator Effect of the Nonpeptide Ang(1-7) Mimic AVE 0991 Is Abolished in the Aorta of Mas-Knockout Mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2005**, *46*, 274–279. [CrossRef]
170. AbdAlla, S.; Lother, H.; Abdel-tawab, A.M.; Quitterer, U. The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1Receptor Antagonist. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39721–39726. [CrossRef] [PubMed]
171. Inuzuka, T.; Fujioka, Y.; Tsuda, M.; Fujioka, M.; Satoh, A.O.; Horiuchi, K.; Nishide, S.; Nanbo, A.; Tanaka, S.; Ohba, Y. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. *Sci Rep* **2016**, *6*, 21613. [CrossRef] [PubMed]
172. Rivas-Santisteban, R.; Rodriguez-Perez, A.I.; Muñoz, A.; Reyes-Resina, I.; Labandeira-García, J.L.; Navarro, G.; Franco, R. Angiotensin AT1 and AT2 receptor heteromer expression in the hemilesioned rat model of Parkinson's disease that increases with levodopa-induced dyskinesia. *J. Neuroinflamm.* **2020**, *17*, 243. [CrossRef] [PubMed]
173. Lanctôt, P.M.; Leclerc, P.C.; Escher, E.; Leduc, R.; Guillemette, G. Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. *Biochemistry* **1999**, *38*, 8621–8627. [CrossRef]
174. Lanctot, P.M.; Leclerc, P.C.; Clément, M.; Auger-Messier, M.; Escher, E.; Leduc, R.; Guillemette, G. Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *Biochem. J.* **2005**, *390*, 367–376. [CrossRef] [PubMed]
175. Servant, G.; Dudley, D.T.; Escher, E.; Guillemette, G. The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of N-glycosylation. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 1112–1118.
176. Servant, G.; Dudley, D.T.; Escher, E.; Guillemette, G. 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.* **1996**, *313*, 297–304. [CrossRef] [PubMed]
177. Qian, H. Association of -Arrestin 1 with the Type 1A Angiotensin II Receptor Involves Phosphorylation of the Receptor Carboxyl Terminus and Correlates with Receptor Internalization. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 1706–1719. [CrossRef]
178. Kule, C.E.; Karoor, V.; Day, J.N.E.; Thomas, W.G.; Baker, K.M.; Dinh, D.; Acker, K.A.; Booz, G.W. Agonist-dependent internalization of the angiotensin II type one receptor (AT1): Role of C-terminus phosphorylation in recruitment of β-arrestins. *Regul. Pept.* **2004**, *120*, 141–148. [CrossRef]
179. Chen, K.; Fu, C.; Chen, C.; Jose, P.A.; Zeng, C. Role of GRK4 in the Regulation of Arterial AT1 Receptor in Hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* **2016**, *10*, e3. [CrossRef]
180. Olivares-Reyes, J.A.; Smith, R.D.; Hunyady, L.; Shah, B.H.; Catt, K.J. Agonist-induced Signaling, Desensitization, and Internalization of a Phosphorylation-deficient AT1A Angiotensin Receptor. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37761–37768. [CrossRef]
181. Zhang, F.; Lei, L.; Huang, J.; Wang, W.; Su, Q.; Yan, H.; Chen, C.; Zheng, S.; Ren, H.; Li, Z.; et al. G-protein-coupled receptor kinase 4 causes renal angiotensin II type 2 receptor dysfunction by increasing its phosphorylation. *Clin. Sci.* **2022**, *136*, 989–1003. [CrossRef] [PubMed]
182. Leclerc, P.C.; Lanctot, P.M.; Auger-Messier, M.; Escher, E.; Leduc, R.; Guillemette, G. *S*-nitrosylation of cysteine 289 of the AT_1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II: *S* -nitrosylation of the AT_1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 306–313. [CrossRef] [PubMed]
183. Jang, J.H.; Chun, J.N.; Godo, S.; Wu, G.; Shimokawa, H.; Jin, C.Z.; Jeon, J.H.; Kim, S.J.; Jin, Z.H.; Zhang, Y.H. 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. [CrossRef]
184. Sica, D.A.; Gehr, T.W.B.; Ghosh, S. Clinical Pharmacokinetics of Losartan. *Clin. Pharmacokinet.* **2005**, *44*, 797–814. [CrossRef]
185. Barber, M.N.; Sampey, D.B.; Widdop, R.E. AT_2 Receptor Stimulation Enhances Antihypertensive Effect of AT_1 Receptor Antagonist in Hypertensive Rats. *Hypertension* **1999**, *34*, 1112–1116. [CrossRef]

186. Ewert, S.; Laesser, M.; Johansson, B.; Holm, M.; Aneman, A.; Fandriks, L. The angiotensin II receptor type 2 agonist CGP 42112A stimulates NO production in the porcine jejunal mucosa. *BMC Pharmacol.* **2003**, *3*, 2. [CrossRef] [PubMed]
187. Wan, Y.; Wallinder, C.; Plouffe, B.; Beaudry, H.; Mahalingam, A.K.; Wu, X.; Johansson, B.; Holm, M.; Botoros, M.; Karlén, A.; et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of the First Selective Nonpeptide AT_2 Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5995–6008. [CrossRef]
188. Carey, R. Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *Am. J. Hypertens.* **2001**, *14*, S98–S102. [CrossRef]
189. Sumners, C.; de Kloet, A.D.; Krause, E.G.; Unger, T.; Steckelings, U.M. Angiotensin type 2 receptors: Blood pressure regulation and end organ damage. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2015**, *21*, 115–121. [CrossRef]
190. Zizzo, M.G.; Caldara, G.; Bellanca, A.; Nuzzo, D.; Di Carlo, M.; Serio, R. PD123319, angiotensin II type II receptor antagonist, inhibits oxidative stress and inflammation in 2, 4-dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rat and ameliorates colonic contractility. *Inflammopharmacology* **2020**, *28*, 187–199. [CrossRef]
191. Wagenaar, G.T.M.; Sengers, R.M.A.; Laghmani, E.H.; Chen, X.; Lindeboom, M.P.H.A.; Roks, A.J.M.; Folkerts, G.; Walther, F.J. Angiotensin II type 2 receptor ligand PD123319 attenuates hyperoxia-induced lung and heart injury at a low dose in newborn rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2014**, *307*, L261–L272. [CrossRef] [PubMed]
192. Dupuis, F.; Vincent, J.-M.; Limiñana, P.; Chillon, J.-M.; 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. [CrossRef] [PubMed]
193. Budzyn, K.; Sobey, C.G.; Drummond, G.R. 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. [CrossRef] [PubMed]
194. Bosnyak, S.; Jones, E.S.; Christopoulos, A.; Aguilar, M.-I.; Thomas, W.G.; Widdop, R.E. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin. Sci.* **2011**, *121*, 297–303. [CrossRef]
195. Teixeira, L.B.; Parreiras-e-Silva, L.T.; Bruder-Nascimento, T.; Duarte, D.A.; Simões, S.C.; Costa, R.M.; Rodríguez, D.Y.; Ferreira, P.A.B.; Silva, C.A.A.; Abrao, E.P.; et al. Ang-(1-7) is an endogenous β-arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11903. [CrossRef]
196. Wei, H.; Ahn, S.; Shenoy, S.K.; Karnik, S.S.; Hunyady, L.; Luttrell, L.M.; Lefkowitz, R.J. Independent β-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10782–10787. [CrossRef]
197. Violin, J.D.; DeWire, S.M.; Yamashita, D.; Rominger, D.H.; Nguyen, L.; Schiller, K.; Whalen, E.J.; Gowen, M.; Lark, M.W. Selectively engaging β-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *335*, 572–579. [CrossRef] [PubMed]
198. Timmermans, P.B.; Carini, D.J.; Chiu, A.T.; Duncia, J.V.; Price, W.A.J.; Wells, G.J.; Wong, P.C.; Johnson, A.L.; Wexler, R.R. The discovery of a new class of highly specific nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Am. J. Hypertens.* **1991**, *4*, 275S–281S. [CrossRef]
199. Vanderheyden, P.M.L.; Fierens, F.L.P.; De Backer, J.P.; Fraeyman, N.; Vauquelin, G. Distinction between surmountable and insurmountable selective AT_1 receptor antagonists by use of CHO-K1 cells expressing human angiotensin II AT_1 receptors: Insurmountable antagonism of candesartan. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 1057–1065. [CrossRef]
200. De Gasparo, M.; Whitebread, S. Binding of valsartan to mammalian angiotensin AT1 receptors. *Regul. Pept.* **1995**, *59*, 303–311. [CrossRef]
201. McClellan, K.J.; Markham, A. Telmisartan. *Drugs* **1998**, *56*, 1039–1044; discussion 1045–1046. [CrossRef]
202. Dudley, D.T.; Summerfelt, R.M. Regulated expression of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells. *Regul. Pept.* **1993**, *44*, 199–206. [CrossRef] [PubMed]
203. Cui, Y.; Kassmann, M.; Nickel, S.; Zhang, C.; Alenina, N.; Anistan, Y.M.; Schleifenbaum, J.; Bader, M.; Welsh, D.G.; Huang, Y.; et al. Myogenic Vasoconstriction Requires Canonical $G_{q/11}$ Signaling of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *J. Am. Heart Assoc.* **2022**, *11*, e022070. [CrossRef]
204. Jean-Charles, P.-Y.; Kaur, S.; Shenoy, S.K. G Protein–Coupled Receptor Signaling Through β-Arrestin–Dependent Mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2017**, *70*, 142–158. [CrossRef] [PubMed]
205. Ma, Z.; Viswanathan, G.; Sellig, M.; Jassal, C.; Choi, I.; Garikipati, A.; Xiong, X.; Nazo, N.; Rajagopal, S. β-Arrestin–Mediated Angiotensin II Type 1 Receptor Activation Promotes Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension. *JACC Basic Transl. Sci.* **2021**, *6*, 854–869. [CrossRef] [PubMed]
206. Boerrigter, G.; Soergel, D.G.; Lark, M.W.; Burnett, J.C. TRV120027, a Novel Beta-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. *J. Card. Fail.* **2011**, *17*, S63–S64. [CrossRef]
207. Kanki, H.; Sasaki, T.; Matsumura, S.; Yokawa, S.; Yukami, T.; Shimamura, M.; Sakaguchi, M.; Furuno, T.; Suzuki, T.; Mochizuki, H. β-arrestin-2 in PAR-1-biased signaling has a crucial role in endothelial function via PDGF-β in stroke. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 100. [CrossRef]

208. Bouressam, M.; Lecat, S.; Raoul, A.; Gaucher, C.; Perrin-Sarrado, C.; Lartaud, I.; Dupuis, F. *S*-nitrosoglutathione inhibits cerebrovascular angiotensin II-dependent and -independent AT_1 receptor responses: A possible role of *S*-nitrosation. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 2049–2062. [CrossRef]
209. Pinheiro, L.C.; Oliveira-Paula, G.H.; Ferreira, G.C.; Dal-Cin de Paula, T.; Duarte, D.A.; Costa-Neto, C.M.; Tanus-Santos, J.E. Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II. *Redox Biol.* **2021**, *38*, 101769. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Synthesis and pharmacological characterization of fluorescent ligands targeting the angiotensin II receptors derived from agonist, β-arrestin-biased agonist and antagonist.

Céline Delaitre,[1,2] Michel Boisbrun,[3] Samir Acherar,[4] André Dias,[5] Alexandra Kleinclauss,[1] Mathilde Achard,[4] Mélissa Colin,[1] Trung Minh Nguyen,[3] Karen L. Martinez,[5] Sandra Lecat,[2]* François Dupuis.[1]*

[1]Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France; [2]BSC UMR7242 "GPCRs, pain and inflammation" team, CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch, France; [3]Université de Lorraine, CNRS, L2CM, F-54000 Nancy, France; [4]Université de Lorraine, CNRS, LCPM, F-54000 Nancy, France; [5]Department of Chemistry and Nano-Science Center, University of Copenhagen, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg, Denmark;

*co-authors and co-corresponding authors

KEYWORDS: Angiotensin II – biased agonist – fluorescent ligands – AT1 receptor.

ABSTRACT: Angiotensin II (AngII) regulates cerebral circulation and binds with a similar affinity to AT_1 and AT_2 receptors. Biased AT_1 agonists, such as TRV027, able to selectively activate β-arrestin while blocking G_q pathway, appears promising as new therapeutics. New pharmacological tools are needed to further explore biased AT_1 agonists impact on cells or tissues, such as the cerebral circulation. We designed and synthesized new fluorescent derivatives based on AngII, TRV027 or the AT_1 antagonist losartan. We conducted pharmacological characterization to determine their selectivity, potency and ability to activate or not specific AT_1 transduction pathways in cells and cerebral arteries. We report the first highly AT_1-selective ligand, based on losartan, that keeps its antagonist activity with high affinity. Fluorescent derivatives of TRV027 become AT_2-selective at low concentration and lose their AT_1 β-arrestin bias at high concentration. These new ligands can be applied to trace AT_1 or AT_2 *in vitro* and *ex vivo*.

INTRODUCTION

The angiotensin II receptors (AT receptors) belong to the class A of the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily, a protein family targeted by one-third of the currently marketed drugs.[1] The angiotensin II (AngII) peptide agonist targets two AT receptors, AT_1 and AT_2, with the same affinity but with opposing effects.[2] By activating AT_1, AngII triggers most of the known physiological effects of the renin-angiotensin system, such as vasoconstriction, cardiovascular remodeling, fibrosis, water and sodium retention, and aldosterone release by the adrenal glands,[3–5] whereas AT_2 activation produces vasodilatation, apoptosis and antiproliferative effects.[6,7] The vasoconstriction induced by AT_1 occurs *via* the activation of the $G_{q/11}$ signaling pathway. In addition, AT_1 activation induces β-arrestin recruitment, leading to its internalization[8] and to alternative signaling pathways, the latter being expected to have potential beneficial effects in pathophysiological conditions.[9] Much less is known about AT_2 signaling, as this receptor does not seem to activate any heterotrimeric G protein, neither recruit β-arrestins, nor get internalized upon ligand binding in heterologous expression cell system.[10]

Overactivation of the renin angiotensin system and the consecutive AT_1 overstimulation are involved in many cardiovascular pathophysiological processes including cerebrovascular diseases such as strokes, subarachnoid aneurysms and traumatic brain injury.[11] This system is therefore considered as a therapeutic target of choice for both cardiac and cerebrovascular pathologies and several families of compounds, such as Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors or AT_1 receptor antagonists (angiotensin receptors blockers, ARBs, such as losartan), are commonly used as first line therapies in many cardiovascular diseases.[12] However, despite their acknowledged benefits for stroke primary prevention,[13] their use in the acute / post-acute phases of stroke displayed more mixed results.[14] This limitation as a curative treatment, despite numerous encouraging preclinical data, emphasizes the need to further study alternative therapeutic pathways targeting AT_1.

Interestingly, novel AT_1 receptor ligands have shown biased agonist properties towards β-arrestin. Some of these ligands, such as TRV027, have even been reported to be strict β-arrestin biased agonist, completely devoid of any $G_{q/11}$ stimulation. These strict biased β-arrestin-agonists stabilize an alternative active conformation of the AT_1 receptor and appear promising as cardiovascular therapeutics in several studies.[15,16] Their potential in cerebrovascular diseases remains to be explored in preventive and curative pre-clinical models. It is important to note that although TRV027 biased β-arrestin-agonist showed similar affinities for both AT_1 and AT_2 receptors when it was first reported,[17] its impact on AT_2 signaling has not been characterized yet.

Assessing the interest of these new compounds in cerebrovascular diseases requires an understanding of how they activate the different pathways consecutive to AT_1

and/or AT_2 stimulation and to track these receptors in cerebrovascular tissues *ex vivo* or *in vivo*. To study the cellular distribution, localization, and pharmacology of AT_1 and AT_2 receptors, several tracers have been previously used, including radiolabeled-ligands and antibodies. The specificity of anti-AT_1 receptor antibodies has been seriously called into question,[18,19] although a recent anti-AT_1 seems promising.[20,21] As an alternative, there is an increasing interest in fluorescently-labeled ligands because the same probe can be applied in a growing number of *in vitro* techniques. Indeed, fluorescent ligands allow to monitor internalization of their untagged or even endogenously expressed receptors by imaging techniques. This application will be soon extended to *in vivo* approaches due to the continuous development of sensitive microscopy technologies and the optimization of fluorophores.[22,23] Fluorescent ligands can also be used in living cells as tracers in receptor/ligand binding experiments both in equilibrium assays, for example for compound library screening of new ligands, or in ligand-binding kinetic studies.[23–28] However, the fluorophore grafting on a given ligand can change its affinity, selectivity and/or activity.

With regards to AT_1 and AT_2 receptors, commercially fluorescent probes have been developed by linking the AngII peptide to fluorescein,[29] to BODIPY or TAMRA.[30] TAMRA-AngII is currently used as a tracer in cellular pharmacological studies,[10,,26,31–33] although it has not been fully pharmacologically characterized yet. In particular, the ability of the fluorescent AngII to distinguish between the two active conformations of the AT_1 receptor (the canonical conformation triggering both G_q and β-arrestin activations and the alternative active conformation only recruiting β-arrestins) has not been investigated, whereas it should be assessed before any interpretation of experiments can be made.

In the present study, we report the synthesis and pharmacological evaluation of cyanine 3 (Cy3)-labeled AT receptors ligands derived from the AngII agonist, the TRV027 β-arrestin-biased agonist and the AT_1 selective antagonist losartan as compared to their non-fluorescent counterparts. We included TAMRA-AngII as a fluorescent ligand of reference and took the opportunity to complete its pharmacological characterization. We assessed the selectivity of these ligands between AT_1 and AT_2 receptors, their ability to activate AT_1 G_q and β-arrestin pathways and their potential as tracers for these receptors *in vitro* and *ex vivo*.

RESULTS AND DISCUSSION

Design and Synthesis of the fluorescent peptidic ligands derived from AngII and TRV027

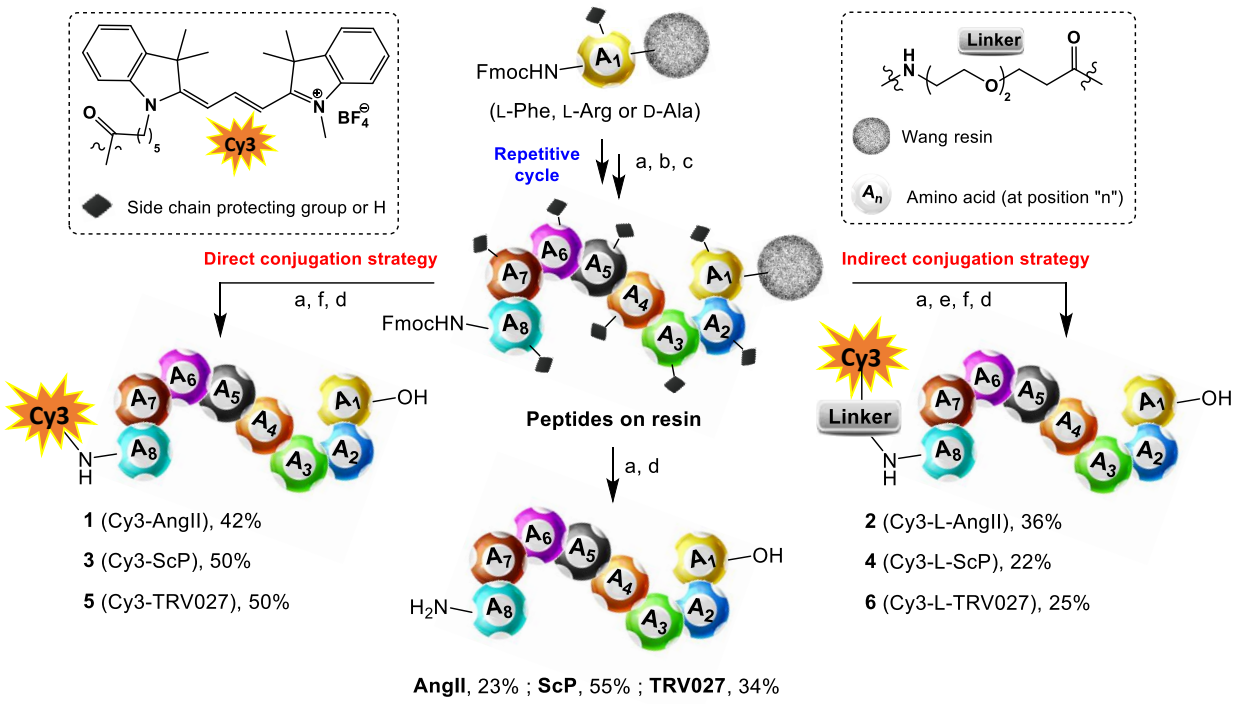
Cy3 was chosen as a small fluorophore with photostability and size similar to TAMRA, but with a different chemical structure and better fluorescent properties. According to the manufactured product sheets, Cy3 appears to have better brilliance (extinction coefficient ε: 150000 $cm^{-1}.M^{-1}$; quantum yield: 0.31) than TAMRA (extinction coefficient ε: 84000 $cm^{-1}.M^{-1}$; quantum yield: 0.10). We decided to conjugate Cy3 at the *N*-terminal extremity of AngII (DRVYIHPF sequence), as the *C*-terminal part of the peptide is involved in the major recognition pattern with the receptor.[11] Besides, commercial TAMRA-AngII seems to be a direct conjugation of TAMRA on the *N*-terminal extremity of AngII without a spacer. A control peptidic-based probe (Scramble Peptide, ScP) was designed by scrambling the AngII amino-acid sequence (YFHPDVIR sequence that does not correspond to any known ligand).

First, direct and indirect conjugation strategies (*i.e.*, conjugation without or with a spacer) were investigated to study the possible steric hindrance interference of the fluorophore with the peptide target recognition. As a spacer, we chose a polar ethylenedioxy-derived structure (PEG-like derivative) since such kind of moieties already gave good results in terms of improving hydrophilicity and minimizing a possible loss of affinity.[34] Thus, commercial Fmoc-*N*-amido-PEG_2-COOH spacer was chosen. The synthesis of the peptides (AngII and ScP), and of the resulting fluorescent probes **1**-**4** was made using an automated Fmoc/*t*Bu solid phase peptide synthesis (SPPS) on 4-benzyloxybenzyl alcohol (Wang) resin (**Scheme 1**). As a first step, Fmoc-AngII-Wang resin and Fmoc-ScP-Wang resin with protected lateral chains were synthesized. These peptides on resin, gave access to i) AngII and ScP, ii) the agonist-based probes **1** and its corresponding negative control analogue **3** (both without linker) by direct fluorophore conjugation, and iii) the agonist-based probes **2** and its corresponding negative control analogue **4** (both with linker) *via* an indirect fluorophore conjugation (*i.e.*, linker conjugation prior to the fluorophore conjugation). The AngII and ScP peptides and the resulted probes **1**-**4** were obtained, after a final peptide cleavage reaction, in 23-55% overall yield, with an LC-MS purity of >95% except **2** (Cy3-L-AngII 94%) and **3** (Cy3-ScP 92%) (**see Supporting Information, Figures S1 to S24, Table S1 and S2**).

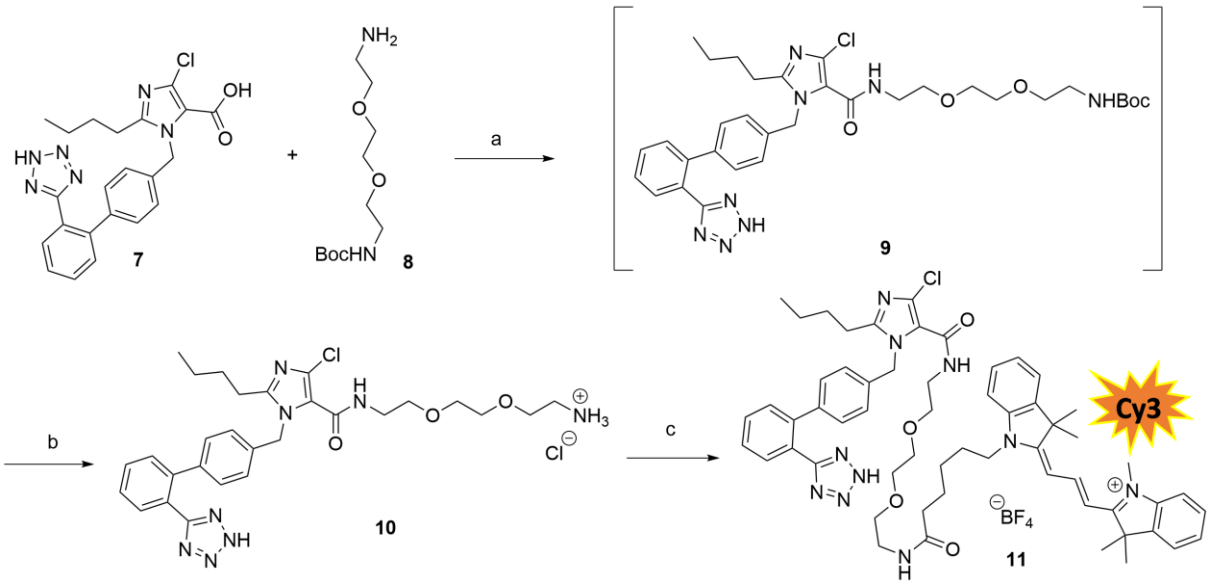
The probes **5**-**6** based on the β-arrestin biased agonist TRV027 peptide (Sar-RVYIHPa sequence) with and without spacer were also prepared using strictly the same previous strategies (*i.e.*, direct and indirect conjugation strategies). As depicted in Scheme 1, the TRV027 peptide and fluorescent TRV027-based probes **5**-**6** were obtained in 25-50% overall yield, with an LC-MS purity of 97% and 93%, respectively (**see Supporting Information, Figures S25 to S36, Table S1 and S3**).

Design and Synthesis of the fluorescent ligand derived from ARB

Since no fluorescently-labeled AT_1 antagonist has been described so far, we decided to link a specific, selective, and clinically-used antagonist to Cy3. Losartan was chosen as an antagonist since we already reported that it can be conjugated to diverse chemical structures without major loss of receptor affinity.[35] Once again, in order to keep its affinity towards AT_1, we intended to separate both parts by an adequate spacer. In a previous study, we noticed that linking losartan to an apolar hydrocarbon chain afforded the less active of our compounds.[35] Therefore, as for the peptidic series, we used a polar ethylenedioxy-derived structure. As depicted in **Scheme 2**, we prepared the carboxylic acid-derived losartan **7**,[34,36] permitting its linkage to monoprotected 2,2'-ethylenedioxybis(ethylamine) **8**.[37] Classical coupling conditions afforded intermediate **9** which was



Scheme 1: Synthesis of AngII, ScP and TRV027 peptides, agonist-based probes 1-2, negative control agonist-based probes 3-4, and biased agonist-based probes 5-6. Reagents and conditions: (a) Fmoc deprotection: Piperidine, DMF, rt, 12 min (3 times); (b) Coupling reaction: Fmoc-AA-OH, HBTU, NMP, NMM, DMF, rt, 18 min (2 or 3 times); (c) Capping: Ac_2O, DMF, rt, 5 min; (d) Peptide cleavage: TFA, TIPS, water, rt, 2 h; (e) Linker conjugation: Fmoc-*N*-amido-PEG_2-COOH, HBTU, NMP, NMM, DMF, rt, 2 hours (2 times); (f) Cy3 conjugation: Cy3 NHS ester, DIPEA, DMF, rt, 2 hours (2 times).



Scheme 2: Synthesis of antagonist-based probe 11. Reagents and conditions: (a) EDC, HOBt, DIPEA, CH_2Cl_2, rt., 2 h; (b) 1M HCl in EtOAc, CH_2Cl_2, rt., 4 h, 40% over two steps; (c) Cy3 NHS ester, TEA, DMF, rt., 24 h, 75%.

subsequently deprotected to give pure compound **10**. It must be noted that Boc removal by trifluoroacetic acid (TFA) induced a complete decomposition of **9**. Alternatively, treatment of a CH_2Cl_2 solution of this compound with gaseous HCl afforded a smooth deprotection and **10** was recovered from the medium by precipitation in 40% yield over two steps. Simple decantation and washings gave high purity.

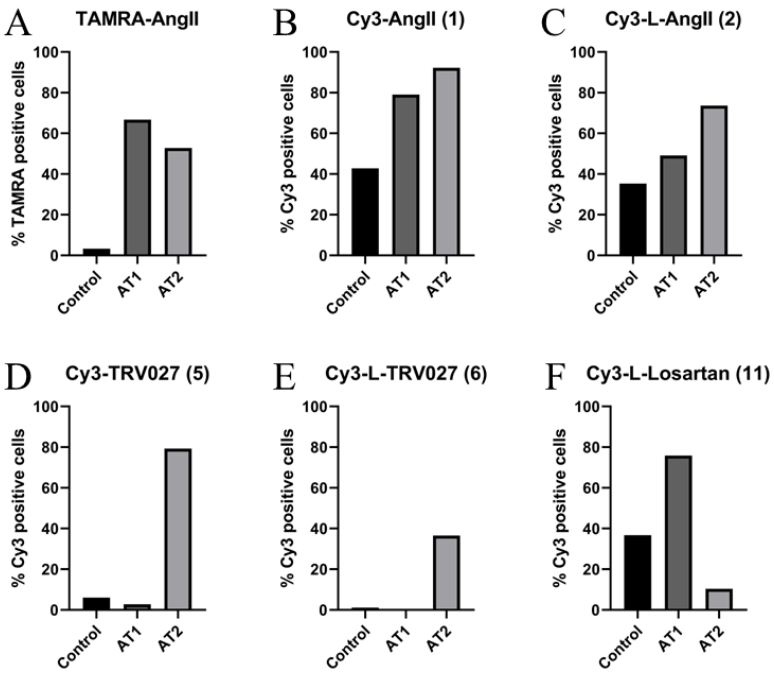


Figure 1: Representative image of selectivity of the new fluorescent ligands on cells overexpressing or not AT_1 or AT_2 receptors. Measurement of cell labeling with TAMRA-AngII or Cy3 derived ligands by flow cytometry on a population of HEK 293 cells (Control), or cells overexpressing Flag-AT_1 receptor (AT_1) or cells overexpressing GFP-AT_2 receptor (AT_2). The cells were treated for 15 min at 37°C in HEPES buffer (no BSA), with 300 nM of TAMRA-Ang II (A), 300 nM of Cy3-AngII (**1**) (B), 300 nM of Cy3-L-AngII (**2**) (C), 100 nM of Cy3-TRV027 (**5**) (D), 100 nM of Cy3-L-TRV027 (**6**) (E) or 30nM of Cy3-L-Losartan (**11**) (F) then rinsed on ice before analysis with cytometer. The percentage of fluorescently labeled cells was determined after excitation with laser (561 nm) and the emission filter (586/15), detecting TAMRA or Cy3 fluorescence. Representative results from 3 separate experiments. (Kaluza 2.2.1)

Finally, coupling of **10** with commercial NHS ester of Cy3 afforded the desired antagonist-based probe Cy3-L-Losartan **11** in 75% yield and pure form (>99% **see Supporting Information, Figures S37 to S47)**.

Fluorescent ligands interactions with AT_1 and AT_2 receptors

Selectivity between AT_1 and AT_2 assessed by flow cytometry

Assessing AT_1 versus AT_2 receptors selectivity of the fluorescent probes represents one of the main objectives of this paper, as this will determine their potential use as tracers on different tissues and animal models endogenously expressing these receptors. Ligand selectivity was first measured by flow cytometry on HEK 293 cell stably overexpressing AT_1 or AT_2 at similar levels and on parental HEK 293 cells that do not express AT receptors as negative control (**Figure 1 and see Supporting Information, Figure S52**).

The fluorescent ligands based on ScP (**3**-**4**) did not induce any specific labeling on cells overexpressing AT_1 or AT_2 (**see Supporting Information, Figure S48**). For the same concentration of TAMRA-AngII, AT_1 and AT_2 expressing cells were fluorescently labelled to the same extent (around 50%) with almost no fluorescent background on negative control cells (**Figure 1A)**.

At 300 nM, the fluorescent probes of AngII coupled to Cy3 (**1**-**2**) could bind specifically to AT_1 or AT_2 expressing cells as compared with HEK 293 parental cells (**Figure 1B, C**). There were no significant differences of binding between the fluorescent ligands with or without the linker (**Figure 1B, C**). The TAMRA-AngII fluorescent ligand showed a lower non-specific fluorescent signal than the Cy3-AngII fluorescent ligands (**1**-**2**) on HEK 293 parental cells. Thus, the presence of a fluorophore (Cy3 or TAMRA) with or without a linker does not alter AngII specific binding, as Cy3-AngII (**1**), Cy3-L-Ang II (**2**) and TAMRA-AngII could bind to both angiotensin receptors. Interestingly, TAMRA-AngII has been previously used for semi-quantification of AT_1 by fluorescence staining on muscle tissues.[21] Even if the authors included a control with losartan (loss of staining using high concentration of losartan), this remains questionable, as our data suggests that AT_2 would also require to be saturated (with a selective agonist or antagonist) to prevent misinterpretation.

Surprisingly, Cy3-TRV027 tracers (**5**-**6**) (without or with linker) were selective for AT_2 over AT_1 expressing cells at 100 nM (**Figure 1D, E**). The presence of the linker induced a decrease in AT_2 expressing cells labeling but Cy3-L-TRV027 (**6**) remained selective for AT_2 (**Figure 1E**). TRV027 peptide was described as having nanomolar affinity for both AT_1 and AT_2 (Ki of 12 nM and 7 nM, respectively).[17] Thus, the addition of the fluorophore seems to modify the binding properties of this peptide in favor of AT_2 while the linker seems to mitigate this effect. To our knowledge, these are the first described selective

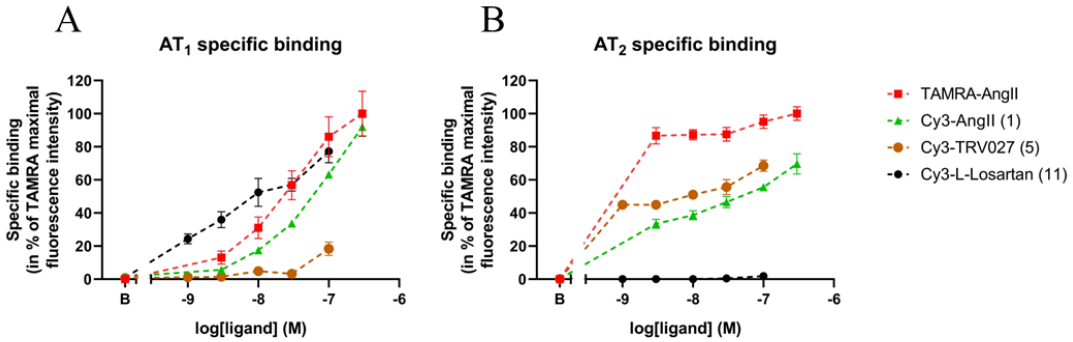


Figure 2: Specific binding of new fluorescent ligands on AT_1 or AT_2 receptors determined by flow cytometry. Measurement of cell surface labeling of Cyanine 3 or TAMRA by flow cytometry on a population of HEK 293 cells, a population of HEK 293 cells overexpressing Flag-AT_1 receptor (A) and a population overexpressing GFP-AT_2 receptor (B). The cells were treated for 15 minutes at 37°C in HEPES buffer (0.2% BSA) with increasing concentrations of TAMRA-Ang II, Cy3-AngII (**1**), Cy3-TRV027 (**5**) or Cy3-L-Losartan (**11**) then rinsed before reading with the cytometer. The Cy3 and TAMRA median fluorescence intensity of the cell populations were determined after excitation with the laser (561 nm) and the emission filter (586/15), detecting TAMRA or Cy3 fluorescence. The specific binding corresponds to the total binding subtracted from the non-specific labeling on HEK 293 parental cells of the ligand at the same concentration. Graphs shown are representative of n = 3 separate experiments. Each data point represents mean values ± SEM (Kaluza 2.2.1)

fluorescent ligands for AT_2 vs AT_1.

Cy3-L-Losartan (**11**) had selectivity towards AT_1 expressing cells, just like native Losartan and specific binding could be detected at 30 nM (**Figure 1F**) This selective ligand could thus be very useful to independently and directly trace the AT_1 receptor, without the need to saturate the AT_2 receptor.

We tried to determine the affinities of the best fluorescent ligands for their receptors by flow cytometry. For both AT_1 or AT_2 overexpressing cells, increases in the percentage of fluorescently-labeled cells and in the median red fluorescence intensity of the cell population were observed as a function of increasing ligand concentrations (**see Supporting Information, Figure S53**). Specific binding of the fluorescent ligands could be detected (**Figure 2**), with Cy3-L-Losartan being the best fluorescent ligand to detect AT_1 at low concentration (1 nM **Figure 2A**) and in a selective manner (**Figure 2A, B**) and inversely Cy3-TRV027 being a selective AT_2 fluorescent ligand already at low concentration (1 nM **Figure 2B** as compared with **Figure 2A**).

Determination of the K_D of Cy3-L-Losartan for AT_1 at the plasma membrane by quantitative fluorescence confocal microscopy

Since the high non-specific signal for ligand concentrations above 100 nM did not allow its accurate determination using flow cytometry, we chose confocal fluorescence microscopy to determine the affinity of Cy3-L-Losartan (**11**) for AT_1, using HEK293 cells transiently expressing GFP-AT_1 or GFP-AT_2, as a negative control.

We measured the fluorescence intensities of GFP-tagged receptors and of Cy3-L-Losartan directly at the cell membrane. This allowed us to discard the non-specific signal of the fluorescent ligand inside the cell. We applied a method we recently established for high-throughput analysis of the images taken at optical resolution to generate datasets representing more than 1,000 individual measurements of cell membrane segments per condition (**see Supporting Information, Figure S54** for representative confocal images). Each of the fluorescence intensities corresponded to the average density of receptors present and ligands bound in a plasma membrane segment of around 200 nm.[38] Non-specific binding of Cy3-L-losartan at the plasma membrane (NSB) was detected in presence of a large excess of non-fluorescent losartan (10 µM). After quantitative analysis of the images, the total and non-specific binding (NSB) curves of Cy3-L-Losartan at the plasma membrane confirmed that Cy3-L-Losartan (**11**) did not bind to GFP-AT_2 (**Figure 3A**). The global fits of the Cy3-L-Losartan binding curves obtained in the case of GFP-AT_1 revealed an approximative K_D of 29.7nM, the accuracy of the fit being limited due to the high non-specific signal for concentration above 100 nM (**Figure 3B**).

The large datasets obtained by the image analysis method provided additional information as it gave access to quantitative analysis beyond single cell resolution and revealed signals variations along the cell membrane (both for receptors and bound ligands) between cells and within a cell. As previously done in the case of another GPCR,[38] the statistical analysis of this dataset was exploited to study the specific interaction between Cy3-L-Losartan and GFP-AT_1 for 18 ranges of GFP-AT_1 receptor expression levels that are up to 20 times more homogenous than the initial cell sample (**Figure 3C**). The global fits of each of the binding curves established revealed significant changes of affinity depending on receptor expression levels, with a better affinity of Cy3-L-Losartan for AT_1 when present at high density (**Figure 3D**).

These results provide valuable insights for future applications of Cy3-L-Losartan, which will enable the specific study of AT_1. It shows that the ligand can be used for ligand binding assays (saturation and competition). Having access to a fluorescently labeled antagonist has several advantages compared to fluorescent agonists (like the

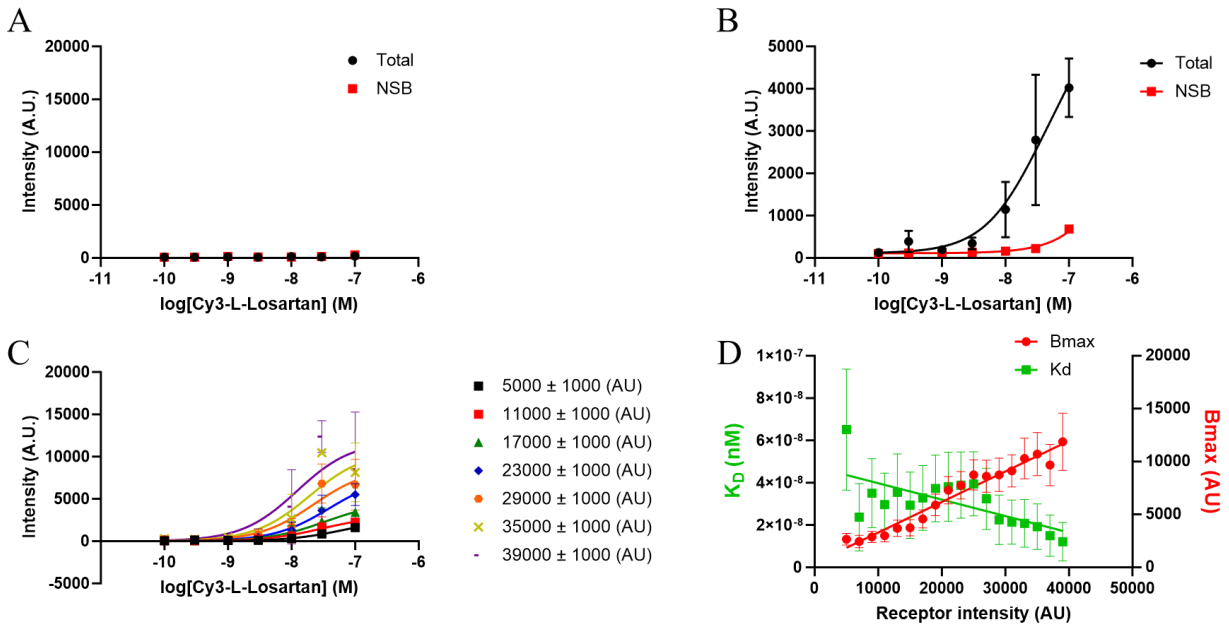


Figure 3: Measurement of Cy3-L-Losartan (11) binding to GFP-AT$_1$ and GFP-AT$_2$ receptors by confocal fluorescence microscopy. Total ligand binding was performed in HEPES buffer (0.2% BSA) at 20°C for 15 min before cell fixation and nonspecific binding (NSB) was assessed after 15 min pretreatment at 37°C with an excess of non-fluorescent losartan (10^{-5} M). (A) Independent measurements of total and nonspecific binding (NSB) at the membrane of HEK 293 cells transiently overexpressing GFP-AT$_2$ receptor showing that there is no specific binding of Cy3-L-Losartan (**11**). (B) Independent measurements of total and nonspecific binding (NSB) at the membrane of HEK 293 cells transiently overexpressing GFP-AT$_1$ receptor showing that there is specific binding of Cy3-L-Losartan (**11**). Error bars correspond to SEM among 3 independent samples. Plain lines show the results of the global fit (R^2=0.92) with K_D of 29.7 ± 89.2nM. (C) Saturation binding curves of Cy3-L-Losartan (**11**) to GFP-AT$_1$ receptor for homogenous receptor expression ranges. Error bars correspond to SEM among 3 independent samples. Plain lines correspond to the fits considering only specific binding. (D) Results of the fitted curves in C, with K_D and B_{max} for 18 ranges of GFP-AT$_1$ receptor expression levels. A/B/C, AU: Cy3 fluorescence intensity in arbitrary units; D, AU: GFP receptor intensity in arbitrary units and B_{max} Cy3 intensity in arbitrary units. The plain lines correspond to a linear fit showing the tendency of both K_D and B_{max}. Statistical comparison of the slope confirms that the K_D is dependent on the expression level (****, p<0.0091)

commercially available TAMRA-AngII), such as access to information about the constitutive activity of AT$_1$. The study of this constitutive activity is hindered by its low intensity and is mainly based on engineered constitutively active mutants of AT$_1$.[39] By blocking AT$_1$ signaling, our fluorescent probe could help determining the mechanisms involved in more physiologically relevant conditions. In the same idea, our probe could help deciphering the involvement of AT$_1$ in the setting of myogenic tone, another situation which does not require ligand binding to activate AT$_1$ signaling pathways.[40] One can also anticipate that this fluorescent ligand will be compatible with assays done on membrane fragments and on isolated receptors (detergent, stabilized in nanodiscs, SMALPs, amphipols, etc.).[41] In addition to the affinity, information regarding NSB at the membrane and inside the cell depending on the concentrations is very valuable to determine optimum conditions for *ex vivo* studies.

Functional responses on AT$_1$ receptor: Activation of the G$_q$ pathway

In vitro *experiments: calcium mobilization and G$_q$ recruitment*

The intracellular calcium response induced by the binding of increasing concentrations of the different fluorescent ligands to cells stably overexpressing Flag-AT$_1$ receptors were investigated (**Figure 4**).

The EC$_{50}$ of calcium responses were similar between TAMRA-AngII and Cy3-AngII with or without linker (**1**-**2**). These probes appeared as full agonists for AT$_1$ with an E_{max} similar to AngII, but their EC$_{50}$ values (around 100 nM) were two logs higher than that of non-fluorescent AngII (**Table 1**). In addition, *via* bioluminescence resonance energy transfer (BRET), we could decipher the direct interaction between AT$_1$ fused on its intracellular *C*-terminus to the nanoluciferase (NLuc) and the mini-G$_q$ protein fluorescently labeled with the Venus fluorophore[42] (**Figure 4**). An increase in the AngII modulated BRET signal indicating recruitment of the mini-G$_q$ protein after activation of AT$_1$ was observed in a dose dependent manner (**Figure 4**). The EC$_{50}$ of BRET signal of the AngII was of the order of the nanomolar. Both fluorescent probes based on AngII (**1**-**2**) also produced an increase in BRET signal illustrating the recruitment of the mini-G$_q$ protein (**Figure 4B**). A limitation of the BRET technique using the Cy3 and TAMRA fluorescent probes occurred at 10 µM concentration onwards which induced an artifactual decrease in the BRET signal. We found that this decrease was due to a direct quenching of the fluorescence of the acceptor fluorophore

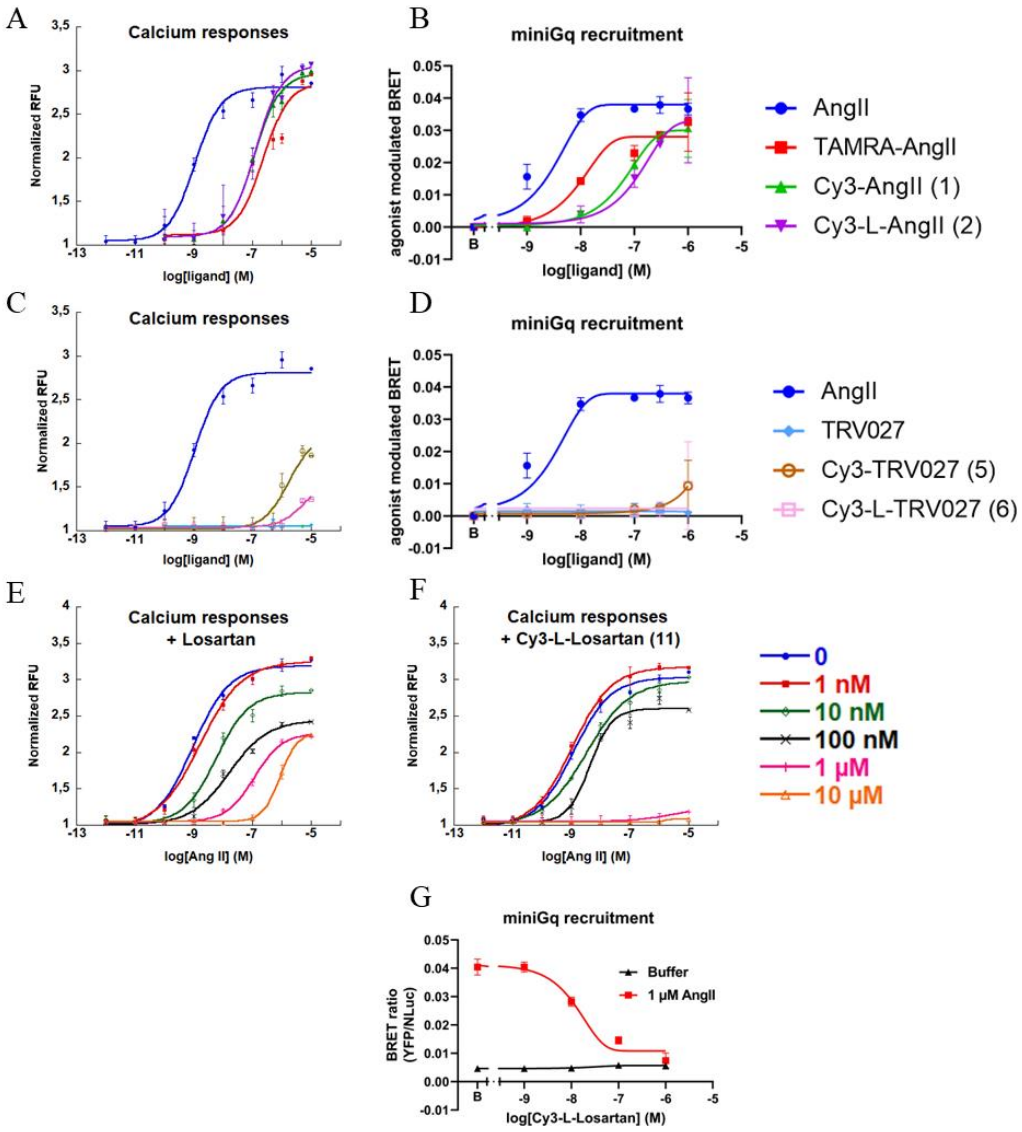


Figure 4: Effects of the new fluorescent ligands on the G_q pathway in cells expressing AT_1 receptor. Calcium responses of the cells were recorded at 25°C in HEPES buffer (no BSA). Curves of the peaks of the calcium responses as a function of increasing concentrations of AngII and its fluorescent derivatives (**1**-**2**) (A) or TRV027 and its fluorescent derivatives (**5**-**6**) (C) measured in HEK 293 cells stably overexpressing AT_1 receptor. Effects of increasing concentrations of the antagonists Losartan (E) or Cy3-L-Losartan (**11**) (F) on the calcium dose/responses of AngII. Graphs shown are representative of n = 7 (AngII), n = 4 (Cy3-AngII), or n = 3 separate experiments. Each data point represents mean values ± SEM (KaleidaGraph 4.0). (B/D/G) Recruitment of G_q protein by the AT_1 receptor measured in HEK 293 cells transiently overexpressing AT_1-NLuc and Venus-miniG_q. AT_1 receptor was activated by (B) AngII and its fluorescent derivatives (**1**-**2**), (D) TRV027 and its fluorescent derivatives (**5**-**6**) or (G) pretreated for 30 min with Cy3-L-Losartan (**11**) and activated by 1 µM AngII. Since the BRET signal was stable after 10 min of activation, the dose-response was performed 15 min after activation at 37°C in HEPES buffer (0.2% BSA). Graphs shown are representative of n = 4, or n = 2 (Cy3-L-Losatran) separate experiments. Each data point represents mean values ± SEM. Fitting to Hill's logistic equation was used (Graphpad Prism 8.0.2).

at 530 nm (here the Venus protein). Therefore, all the BRET experiments were performed with up to 1 µM of fluorescent peptidic ligands probes. As for the calcium responses, a right shift of the curves of approximately two logs as compared to the AngII was observed, suggesting an increase in EC_{50} consecutive to the graft of the fluorophores either Cy3 or TAMRA on AngII. Again, the linker in Cy3-L-AngII (**2**) failed to improve the EC_{50} of the fluorescent-based AngII. The fitting of the curve with Hill's equation was better for Cy3-AngII (**1**) and Cy3-L-AngII (**2**) with R^2 = 0,99 than for TAMRA-AngII with R^2 = 0,97. Neither calcium response, nor recruitment of G_q proteins were significantly affected by ScP and ScP-based fluorescent probes **3**-**4** (**see Supporting Information, Figures S49**).

Table 1: EC_{50} values of the agonists and biased agonists ligands on calcium response in HEK 293 cells overexpressing AT_1 receptor.

Compound	EC_{50} (M)	n
AngII	$1.07 \pm 0.20 \times 10^{-9}$	7
TAMRA-AngII	$2.32 \pm 1 \times 10^{-7}$	3
Cy3-AngII (**1**)	$1.17 \pm 0.18 \times 10^{-7}$	4
Cy3-L-AngII (**2**)	$1.26 \pm 0.26 \times 10^{-7}$	3
TRV027	no response	3
Cy3-TRV027 (**5**)	Not determined	3
Cy3-L-TRV027 (**6**)	Not determined	3

In conclusion both methods (calcium response and direct mini-G_q activation) showed a roughly two logs shift in the EC_{50} probably due to a loss in affinity of the fluorescent AngII for AT_1. This suggests that the grafting of the fluorophores on the *N*-terminal extremity of AngII hinders the interaction of the peptide within the binding pocket of the receptor as previously observed for a number of peptidic ligands of GPCRs.[43]

TRV027 did not induce any calcium response, as expected from an AT_1 agonist strictly biased towards the β-arrestin pathway (**Figure 4C**). The lack of recruitment of the miniG_q-Venus protein confirmed that TRV027 does not activate the G_q pathway when binding to AT_1 (**Figure 4D**, light blue curve). The new fluorescent probe based on TRV027, Cy3-TRV027 (**5**) did not induce any calcium response up to 1 µM. At higher concentrations, an increase in intracellular calcium could be observed. This increase in calcium was AT_1-dependent as a pretreatment with losartan could prevent it (**see Supporting Information, Figure S55**). Likewise, Cy3-TRV027 (**5**) and Cy3-L-TRV027 (**6**) were not able to activate the mini-G_q-Venus protein except at the highest tested concentrations. Taken together, these results suggest a loss of β-arrestin bias on AT_1 at high concentration when Cy3 is grafted on TRV027. A loss of bias with other specific AT_1 β-arrestin-biased agonists including TRV027 has already been reported, but it was found dependent on the density of AT_1 expression: a high density of AT_1 resulted in calcium release after treatment with TRV027 or other biased agonists.[44] This mechanism seems unlikely to arise in our settings, as no Gq pathway activation was detected with TRV027. Thus, increasing the size of biased agonist peptides can easily change their interaction with AT_1 receptor and lead to a loss of bias. Our results also indicate that Cy3-TRV027 (**5**), and to a lesser extent Cy3-L-TRV027 (**6**), can bind to AT_1 receptor, although we could not detect their binding with flow cytometry (see above), probably consecutive to an excessive non-specific binding of the fluorescent probes at 1 µM.

The antagonistic potency (pA_2) of Cy3-L-Losartan (**11**) was investigated by calcium response curves induced by AngII after a 30 min pretreatment with Cy3-L-Losartan (**11**) at different concentrations (**Figure 4F**). The observed concentration-dependent rightward shift of the AngII curve confirms that Cy3-L-Losartan (**11**) retained the antagonistic character of the native losartan towards AT_1 (**Figure 4E**), with a similar pA_2 (**Table 2**). However, unlike losartan, two distinct phases could be observed for the antagonistic action of Cy3-L-Losartan. Indeed, losartan induced a dose-dependent decrease in E_{max} concomitant to the rightward shift of the curves whereas Cy3-L-Losartan induced a complete abolition of the calcium response from 1 µM and above. This stronger effect of Cy3-L-Losartan compared to losartan probably reflects a change in the interaction between losartan and AT_1 receptor after the Cy3 grafting, as it seems to turn losartan into an unsurmountable antagonist. In addition, this probe (**11**) inhibited the G-protein recruitment induced by AngII. Indeed, a dose-dependent decrease in the AngII-modulated BRET signal between AT_1-NLuc and the mini-G_q-Venus was observed with Cy3-L-Losartan pretreatment (**Figure 4G**). This confirmed that Cy3-L-Losartan is an antagonist for AT_1 on the G_q pathway.

Table 2: pA_2 values of the Cy3-L-Losartan fluorescent ligand on calcium response in HEK 293 cells overexpressing AT_1 receptor.

Compound	pA_2	Ki (M)	n
Losartan	8.806	1.56×10^{-9}	3
Cy3-L-Losartan (**11**)	8.531	2.95×10^{-9}	4

Ex vivo experiments: middle cerebral artery vasoconstriction

The fluorescent agonist ligands were tested *ex vivo* on rat middle cerebral arteries in order to establish vasoconstriction dose-response curves (**Figure 5**).

AngII induced arterial contraction with an EC_{50} of $1.2.10^{-9}$ M and an E_{max} of -10% while ScP did not produce any arterial response (**Figure 5A**). As expected, TRV027, which does not activate the G_q-pathway, did not induce arterial contraction either in our assay. TAMRA-AngII produced a vasoconstriction similar to that of AngII in terms of E_{max} and EC_{50}. However, as for the mini-G_q recruitment, the shape of the curve did not fit well to Hill's equation ($r^2 = 0.5249$) and shows a biphasic response (**Figure 5B**). As this effect is blunted by losartan (**Figure 5C**), this suggests that this biphasic response is directly related to the impact of TAMRA-AngII on AT_1 receptor. One explanation could be related to a lack of stability of TAMRA-AngII at 37°C. Partial cleavage of TAMRA-AngII at 37°C and the subsequent release of AngII, which is active at lower concentration, could result in a biphasic response, due to the integration of both AngII and TAMRA-AngII stimulation, and explain the resulting curve. This could not be observed for calcium response as the lower temperature used for these settings (25°C) might prevent or slow down the degradation of TAMRA-AngII. The Cy3-derived ligands based on AngII, Cy3-AngII and Cy3-L-AngII (**1**-**2**), induced a very different arterial response: a right shit of the contraction dose-response curves started to be detected but with a stronger maximal contraction than AngII at 1 µM (**Figure 5B**). Such a strong arterial contraction was observed at 1 µM for all peptidic fluorescent probes carrying Cy3, including Cy3-TRV027 (**5**) and Cy3-L-TRV027 (**6**) (**Figure 5D and see Supporting Information, Figure S51**). This contraction induced by TRV027-derived peptidic probes could be the direct consequence of the loss of bias observed at the cellular level. However, this seems unlikely since i) similar

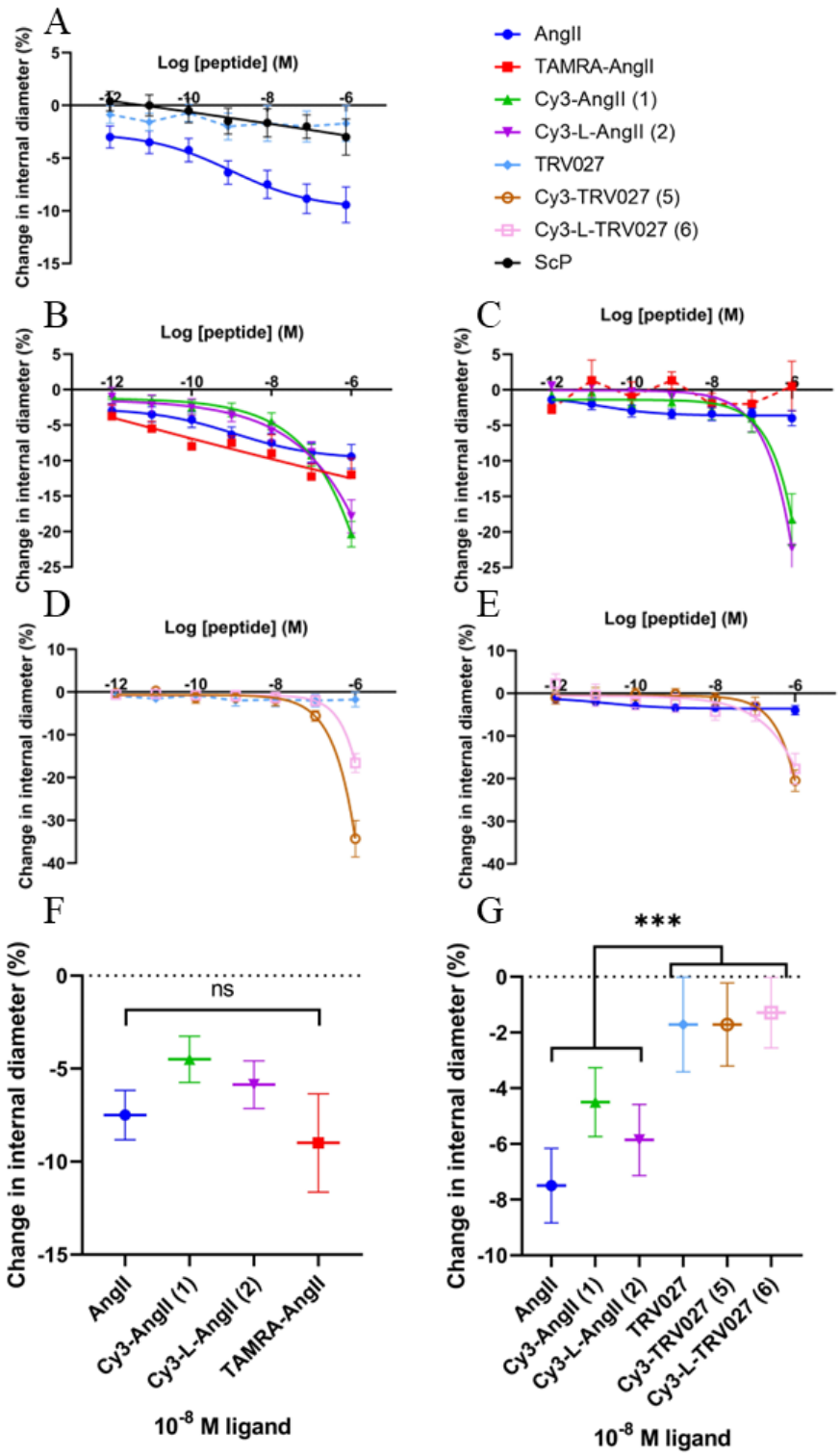


Figure 5: Measurements of the contractile responses of isolated and perfused rat middle cerebral arteries to the new fluorescent ligands with or without AT_1 antagonist pretreatment. The concentration-response curves of the non-fluorescent AngII, TRV027 and ScP peptides (A), AngII_fluorescent derivatives (**1**-**2**) (B/C), TRV027 fluorescent derivatives (**5**-**6**) (D/E) were obtained at 37°C after exposure (30 min) to physiological saline solution (no BSA) (A/B/D) or to losartan (10^{-5} M) (C/E). Changes in internal diameter (%) are expressed as mean ± SEM. The graphs shown are representative of a minimum of n = 6 separate experiments. Fitting to Hill's equation was used (Graphpad Prism 8.0.2). Measurements of contractile responses of isolated and perfused rat middle cerebral arteries to different ligands at 10^{-8} M. The AngII fluorescent derivatives (**1**-**2**) are compared to AngII (F) and AngII and the Cyanine 3 fluorescent peptides are compared to each other (G). Changes in internal diameter (%) are expressed as mean ± SEM. (F) A one-way Anova and (G) a two-way Anova (nature of the peptide, presence of the fluorophore) are used to calculate the P values, *P < 0.05 (Tukey post-hoc test) (Graphpad Prism 8.0.2)

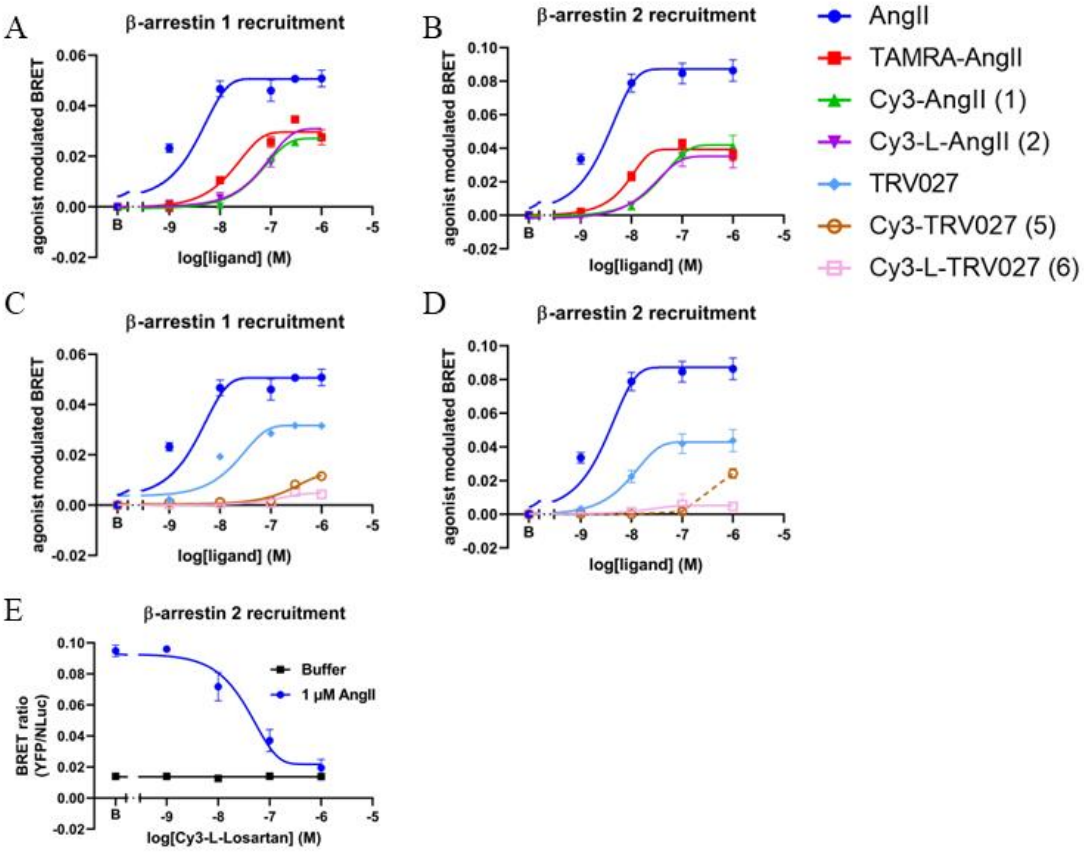


Figure 6: Effects of the new fluorescent ligands on the β-arrestin pathway in cells overexpressing AT_1 receptor. Protein recruitment by AT_1 is measured in HEK 293 cells transiently overexpressing AT_1-NLuc and YPET-ARRB1 (A/C) or YPET-ARRB2 (B/D). AT_1 receptors were activated for 15 min at 37°C in HEPES buffer (0.2% BSA) by AngII or its fluorescent derivatives (**1**-**2**) (A/B), TRV027 or its fluorescent derivatives (**5**-**6**) (C/D) or were pretreated for 30 min with Cy3-L-Losartan (**11**) and activated or not by 1 µM AngII (E). Graphs shown are representative of n = 4 or n = 2 (Cy3-L-Losartan, **11**) separate experiments. Each data point represents mean values ± SEM. Fitting to Hill's logistic equation was used (Graphpad Prism 8.0.2).

amplitudes of contraction were observed on arteries pretreated with an excess of losartan (10^{-5} M) (**Figure 5C, E**) and ii) even ScP coupled to Cy3 (**3**-**4**) produced this effect (**see Supporting Information, Figure S51**) while it had no impact on calcium response nor on G_q recruitment.

Therefore, the use of our fluorescent ligands on cerebral arteries seems limited to concentration lower than 1µM to avoid this AT_1-independent effect of the Cy3 fluorophore. At 10 nM, AngII and the three fluorescent-AngII derived ligands (**1**-**2** and TAMRA-AngII) produced a similar contractile response (**Figure 5F)**, which was significantly different from the strict β-arrestins biased agonist of AT_1, TRV027 and its Cy3-derived ligands (**5**-**6**) (**Figure 5G**). No EC_{50} could be established due to the limitation in the concentrations of fluorescent ligands and the impossibility to reach a plateau.

Functional responses on AT_1 receptor: Activation of the β-arrestin pathway

β-arrestin 1 and β-arrestin 2 recruitment

The recruitment of the β-arrestins following AT_1 activation was assessed by BRET between AT_1 fused on its intracellular *C*-terminus to the nanoluciferase NLuc and the YPET-labeled β-arrestin1 or β-arrestin2. First, AngII induced an increase in the BRET signal in a concentration dependent manner, indicating the recruitment of β-arrestins 1 or 2 after AT_1 activation (**Figure 6A, B**, blue curve) whereas ScP and its fluorescent derivatives (**3**-**4**) had no impact (**see Supporting Information, Figure S50**). The recruitment of β-arrestin 2 gave a higher agonist-modulated BRET signal than for β-arrestin 1, consistent with previous reports.[45] The fluorescent probes based on AngII (**1**-**2**) also induced the recruitment of β-arrestin 1 (**Figure 6A**) and β-arrestin 2 (**Figure 6B**). Again, a rightward shift of the dose-response curves could be observed *versus* AngII, illustrating an increase in EC_{50} and probably a loss in affinity for the fluorescent ligands. Interestingly, the E_{max} was also lowered suggesting that the fluorescent probes are partial agonist for the recruitment of β-arrestins.

As expected for a strict β-arrestin biased agonist of AT_1, TRV027 induced the recruitment of both types of β-arrestins in a dose-dependent manner (**Figure 6C, D**, light blue curve). The shift to the right versus AngII illustrates a lower affinity for AT_1 receptor and the maximal response

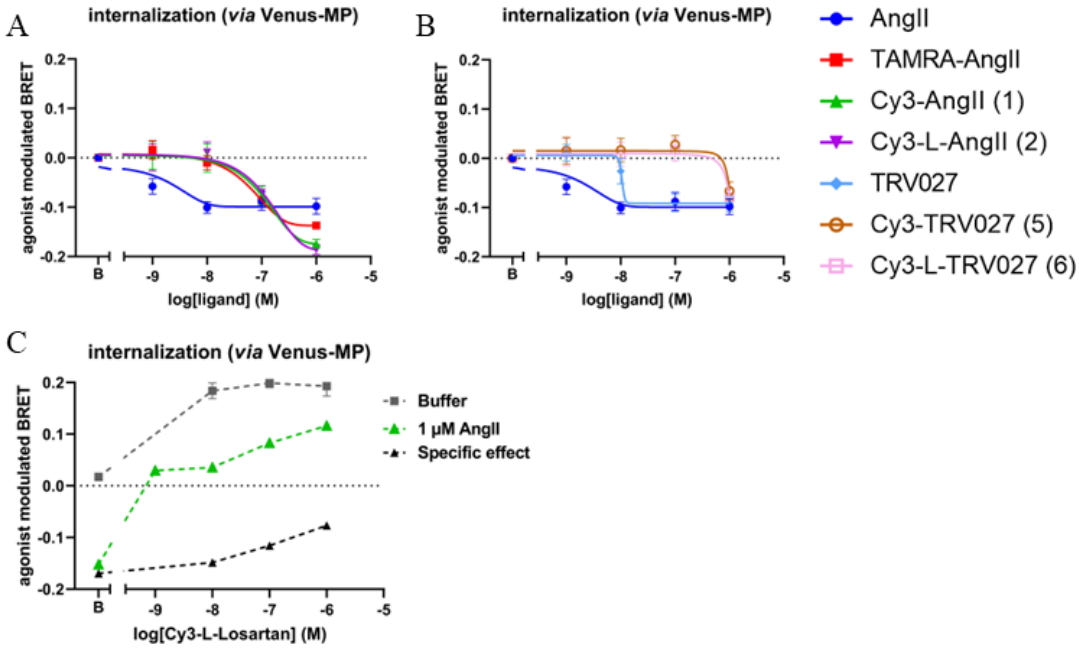


Figure 7: Effects of the new fluorescent ligands on AT_1 internalization in cells overexpressing AT_1 receptor. AT_1 internalization is measured in HEK 293 cells transiently overexpressing Venus-MP. AT_1 receptors were activated 15 min at 37°C in HEPES buffer (0.2% BSA) by AngII or its fluorescent derivatives (**1**-**2**) (A), TRV027 or its fluorescent derivatives (**5**-**6**) (B) or were pretreated for 30 min with Cy3-L-Losartan (**11**) and activated or not by 1 µM Ang II (C). Graphs shown are representative of n = 4 or n = 2 (Cy3-L-Losartan) separate experiments. Each data point represents mean values ± SEM. Fitting to Hill's logistic equation was used (Graphpad Prism 8.0.2).

induced by TRV027 is weaker than for AngII. These lower affinity and E_{max} for β-arrestin recruitment has already been reported for TRV027 as compared to AngII.[44] With Cy3-TRV027 (**5**) the recruitment of β-arrestins started to occur only at the highest concentrations (**Figure 6C, D**). The presence of the linker (**6**) abolished the β-arrestin recruitment. Thus, as for fluorescent-AngII derivatives, a loss of potency and efficacy was observed when fluorophore was added to TRV027, which was consistent with our previous findings.

Cy3-L-Losartan (**11**) retained its AT_1 antagonistic properties on β-arrestin recruitment since a decrease in the AngII modulated BRET signal of β-arrestin 2 recruitment following a 1 µM AngII stimulation could be observed as a function of increasing concentrations of Cy3-L-Losartan used to pretreat the cells (**Figure 6E**).

AT_1 internalization following activation

We also studied the activation of the β-arrestin pathway of AT_1 receptor by following AT_1 internalization consecutive to its activation by the fluorescent ligands by BRET where the localization of the AT_1-NLuc receptor at the plasma membrane is detected by a collision BRET signal with a fluorescent tracer, PM-Venus, expressed in excess to cover the entire inner leaflet of the plasma membrane[42,46]. Upon internalization of the activated receptor, the initial high BRET signal diminishes due to the increase in the distance between the PM-Venus that remains at the plasma membrane and the receptor that enters in the endocytic pathway (**Figure 7**).

A decrease in the BRET signal was thus observed when AT_1 was activated by AngII, until a plateau was reached from 10 nM onwards (**Figure 7A**, blue curve). ScP and its fluorescent derivatives (**3**-**4**) had no impact on AT_1 internalization (**see Supporting Information, Figure S50**). When AT_1 was activated by fluorescent-AngII ligands (**1**-**2**), a similar decrease in BRET signal was observed with a right shift of the dose-response curves of approximately two logs for AT_1 internalization, as observed for the direct BRET measurements of β-arrestins recruitment.

When TRV027 was applied, the internalization of AT_1 occurred with a lower potency than for AngII (**Figure 7B**). When Cy3 was grafted on TRV027 (**5**-**6**), AT_1 internalization could be detected only for the highest concentration of 1 µM. The already mentioned limitation of the BRET technique (quenching) did not allow to study higher concentrations of fluorescent ligands and thus precluded to reach a plateau and to conclude on the maximum internalization induced by the fluorescent ligands with this test. However, the recruitment of β-arrestins and the internalization of AT_1 were confirmed for both fluorescent derivatives of AngII and TRV027.

Regarding the impact of Cy3-L-Losartan (**11**) on internalization of the receptor: an effect of Cy3-L-Losartan alone was observed in absence of AngII. The BRET signal of AT_1 localization to the plasma membrane was increasing with increasing concentrations of Cy3-L-Losartan used to pretreat the cells (**Figure 7C**). This increase in the BRET signal without activation of the receptors by AngII could be consecutive to a pharmacological chaperone effect of

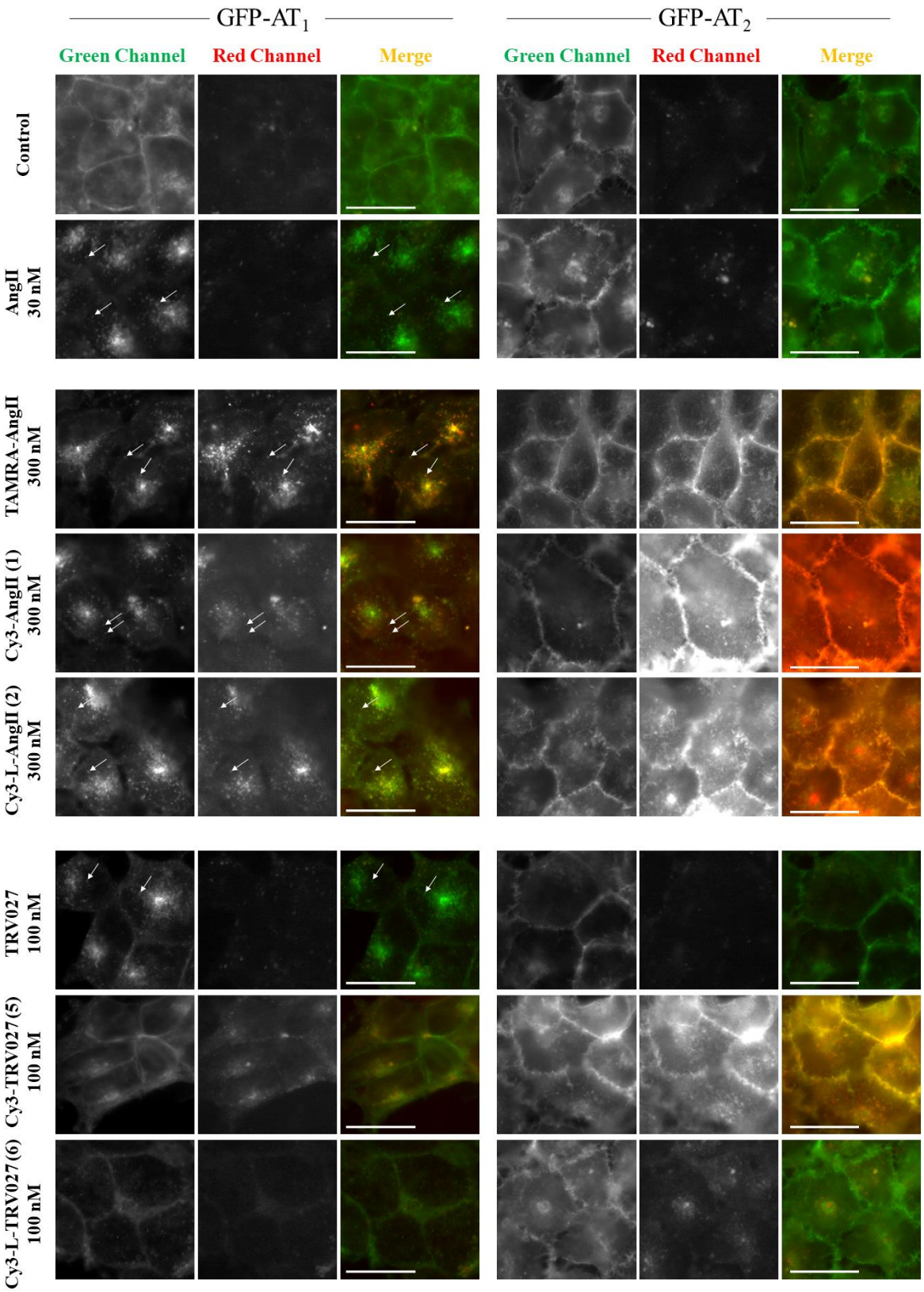


Figure 8: Epifluorescence microscopy images representative of the new fluorescent ligands binding to GFP-AT$_1$ or GFP-AT$_2$ receptors. Epifluorescence microscopy images of fixed HEK 293 cells overexpressing GFP-AT$_1$ or GFP-AT$_2$ before (control) or after a 30 min activation at 37°C in HEPES buffer (0.1% BSA) with either AngII (30 nM), AngII-derived fluorescent ligands (**1**-**2**) (300 nM), TRV027 (100 nM) or TRV027-derived fluorescent ligands (**5**-**6**) (100 nM). Green channel measured GFP and red channel measured Cy3 or TAMRA. Representative images from 3 separate experiments. White arrow: endosomal vesicles. Scale bar in images: 10 µm.

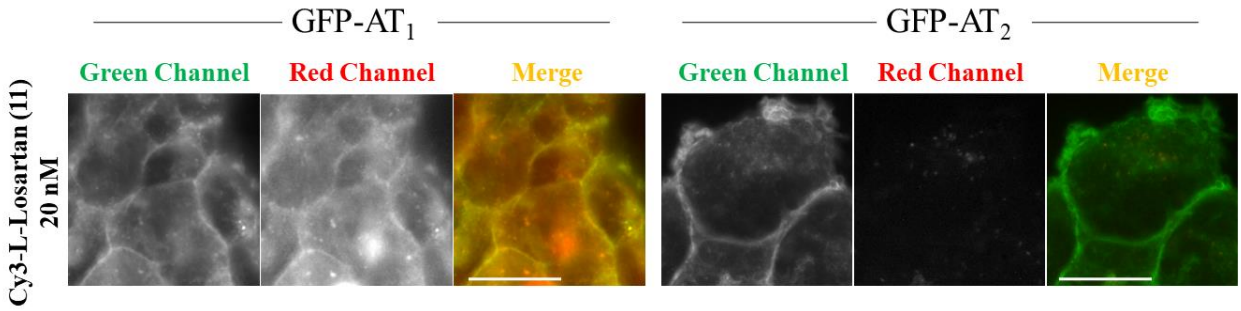


Figure 9: Epifluorescence microscopy images representative of the antagonist fluorescent ligands binding to GFP-AT_1 or GFP-AT_2 receptors. Epifluorescence microscopy images of HEK293 cells overexpressing GFP-AT_1 or GFP-AT_2 fixed after 30 min at 37°C in HEPES buffer (0.1% BSA) of treatment with Cy3-L-Losartan (**11**) (20 nM). Green channel measured GFP and red channel measured Cy3. Representative images from 3 separate experiments. Scale bar in images: 10 µm.

Cy3-L-Losartan as observed for other antagonists on others GPCRs.[47] This effect would help the folding of AT_1 receptor thus potentiating its delivery to the cell surface hence increasing the BRET signal. This effect reached a plateau at 10 nM of Cy3-L-Losartan (**Figure 7C**, black curve). A higher increase in BRET signal was found when cells pretreated with Cy3-L-Losatran were activated by 1 µM AngII (**Figure 7C**, green curve). Indeed, in these conditions, no plateau could be reached, as the BRET signal continued to raise above 100 nM of Cy3-L-Losartan. The specific effect on the inhibition of internalization (**Figure 7C**, dashed curve) was calculated by subtracting the chaperone effect: it showed that Cy3-L-Losartan can dose-dependently inhibit the AngII-induced AT_1 internalization. These results illustrate that, in addition to an antagonist potency similar to losartan on the G_q pathway, Cy3-L-Losartan is also an antagonist on the β-arrestin pathway.

Evaluation of the new fluorescent ligands as tracers of AT_1 and AT_2 receptors by epifluorescence microscopy

To assess the potential of our ligands to trace AT_1 and/or AT_2 receptors, we performed epifluorescence microscopy experiments on the stable HEK 293 cell lines overexpressing either GFP-AT_1 or GFP-AT_2 fixed before or after 30 minutes stimulation at 37°C with the different ligands.

AT_1 and AT_2 receptors detected by direct EGFP fluorescence were localized at the plasma membrane in the absence of activation, with an intracellular signal probably due to receptors trafficking to the cell surface through the exocytic pathway (**Figure 8**). 30 min after activation by 30 nM AngII, AT_1 was found in endocytic vesicles in the cytoplasm while AT_2 remained at the plasma membrane. This is supported by the literature, as activated AT_2 has been reported not to internalize.[10] Similar results were obtained with the fluorescent probes based on AngII (**1**-**2**) at a concentration of 300 nM. Colocalization of the green fluorescence of GFP-AT_1 or GFP-AT_2 with the red fluorescence of Cy3 or TAMRA could be detected in endosomes for AT_1 (**Figure 8**, white arrows) and at the plasma membrane for AT_2. The TAMRA-AngII displayed less background signal than the Cy3-derived AngII probes (**1**-**2**), thus confirming our flow cytometry data. This could be related to a higher nonspecific binding of Cy3 compared to TAMRA. The signal intensity at the plasma membrane of Cy3-ligands was higher than that of TAMRA-AngII on AT_2 expressing cells. As evoked above, this could be related to a lower stability of TAMRA-AngII *versus* Cy3-ligands at 37°C. As AT_2 does not internalize, the ligands were more exposed to extracellular enzymes and TAMRA-AngII could be degraded faster, leading to a loss of fluorescence. Inversely, the intensity of Cy3 was lower than TAMRA in endosomes on AT_1 expressing cells. TAMRA could also, in some experiments, be detected in endocytic vesicles with no colocalized GFP-AT_1. Again, if TAMRA-AngII is degraded at 37°C, some TAMRA fluorophores could follow a distinct endocytic route than GFP-AT_1. These results could also be due to different fluorescence properties of the fluorophores Cy3 and TAMRA depending on the chemical environment of the different extracellular and intracellular compartments, although the cells were fixed before image acquisition. Thus, the fluorescent derivatives with Cy3 (**1**-**2**) seem better for tracing plasma membrane localized receptors.

AT_1 receptor was found in endocytic vesicles after its activation by 100 nM of TRV027 while AT_2 remained at the cell membrane (**Figure 8**). The addition of Cy3 without the linker to TRV027 (**5**) did not modify the impact of TRV027 on AT_2 receptor, with a colocalization of the ligand with the receptor at the plasma membrane and a Cy3 signal intensity equivalent to the Cy3-AngII-derived fluorescent ligands (**1**-**2**). The colocalization of Cy3-TRV027 (**5**) ligand with AT_1 coupled to GFP was scarce in agreement with the selectivity of Cy3-TRV027 for AT_2 receptor: AT_1 receptor was localized at the plasma membrane and intracellularly while traces of Cy3-TRV027 ligand were detectable intracellularly. With the presence of the linker, no colocalization of Cy3-L-TRV027 (**6**) (100 nM) with AT_2 or AT_1 receptors could be found. Together with the decrease in AT_2 receptor labeling observed in flow cytometry, this suggested that only the Cy3-TRV027 will be a good tracer for AT_2 receptor (**Figure 1E and see Supporting Information, Figure S52**).

Cy3-L-Losartan (**11**) was found selectively colocalized with GFP-AT_1 at the plasma membrane (**Figure 8**). Interestingly, it also colocalized with the receptors inside the cell. This suggests that Cy3-L-Losartan can cross the plasma membrane probably by passive diffusion. This supports the internalization assay based on BRET (**Figure 7C**), where the Cy3-L-Losartan (**11**) seemed to display a pharmacological chaperone activity on AT_1, increasing the

plasma membrane localization of the receptors. Cy3-L-Losartan did not stain GFP-AT_2 overexpressing cells (**Figure 9**). This further confirmed all our results. Thus, given its high selectivity and high potency, Cy3-L-Losartan (**11**) appears as a promising tracer for AT_1 receptor.

CONCLUSION

In the present study, we designed, synthetized and characterized five original fluorescent ligands targeting AT_1 and AT_2 receptors. These ligands were compared to a commercially available ligand whose pharmacological characterization was lacunar. All the effects of these fluorescent ligands have been summarized in **Table 3**.

The agonist ligands TAMRA-AngII, Cy3-AngII (**1**) and Cy3-linker-AngII (**2**) retain the specificity of AngII for both AT_1 and AT_2 receptors and induce the same signaling on AT_1, namely 1) the G_q protein pathway, allowing the release of intracellular calcium and ultimately arterial contraction, and 2) the β-arrestin pathway allowing receptor internalization. Despite a higher EC_{50} of the order of 100 nM, these agonist ligands can be used to trace AT_1 and AT_2 receptors in cells overexpressing them. Further studies will have to address this loss of affinities to generate AT_1 probes for its canonical active conformation. Modifying the linker used between the peptide and the fluorophore using different size and/or design could reduce the impact of the fluorophore on the interaction with the receptor. In addition, the design and synthesis used to produce our ligands can be applied to other more brilliant fluorophores that could help improving their efficiency and avoid quenching and artefactual responses.[48–50] Considering their limitations, these newly developed and characterized fluorescent agonists can be applied in a series of fluorescence-based techniques to study AngII receptors signaling and localization. These ligands could be used to study the impact of the β-arrestin pathway of AT_1, *in vitro* but also *ex vivo*. As they induce functional responses and signaling similar to the native peptides, their use to decipher cerebrovascular pathophysiological models could also be considered.

The first selective fluorescent ligand for AT_2 *vs* AT_1 has been identified: Cy3-TRV027 (**5**). Up to 100 nM this ligand binds selectively to AT_2 compared to AT_1 and is a powerful tracer for AT_2. Its function on AT_2 remains to be explored, as the function of the initial TRV027 itself. This tracer of AT_2 has also potential for investigating AT_2/AT_1 heterodimer functions.[51] From 1 μM, the Cy3-TRV027 (**5**) ligand starts to show both weak G_q and weak β-arrestin activity on AT_1. Thus, the Cy3-TR027 (**5**) ligand appears to have lost its strictly β-arrestin bias on AT_1 receptor. Further development will have to address this loss of bias and the loss in affinities to generate AT_1 probes selective for its alternative active conformation leading to a strict β-arrestin activation. First, the structure of the peptide can be optimized to maintain or improve its original interactions with the alternative active conformation of AT_1 receptors. This would require extensive docking studies.

Finally, we also designed and synthesized the first AT_1-selective fluorescent ligand *vs.* AT_2, the antagonist Cy3-L-Losartan (**11**). In addition to its selective binding to AT_1 receptor, with a low K_D (around 30 nM), this ligand retains the character of an AT_1 antagonist and appears as a promising selective tracer for AT_1 *in vitro*. Its pharmacological characteristics enable to consider its use as a specific tracer for AT_1 *ex vivo* and *in vivo*.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry: Materials and Methods.

Chemicals and solvents of analytical and HPLC grade were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Cy3 NHS ester was purchased from Lumiprobe. All reactions involving cyanine3 compounds were performed in the dark. For antagonist-based probe synthesis, all reactions were performed under argon atmosphere. Reaction completion was checked by TLC using 60 F254 (Merck) plates and were revealed with UV light (254 nm). Flash column chromatography were achieved on a Grace Reveleris® equipped with 40 μm silica or C18-grafted silica cartridges. For the agonist and biased agonist peptides and peptide-based probes synthesis, an automated ResPepXL peptide synthesizer (Intavis AG, Bioanalytical Instruments), operated with a Multiple–Parallel Peptide Synthesis Program, was used. Purifications were performed on a Shimadzu LC-20A prominence HPLC system (LC-20AT pumps, CTO-20A column oven, SPD-M20A PDA detector) using preparative RP-C18 columns [Nucleosil (5 μm, 21 x 250 mm, Macherey-Nagel) for peptides, and Pursuit (5 μm, 21 x 150 mm, Agilent) for peptide-based probes]. The UV detection was performed at 280 nm. Purities were analyzed by LC-MS using similar HPLC system (LC-20AB pumps, CTO-20AC column oven, SPD-M20A PDA detector) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (LCMS-2020) detector, with analytical RP-C18 columns [Nucleosil (5 μm, 4.6 x 250 mm, Macherey-Nagel) for peptides, and Pursuit (5 μm, 4.6 x 150 mm, Agilent) for peptide-based probes]. 1D and 2D (^{1}H, ^{13}C, COSY and TOCSY) NMR spectra were recorded on a Brucker Advance III 400 MHz spectrophotometer in DMSO–d_6 at 298 K. ^{1}H NMR spectra were recorded at 400.13 MHz, and ^{13}C NMR were recorded at 101.62 MHz. Chemical shifts (δ) were recorded in parts per million (ppm) with reference to residual peak of DMSO (δ = 2.50 ppm),[52] and coupling constants (*J*) were recorded in Hz. The following abbreviations were used to describe the signal shape and multiplicities: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), broad (br), doublet of doublets (dd), doublet of triplets (dt), triplet of doublets (td), and multiplet (m). H_{arom} and CH_{arom} refer to aromatic protons and carbons, respectively, and C_{quat} refers to quaternary carbons. Processing of the NMR data was carried out using Brucker Topspin 4.1.3. software. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Bruker MicrOTOFq ESI/QqTOF apparatus. All compounds are >95% pure by HPLC analysis except when indicated.

Peptides and fluorescent peptides synthesis

All the peptides (AngII, ScP and TRV027) and peptide-based probes **1-6** (with or without linker) were synthesized using the automated ResPepXL peptide synthesizer, according to a classical Fmoc/*t*Bu solid phase methodology at 50 μmol scale. The side chains of aspartic acid (Asp, D), arginine (Arg, R), tyrosine (Tyr, Y) and histidine (His, H) were protected by Pbf, Trt, *t*Bu or Boc groups, respectively.

Table 3: Summary of the pharmacological characterization of the fluorescent derivatives on AT_1 / AT_2 receptors

Fluorescent Ligands	Pharmacological properties						Conclusion
	Selectivity AT_1 / AT_2	**AT_1 calcium response (EC_{50})**	**AT_1 G_q recruitment (EC_{50})**	***Ex vivo* MCA vasoconstriction (EC_{50})**	**AT_1 β-arrestins recruitment (EC_{50})**	**Expression and localization of AT_1 or AT_2**	
AngII	NA ($AT_1 = AT_2$) [2]	Full Agonist (1.07×10^{-9} M)	Full Agonist (1.01×10^{-9} M)	Full agonist (1.2×10^{-9} M)	Full agonist β-arrestin 1 (1×10^{-9} M) β-arrestin 2 (1.01×10^{-9} M)	NA	Full agonist on AT_1
TAMRA-AngII	$AT_1 = AT_2$	Full Agonist (2.32×10^{-7} M)	Full Agonist (1.22×10^{-8} M)	Full agonist ($\approx 1.13 \times 10^{-9}$ M)	Partial Agonist	AT_1 + + + (endosomes) AT_2 + + (PM)	Tracer $AT_1 = AT_2$ Agonist AT_1 (BRET artefact >1 µM)
Cy3-AngII (**1**)	$AT_1 = AT_2$	Full Agonist (1.17×10^{-7} M)	Full Agonist (1.14×10^{-7} M)	<100 nM AT_1 dependent Vasoconstriction	Partial Agonist	AT_1 + + (endosomes) AT_2 + + + (PM)	Tracer $AT_1 = AT_2$ Agonist AT_1 (BRET artefact >1 µM) (*ex vivo* artefact >0.1 µM)
Cy3-L-AngII (**2**)	$AT_1 = AT_2$	Full Agonist (1.26×10^{-7} M)	Full Agonist (2.59×10^{-7} M)	<100 nM AT_1 dependent Vasoconstriction	Partial Agonist	AT_1 + + (endosomes) AT_2 + + + (PM)	Tracer $AT_1 = AT_2$ No improvement with linker
TRV027	NA ($AT_1 = AT_2$)[17]	No response	No response	No response	Partial agonist β-arrestin 1 (9.19×10^{-8} M) β-arrestin 2 (9.45×10^{-8} M)	NA	AT_1 strict β-arrestins biased partial agonist
Cy3-TRV027 (**5**)	AT_2	<1 µM No response >1 µM Weak agonist	<1 µM No response >1 µM Weak agonist	<100 nM No response	<1 µM No response >1 µM Weak agonist	AT_2 + + (PM)	Selective tracer for AT_2 >1 µM Weak agonist on AT_1 Loss of AT_1 β arrestins biased (BRET artefact >1 µM) (*ex vivo* artefact > 0.1 µM)
Cy3-L-TRV027 (**6**)	AT_2	<1 µM No response >1 µM Weak agonist	No response	<100 nM no response	No response	No detection	No tracer
Losartan	NA	Antagonist	ND	Antagonist	ND	NA	Antagonist on AT_1
Cy3-L-Losartan (**11**)	AT_1	Antagonist	Antagonist	ND	Antagonist	AT_1 + + (PM)	Selective tracer for AT_1 Antagonist on AT_1

NA: not applicable; ND: not determined; PM: plasma membrane

A Fmoc–L–Phe–Wang resin, Fmoc–L–Arg(Pbf)–Wang resin or Fmoc–D–Ala–Wang resin was used as the starting material and swelled in CH_2Cl_2 (3 x 10 sec). The Fmoc groups were removed by piperidine (20 % in DMF). This step was performed three times during 12 min. The next amino acid was then grafted with the coupling step by adding an excess of Fmoc–aminoacid–OH (5.5 eq), HBTU (5 eq), NMP (0.00196 eq) and NMM (10 eq) in DMF. The amino acid coupling step was repeated two or three times for 18 min depending on the peptide sequence (*i.e.*, for AngII and Scramble peptides, only the coupling step of Asp, Ile, Pro and Sar were repeated three times, while for TRV027 peptide the coupling step of each amino acid was repeated three time). A last step of capping, using a solution of acetic anhydride (5 % in DMF), was performed for 5 min, to trap all functions that did not react. The process of deprotection, coupling and capping were repeated until the desired sequences of amino acids were grafted on the resin. At the end of each step, all soluble reagents on the resin and the protecting group at the *N*–terminus of the peptide were removed by filtration and washing process with CH_2Cl_2 (x 3), EtOH (x 3) and DMF (x 3). Regarding the *N*-terminal coupling of the PEG linker, this step was repeated two time for 2h00 using Fmoc-*N*-amido-PEG_2-COOH (1.2 eq) and the same reagents as those used with amino acids (*i.e.*, HBTU (3 eq), NMP (3 eq) and NMM (9 eq) in DMF) and the final Fmoc protection was removed using piperidine (20 % in DMF) for 20 min then 3 times for 15 min. The *N*-terminal coupling of Cy3 NHS ester (1 eq) was performed using DIPEA (3 eq) in DMF 2 times for 2 h. The various obtained resins were dried under vacuum and then each compound was cleaved off from the resin (together with side chains deprotection) using a mixture of TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5) for 2 h. The resin was filtered and washed with TFA and CH_2Cl_2 and the resulting filtrate was co-evaporated with CH_2Cl_2 and dried under vacuum. The crude compounds were precipitated in cold diethyl ether and purified by reversed phase HPLC (RP-HPLC) (**see Supporting Information, Table S1**) and lyophilized. The purified peptides and peptide-based probes (with or without a PEG linker) were obtained as white (*i.e.*, compounds without Cyanine3) or pink (*i.e.*, Cy3-based compounds) powders with a yield from 23 to 55% and an LC-MS purity of >95%, except **2** (94%), **3** (92%) and **6** (93%) (**see Supporting Information, Table S1**). Each compound was characterized by NMR (^{1}H, COSY and TOCSY), **see Supporting Information, Tables S2-S3 and Figures S1 to S47**) and positive ion electrospray high resolution mass spectroscopy (ESI-HRMS). Characterization data are given in **Supporting Information (Table S1)**.

Antagonist-based probe synthesis

*2-(2-(2-(1-((2'-(2H-tetrazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)-2-butyl-4-chloro-1H-imidazole-5-carboxamido)ethoxy)ethoxy)ethan-1-aminium (**10**).* Coupling reaction: To a solution of **7**[36] (450 mg, 1.03 mmol) in 20 CH_2Cl_2 was added **8**[37] (256 mg, 1.03 mmol), EDC (217 mg, 1.13 mmol), HOBt (153 mg, 1.13 mmol) and DIPEA (197 µL, 1.13 mmol) under argon. The reaction was stirred at room temperature for 2 hours and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in EtOAc (40 mL) and washed with 5% aqueous $KHCO_3$ solution (2 × 20 mL), 5% aqueous citric acid solution (2 × 20 mL) and distilled water (2× 20 mL). The organic phase was dried ($MgSO_4$), and the solvent was removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (normal phase, eluent: CH_2Cl_2/MeOH 100/0 to 95/5, v/v) to afford 378 mg of **9** as a white solid which was used without further purification. Deprotection: To a stirred solution of **9** in CH_2Cl_2 (15 mL) was added dropwise a solution of 1M HCl in EtOAc (8.5 mL) under argon. The reaction was stirred at room temperature for 4 h. The supernatant was removed from the precipitate, which was washed twice with CH_2Cl_2 by sonication, decantation and removal of the supernatant. The residual solvent was removed under vacuum. The residue was dissolved in a 1/1 (v/v) mixture of EtOAc/MeOH (15 mL), and Et_2O was added until precipitation occurs. The solvent mixture was carefully removed under vacuum to afford a colorless solid (249 mg, 0.41 mmol, 40% yield). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 0.80 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, Bu CH_3), 1.19 - 1.28 (m, 2H, Bu CH_2), 1.43 - 1.50 (m, 2H, Bu CH_2), 2.53 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, Bu CH_2), 2.94 (m, 2H, $CH_2NH_3^+$), 3.37 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.47 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, $NHCH_2CH_2$), 3.55 (s, 4H, OCH_2CH_2O), 3.58 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH_2 CH_2NH_3+), 5.45 (s, 2H, NCH_2), 7.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{arom}), 7.06 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{arom}), 7.50 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{arom}), 7.57 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H, H_{arom}), 7.64 - 7.69 (m, 2H, H_{arom}), 7.79 (br s, 3H, NH_3^+), 8.02 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, CONH). ^{13}C NMR (100.6 MHz, DMSO-d_6): δ 13.5 (Bu CH_3), 21.5 (Bu CH_2), 25.6 (Bu CH_2), 28.7 (Bu CH_2), 38.5 ($CH_2NH_3^+$), 38.6 (CH_2NH), 47.0 (NCH_2), 66.6 ($CH_2CH_2NH_3^+$), 68.6 ($NHCH_2CH_2$), 69.4 (OCH_2CH_2O), 69.6 (OCH_2CH_2O), 121.2 (C_{quat}), 123.4 (C_{quat}), 126.5 (CH_{arom}), 127.8 (CH_{arom}), 127.9 (C_{quat}), 129.0 (CH_{arom}), 130.5 (CH_{arom}), 130.6 (CH_{arom}), 131.0 (CH_{arom}), 136.1 (C_{quat}), 138.5 (C_{quat}), 141.0 (C_{quat}), 149.7 (C_{quat}), 154.7 (C_{quat}), 158.9 (C=O). HRMS (ESI) for $C_{28}H_{36}ClN_8O_3$ $[M]^+$: calcd 567.2593, found 567.2599. 1D and 2D NMR spectra are given in Supporting Information, Figures S37 to S41.

*1-(1-(1-((2'-(2H-tetrazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)-2-butyl-4-chloro-1H-imidazol-5-yl)-1,12-dioxo-5,8-dioxa-2,11-diazaheptadecan-17-yl)-3,3-dimethyl-2-((E)-3-((Z)-1,3,3-trimethylindolin-2-ylidene)prop-1-en-1-yl)-3H-indol-1-ium tetrafluoroborate (**11**).* To a solution of **10** (22 mg, 0.04 mmol) in 4 mL of DMF were added Et_3N (15 µL, 0.11 mmol) and Cy 3 NHS ester (25 mg, 0.04 mmol) under argon. The reaction mixture was protected from the light with an aluminum foil. The solution was stirred at room temperature for 24 hours and the solvent was removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (reversed phase, eluent: H_2O/MeOH (1/1000 TFA) 7/3, v/v) to afford **11** (32 mg, 0.03 mmol, 75% yield) as a dark red solid. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 0.79 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, Bu CH_3), 1.17 - 1.28 (m, 2H, Bu CH_2), 1.33 - 1.41 (m, 2H, Cy CH_2), 1.41 - 1.50 (m, 2H, Bu CH_2), 1.50 - 1.61 (m, 2H, Cy CH_2), 1.69 (s, 12H, Cy CH_3), 1,67 - 1,76 (m, 2H, Cy CH_2), 2.07 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Cy CH_2), 2.51 - 2.56 (m, 2H, Bu CH_2), 3.10 - 3.19 (m, 2H, CH_2NH), 3.29 - 3.39 (m, 4H, CH_2NH and CH_2O), 3.41 - 3.52 (m, 6H, $CH_2OCH_2CH_2O$), 3.65 (s, 3H, NCH_3), 4.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH_2N^+), 5.44 (s, 2H, CH_2N), 6.47 (d, *J* = 13.5 Hz, 2H, 2x-CH=), 6.97 - 7.09 (m, 4H, H_{arom}), 7.24 - 7.33 (m, 2H, H_{Arom}), 7.39 - 7.47 (m, 4H, H_{Arom}), 7.49 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, $_{Harom}$), 7.56 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{arom}), 7.60 - 7.70 (m, 4H, H_{arom}), 7.81 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 7.98 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.34 (t, *J* = 13.5 Hz, 1H, -CH=). ^{13}C NMR (100.6 MHz, DMSO-d_6): δ 13.5 (Bu CH_3), 21.5 (Bu CH_2), 24.9 (Cy CH_2), 25.6 (Bu CH_2), 25.7 (Cy CH_2), 26.7 (Cy CH_2), 27.2 (Cy CH_3), 27.4 (Cy CH_3), 28.7 (Bu CH_2), 31.4 (Cy CH_3), 35.0 (Cy C=OCH_2), 38.4 ($NHCH_2$), 38.7 ($NHCH_2$), 43.7 (CH_2N^+), 47.0

(CH_2N), 48.8 (Cy C_{quat}), 68.6 (CH_2O), 69.1 (CH_2O), 69.5 (CH_2O), 69.6 (CH_2O), 102.3 (Cy CH=), 102.9 (Cy CH=), 111.4 (Cy CH_{Arom}), 111.5 (Cy $_{CHArom}$), 121.1 (imidazole C_{quat}), 122.4 (Cy CH_{arom}), 122.5 (Cy CH_{arom}), 125.1 (Cy CH_{arom}), 125.2 (Cy CH_{arom}), 126.5 (losartan CH_{arom}), 127.8 (losartan CH_{arom}), 128.1 (imidazole C_{quat}), 128.5 (Cy CH_{arom}), 128.6 (Cy CH_{arom}), 129.0 (losartan CH_{arom}), 130.5 (losartan CH_{arom}), 130.6 (losartan CH_{arom}), 131.1 (losartan CH_{arom}), 136.2 (imidazole C_{quat}), 140.6 (2C, Cy C_{quat}), 141.0 (C_{quat}), 141.9 (Cy C_{quat}), 142.6 (Cy C_{quat}), 149.7 (Cy CH=), 149.8 (losartan C_{quat}), 157.8 (C_{quat}), 158.1 (C_{quat}), 158.9 (losartan C=O), 172.0 (Cy C_{quat}), 173.6 (Cy C_{quat}), 174.5 (Cy C_{quat}). HRMS (ESI) for $C_{58}H_{70}ClN_{10}O_4$ $[M]^+$: calcd 1005.5270, found: 1005.5275. 1D and 2D NMR spectra, along with LC-MS analysis are given in Supporting Information, Figures S42 to S47.

Cellular pharmacology

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) except TAMRA-AngII from Euogentec (Seraing, Belgium). AngII from Sigma-Aldrich had a purity of 97% with a peptide content of 86%. TAMRA-AngII had a purity of 95%.

Cell lines

A single cell line was used, immortalized human kidney embryonic cells HEK 293 (ATCC Cat# CRL-1573, RRID: CVCL_0045), but genetically modified with different plasmids according to the different experiments.

Expression vectors available

The pcDNA3 vector encoding the human Flag-AT_1 tagged receptor was a gift from department of pharmacology (Sherbrooke university).[53,54] The pIRES expression vectors (Clontech) encoding the human fluorescent receptor EGFP-AT1 or the human fluorescent receptor EGFP-AT2 were a gift from Pr. Haiech and Pr. Kilhoffer (University of Strasbourg) and PCBIS (UMS3286, CNRS, University of Strasbourg).[54] Briefly, the receptors are expressed with, at their *N*-terminal extremity, the fluorophore preceded by a signal peptide for the translocation of the fusion protein through the endoplasmic reticulum membrane.[55]

Other plasmids encoding proteins of interest used for BRET experiments are: pcDNA3-YPET-ARRB2; pcDNA3-YPET-ARRB1; pcDNA3-Venus-miniG; pcDNA3-Venus-MP and pcDNA3-hindIII-FlagAT1Rh-Nluc.

The pcDNA3-YPET-ARRB2 vector encodes β-arrestin 2 coupled to the fluorescent protein YPET (gift from Dr. Morisset).[56] The pcDNA3-YPET-ARRB1 vector encoding β-arrestin 1 coupled to the fluorescent protein YPET was cloned in the laboratory. The pcDNA3-Venus-miniG_q vectors encode miniG_q proteins coupled to the Venus fluorescent protein derived from YFP (yellow fluorescent protein). These miniG are modified Gα proteins, lacking membrane anchoring and binding sites for βγ subunits and not allowing the release of GDP, thus increasing the stability of the complex formed with the receptor. Plasmids for miniG were kindly provided by Dr. Lambert[42] (Augusta University, USA) and are fused with the Venus fluorophore. The pcDNA3-Venus-MP vector encodes a fluorescent tracer of the inner face of the cell membrane also provided by Dr. Lambert. The fluorescent protein Venus was fused with the positively charged *C*-terminal fragment of KRas4B that encodes 25 lysine-rich amino acids RKHKEKMSKDGKKKKKKSKTKCVIM.[57] The pcDNA3-NLuc encoding the nano luciferase from oplophorus species was a gift from Dr. Perroy. All the vectors were controlled for their correct DNA inserts by DNA sequencing before transfection.

cDNA Cloning

For the cloning of the pcDNA3-AT_1-NLuc plasmid used in BRET experiments, the Takara In-fusion cloning system was used. The oligonucleotide sequences of the primers were determined using the Takara Bio website and synthesized by Eurofins Genomics. The insert Flag-AT_1 without a stop-codon was amplified by PCR with the primers GCTTACCACCATGAAGACGATCATCGCCC and TCTTCGAGTGTGAAGACCATCTCGTTCTCGTTGGACAACT CAACCTCAAAACATGGTGC using the pcDNA3- Flag-AT_1 as a bait. The recipient vector pcDNA3-NLuc was PCR amplified with the primers ATGGTCTTCACACTCGAAGATTTCG and TCGTCTTCATGGTGGTAAGCTTGGGTCTCCCTATAGTGAG. The resulting vector allows the expression of AT_1 with, at its N-terminal end, a Flag-tag (DYKDDDDK), the NLuc is fused on the intracellular *C*-terminus of the receptor preceded by a 6 amino acid linker (LSNENE).

Cell culture

HEK 293 cells were cultured in a humid atmosphere in an incubator (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) in 75 cm^2 flasks in MEM medium (Minimum Essential Medium, reference P30-3306 NGlowBiotech) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (reference P30-3306 PAN Biotech), 2 mM glutamine (reference 25030-024 GIBCO) and 1% antibiotics (penicillin at 100 units/mL and streptomycin 100 µg/mL, reference 15140-122 GIBCO). Cells were re-plated twice a week. HEK 293 stable clones overexpressing either human AT_1 fused on its extracellular *N*-terminus either with a Flag-tag or with the fluorescent protein GFP or overexpressing AT_2 receptor fused on its extracellular *N*-terminus with the fluorescent protein GFP were, in addition, cultured with 600 µg/mL G418 (Invitrogen).

For stable transfection of the EGFP-AT_2 receptor, the cells were plated on 10 cm culture dishes for one day, then transfected with 18 µg of plasmids using the calcium phosphate precipitation method.[55] Selection with antibiotics began two days later with 600 µg/mL of G418 (Invitrogen). Isolated cell clones were collected after 3 weeks of selection.

Measurement of the selectivity of fluorescent ligands for AT_1 by flow cytometry

HEK 293 cells stably expressing GFP-AT_1 or GFP-AT_2 or HEK 293 cells, serving as a negative control, were cultured in a humid atmosphere in an incubator (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) in complete MEM medium for two days at T10. Cells were then rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and collected in PBS-5mM EDTA. After centrifugation of the cells at 1000 g for 5 min, they were resuspended in HEPES buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 137.5 mM NaCl, 1.25 mM $MgCl_2$, 1.25 mM $CaCl_2$, 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM NaH_2PO_4, 0.2% BSA).

The cells were then preincubated for 15 min at 37°C with 6 different concentrations of the different ligands in

order to obtain a concentration-response curve. After a first centrifugation at 2000 g at 4°C for 5 min, the supernatant was removed and the cells were suspended in 200 µL of HEPES buffer, then a second centrifugation was carried out under the same conditions. The supernatant was removed again, the cells were resuspended in 750 µL of PBS-EDTA and kept on ice until cytometer analysis. In order to separate any cell aggregates, the cell suspension was filtered (80 µm NITEX cloth, reference 074008 Dutscher) before being analyzed. GFP fluorescence and Cy3 or TAMRA fluorescence were detected by analysis of 10,000 cells per sample on a Celesta Sorp cytometer including 4 lasers for fluorescence (BD, Biosciences, San Diego, CA, USA).

Confocal microscopy and K_D determination

Classical methods based on overall fluorescence measurements, such as measuring the total fluorescence intensity of a cell (in flow cytometry), of an image (in microscopy) or measuring the total fluorescence intensity of a well for microplate studies, provide an average reading of the fluorescence signal. We decided to exploit a new method that we developed based on the analysis of confocal images of fluorescent ligand binding to their plasma membrane receptors to investigate the K_D of our new Cy3-L-Losartan tracer. Here, this method allows the acquisition of signals from only the membrane segment covered by pixel-wide individual line profiles. This method is currently being published (Ma. *et al.*, in progress).[38] The new technique enables to determine the fluorescence intensity at the plasma membrane automatically at a number of distinct locations in each cell.[58,59] Quantitative analysis of the raw confocal microscopy images allows accurate estimation of the fluorescent signals originating from the plasma membrane in the confocal volume. In cells that express a fluorescent receptor at the membrane, this allows us to study the density of receptors. Using this new technique, we measured the fluorescence intensity of Cy3-L-Losartan and GFP-AT_1 directly at the cell membrane.

HEK 293 cells were seeded at 50,000 cells/well for 24 hours in DMEM medium (DMEM/F-12(1:1)1X + GlutaMAX, reference 31331-028 Gibco) supplemented with 10% FCS and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) in 8-well coverslips of ibidi pre-coated with poly-L-lysine (0.01%; CAS 25988-63-0, Sigma). Transient transfection of cells was carried out the next day.

The quantity of plasmid used per well for transfection was 2 µg GFP-AT_1/6 µL Lipofectamine or 2 µg GFP-AT_2/4 µL Lipofectamine. This quantity was diluted in 200 µL of OptiMem medium then Lipofectamine 2000 (reference 11668-027 Invitrogen) was added. After homogenization, the mixture was incubated for 15 min at room temperature. Finally, 200 µL of the mixture (plasmids + Lipofectamine) were added per ibidi well where the medium had previously been eliminated. The plate was incubated again for 24 hours at 37°C, 5% CO_2.

24 hours after transfection, the cells were incubated for 15 min at 20°C with different concentrations of the ligands of interest (0.1 nM to 100 nM) in HEPES buffer (0.2% BSA). The antagonists used in excess (Losartan or PD123319 at 10^{-5} M) were pre-incubated at 37°C with the cells for 15 min before activation by the compound tested. After incubation, cells were rinsed with HEPES buffer (0.2% BSA) before being fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 5 min, then rinsed twice with HEPES buffer (0.2% BSA) and stored in PBS at 4°C until images were acquired, at the latest the day after the experiment.

Samples were imaged with an Olympus IX81 confocal laser scanning microscope using a x100 1.4 NA oil immersion objective. The samples were illuminated simultaneously with a 480 nm laser and a 559 nm laser, and 3 channels were acquired in parallel: emission light at 500–545 nm for GFP; light emission at 570-670 nm for Cy3; and transmitting light. Each sample was captured in five different fields of view.

Cell membrane Cy3 fluorescence intensity was measured for all images of each sample and analyzed using the in-house developed MATLAB automatic script, HiTIAN and RevCell software. Succinctly, perpendicular line scans along the cell membrane were automatically drawn and the bound signal was extracted from the corresponding channel *via* Gaussian fitting of the intensity profile. All measurements within the same sample were grouped into a single point describing that sample.

Data were fitted in Graphpad Prism 10 using a "One Site – Full and Non-Specific Binding" model in a common fit: full binding on cells overexpressing receptors then non-specific binding with excess antagonist receptors. The curves obtained for the different expression ranges were fit with a "One Site – Specific binding model" model.

Intracellular calcium release measurement

HEK 293 cells stably overexpressing Flag-AT_1 were cultured at 600,000 cells/mL for two days in complete MEM medium in a humidified atmosphere in an incubator (20% O_2, 5% CO_2, 37°C) in T10. They were then loaded with 2.5 µM of Fluo-4-AM (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in the presence of 2.5 mM of probenecid (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for one hour. Cells were then rinsed and collected in PBS and suspended in 12 mL of HEPES buffer (no BSA). The cells were distributed in a 96-well plate (Greiner 655090, 100 µL/well) and centrifuged for 5 min at 800 rpm. The tested compounds were serially diluted in HEPES buffer. The antagonists used were pre-incubated with the cells for 30 min before activation by the test compound.

Increases in intracellular calcium caused by the agonists, injected after 30 seconds of measurement, were recorded using a Flexstation III microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) with measurement every 3 seconds for 220 seconds at 25°C, by fluorescence emission at 520 nm (excitation at 485 nm). Peak response amplitudes were normalized to the baseline fluorescence level. For each concentration of the agonist, the maximum value of the increase in calcium concentration was determined in order to construct concentration-response curves. The analysis software used is KaleidaGraph 4.0.

Measurement of receptor/effector interactions by bioluminescence (BRET)

HEK 293 cells were seeded at 500,000 cells/mL for 24 hours in 6-well plates (reference 353046, Falcon) containing 5 mL of complete MEM medium. Transient

transfection of cells was carried out the next day. 2 hours before transfection, the complete MEM medium was eliminated and replaced with 3 mL of MEM medium supplemented with 10% FCS and 2 mM glutamine. The quantity of plasmid used per well for transfection was 3 µg of DNA in total from the different plasmids 0.1 µg Flag-AT_1-NLuc + either (0.8 µg Venus-miniG and 2.1 µg empty plasmid pcDNA3) or (0.4 µg YPET ARRB and 2.5 µg empty plasmid pcDNA3) or (0.5 µg Venus-MP and 2.4 µg empty plasmid pcDNA3). This quantity was diluted in 300 µL of MEM medium then the transfectant agent containing 120 µL of MEM medium and 9 µL of Polyethyleneimine (PEI-Max concentration 1 mg/mL (Reference 24765-2, Polysciences) was added to the solution. After homogenization, the mixture was incubated for 30 min at room temperature. Finally, 430 µL of the mixture (plasmids + PEI-Max) were added per well. The plate was incubated again for 24 hours at 37°C, 5% CO2.

Day one after transfection, a white 96-well plate with an opaque white background (reference 655073, Greiner) was pre-coated with 100 µL of rat type I collagen (60 µg/mL) for 15 min at room temperature. Excess collagen was sucked out and the plaque dried for 10 min. In the meantime, the transfected cells in the 6-well plate were resuspended in 1.3 mL/well of fresh complete MEM medium. The cells were detached by a series of gentle suctions/discharges with the pipette then 100 µL of transfected cells/well were added to the collagen pre-coated 96-well plate. The cells were incubated further for 24 hours.

Day two after transfection, the cell culture medium was replaced with 80 µL/well of HEPES buffer (0.2% BSA). The tested compounds were serially diluted in HEPES buffer (0.2% BSA). The antagonists used were pre-incubated with the cells for 30 min before activation by the test compound at 37°C. In the 96-well plate, 10 µL of the compounds to be tested were added followed by the NanoGlow substrate (diluted 1/80 in HEPES buffer (0.2% BSA); Interchim, Montluçon, France) 10 min before recording the BRET end point. The signals were acquired in a VictorLight device (Pekin Elmer) at 37°C. For each well, the emitted light was measured 1 sec at the donor emission wavelength (NLuc, 435-385 nm emission filter) followed by 1 second at the acceptor emission wavelength (YPET or Venus, emission filter at 510-560 nm).

A "BRET ratio" corresponding to the signal in the "acceptor channel" divided by the signal in the "donor channel" was calculated. The "netBRET" value was then calculated by subtracting the "BRET ratio" of the cells expressing AT_1-NLuc alone from the "BRET ratio" of the cells expressing AT_1-NLuc together with the different BRET acceptor fluorescent proteins (for the same activation time). Finally, agonist-modulated BRET signals were calculated by subtracting the netBRET signal obtained without receptor activation from the netBRET signals obtained after activation by ligands.

A minimum of 3 independent experiments were performed in duplicates and data were analyzed using GraphPad Prism 8.0.2 software.

In order to determine half of the maximum effective concentration (EC_{50}), E_{min} and E_{max}, each individual peptide concentration-response curve was fitted to Hill's equation:

$$Agonist\ modulated\ BRET = E_{min} + \frac{(E_{min} + E_{max})}{1 + 10^{(logEC_{50} - \log(concentration) \times Hill\ slope)}}$$

Subcellular localization by epifluorescence imaging

HEK 293 cells stably overexpressing the human GFP-AT_1 or GFP-AT_2 were cultured on 12 mm diameter coverslips pre-coated with rat type I collagen (60 µg/mL, reference 11179179001) in 24-well plates containing complete MEM medium. The different ligands tested were diluted in HEPES buffer (0.1% BSA) and added to the cells for 30 min at 37°C. After incubation, the cells on coverslips were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 15 min, rinsed twice with PBS and exposed for 15 min to 50 mM NH_4Cl in order to quench the remaining paraformaldehyde fluorescence. After two more rinses in PBS, the coverslips were glued onto slides using a mounting agent (Mowiol, Calbiochem). Image acquisition was carried out with a LEICA epifluorescence microscope (LEICA DM5500B motorized microscope with Leica CTR 6000 cold camera). Figures were created with ImageJ software.

Ex vivo pharmacology

Animals

The experiments were conducted on 4- to 5-month-old male normotensive outbred Wistar rats (HanRj:WI, Janvier, Le Genest-Saint-Isles, France, RGD Cat# 13792727, RRID: RGD_13792727), a commonly used physiological model. Only male rats were used to avoid any gender parameters that could influence AngII response.[60] Animals were housed in the ACBS animal facility (agreement number C54-547-30), in a rodent-specific pathogen-free area. Environmental variables such as temperature, humidity, ventilation, pressure gradient and light exposure are controlled independently for each room. Rats ate standard rat chow (A04, Safe, Villemoison-Epinay sur Orge, France) and drank water (Aqua-clear®, Culligan, Nortbrook, 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 3Rs' requirements for Animal Welfare. The experimental protocols and procedures were approved by the regional ethics committee on animal experimentation (BisNitroVivo APAFIS referral #15598) and the out-of-field experimental procedures were controlled by the ACBS animal facility.

Vasoactive response

Preparation of MCA

Rats were anaesthetized with 4% isoflurane and killed by decapitation. The brain was placed in a physiological salt solution (PSS) (NaCl 119 mM, $NaHCO_3$ 24 mM, KCl 4.7 mM, $MgSO_4$ 1.17 mM, KH_2PO_4 1.18 mM, $CaCl_2$ 1.6 mM, and glucose 6 mM) at 4°C. Middle cerebral arteries (MCA) were chosen as a classical model of isolated cerebral vessels. The first branch-free segment of the MCA immediately proximal to the circle of Willis was dissected out and mounted on two glass micropipettes (diameter of 125–150 µm) in a small vessel arteriography (model CH-1-LIN-SH, Living System Instrumentation, Burlington, VT, USA) and secured with silk thread (diameter of 20 µm, 2–0,48 mm, 2540, Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). The artery was then pressurized (intraluminal pressure of 80 mmHg) and perfused (intraluminal flow rate of 100

µL/min) 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) for measurement of isotonic vasoconstriction and assessment of viability.

The arteriograph was placed under an inverted fluorescence microscope (Axio Vert A1, Zeiss) connected to a computer by a camera (Jenoptik, Optical Systems GmbH, D-07729 Jena) thus allowing the artery to be observed in real time in contrast phase with the ProgRes Capture software.

Following initial pressurization, arteries were allowed to recover their basal myogenic tone for 60 min. Baseline internal diameter (ID) was measured using the ProgRes Capture software; 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} M) added to the extraluminal bath. The contractile response rapidly reached a steady state and was measured after a 5 min exposure. Perfusion with KCl was followed by a 5 min washout period to let ID returned to baseline.

To ensure the viability of the MCA throughout the experiment, a solution of serotonin at two different concentrations (10^{-8} M and 10^{-6} M) was added to the extraluminal bath at the end of the experiment. The contractile response was measured after a 5 min exposure for each concentration and expressed as a percentage of change of ID from baseline. Arteries showing less than 20% contraction for these three conditions (KCl and two concentrations of serotonin) were excluded from the results as their integrity is called into question.

Pretreatment with losartan

After KCl viability assessment, MCA were exposed for 30 min to losartan (10^{-5} M) or PSS. This condition will ensure that the observed variations in diameter are AT_1-dependent.

Response of different peptides

Concentration-response curves to peptides (5 min per concentration, from 10^{-12} to 10^{-6} M) were constructed. Exposure times were carried out in the dark when the peptides tested showed fluorescence.

The concentration-response curves for the native peptides (AngII, TRV027, and ScP) were compared to the concentration-response curves for the fluorescent peptides. All these curves were compared with or without pretreatment with losartan. The different conditions were carried out in random order to exclude any time- or age-dependent effects.

Statistical analyses

The ID values were measured by two different operators blind to treatment, ensuring reliable and objective measurements. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism version 8.0.2 (RRID: SCR_002798).

Vasoactive responses of the MCA were expressed as percentage of change in ID relative to the value measured during pretreatment (PSS or losartan). This normalization reduced undesirable sources of variation such as anatomical differences in the arteries. For each condition, the sample size was at least n = 4, except for the MCA pretreated with losartan as the low variability in these control groups allowed a smaller sample size and thus avoided unnecessary deaths of animals.

In order to determine half of the maximum effective concentration (EC_{50}), E_{min} and E_{max}, each individual peptide concentration-response curve was fitted to Hill's equation:

$$\%ID\ change = E_{min} + \frac{(E_{min}+E_{max})}{1+10^{(logEC_{50}-\log(concentration)\times Hill\ slope)}}$$

Differences in vasoactive responses were determined by two statistical tests: a two-way ANOVA (nature of peptide and presence of the fluorophore) followed by a Tukey post hoc test ($P < 0.05$). With TAMRA-AngII probe, the difference in vasoactive response was determined by a one-way ANOVA test (nature of peptide) followed by a Bonferroni post-hoc test ($P < 0.05$).

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge

Additional detailed chemistry methods, NMR spectra, analytical HPLC chromatograms and pharmacological data of the new fluorescent ligands.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*François Dupuis: francois.dupuis@univ-lorraine.fr and *Sandra Lecat: sandra.lecat@unistra.fr

Author Contributions

S.A, M.A and M.C synthesized the fluorescent peptidic ligands derived from AngII, ScP and TRV027. M.B and T.M.N synthesized the fluorescent ligands derived from losartan. C.D, F.D and S.L conceived the *in vitro* experiments. C.D carried out all the experiment. A.K and S.L participated to the flow cytometer and imaging experiments. C.D and F.D conceived the *ex vivo* experiments. C.D, F.D and S.L interpreted the results. C.D and A.D determined the K_D of Cy3-L-Losartan in relation to the density of AT_1 receptors supervised by K.L.M. The manuscript was written through contributions of C.D, M.B, S.A, A.D, K.L.M, F.D and S.L. All authors have given approval to the final version of the manuscript. S.L and F.D contributed equally.

Funding Sources

The work was funded by the French Ministry of Education, Research and Technology (Paris, France, EA3452). The authors acknowledge support of CITHEFOR by the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence" (Investissements d'avenir—ANR) and by the "Projet Interdisciplinarité" of the Université de Lorraine. Part of this work was supported by the Cost ERNEST (Cost action 18133 – STSM). Part of this work was also supported by the IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002) and by the SFRI-STRAT'US project (ANR-20-SFRI-0012) under the framework of the French Program "Investments for the Future" given to the Strasbourg drug discovery and development Institute (IMS), as part of the Interdisciplinary Thematic Institute (ITI) 2021-2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm. The work of KLM and AD was financially supported by the Novo Nordisk Foundation (NNF20OC0064565) (UCPH, DK).

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Frédéric Simonin, head of the GPCRs, pain and inflammation team in Strasbourg for his support on the AT_1 project. The authors thank Louane Pellegrini and Jade Tomassone, the students who contributed to this work. The

authors thank the ACBS animal facility for the shared resource that provides state-of-the-art services in laboratory animal medicine and husbandry. The authors thank the UMS2008 IBSLor for providing access to the Celesta Sorp BD Biosciences flow cytometer. The authors thank the APPEL platform of LCPM for the 1D and 2D NMR analyses of peptides and peptidic-based probes. The authors also thank the UAR 3286 PCBIS for providing access to the Flexstation III microplate reader and to the VictorLight device (Pekin Elmer). We thank Nikos Hatzakis for access to the Olympus IX81 confocal microscope (UCPH, DK). The authors thank Dr. Nevin Lambert for the miniG-venus and PM-venus, PCBIS with Dr. Jacques Haiech and Dr. Marie-Claude Kilhaufer for pIRES-EGFP-AT2, Dr. Julie Perroy for pcDNA3-NLuc[61], Dr. Laurent Prézeau for the pcDNA3.1-βarrestin1 and Dr. Séverine Morisset-Lopez for pcDNA3-βarrestin2-YPET.[56] Special thanks are due to François Dupire for high resolution HPLC-MS measurements.

ABBREVIATIONS

AngII, angiotensin II; ARB, angiotensin receptor blocker; AT1 receptor, angiotensin II type 1 receptor; AT2 receptor, angiotensin II type 2 receptor; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; BSA, bovine serum albumin; Cy3, cyanine 3; GFP, green fluorescent protein; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK, human embryonic kidney; HPLC, high-performance liquid chromatography; ID: internal diameter; MCA, middle cerebral artery; MEM, minimum essential medium; Nluc, nanoluciferase; PBS: phosphate-buffered saline; PM, plasma membrane; PSS, physiological salt solution; ScP, scrambled peptide; TAMRA, tetramethylrhodamine,

REFERENCES

1. Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. Nat Rev Drug Discov *16*, 19–34. 10.1038/nrd.2016.230.
2. Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. J Biol Chem *268*, 24539–24542.
3. Hunyady, L., and Catt, K.J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. Mol Endocrinol *20*, 953–970. 10.1210/me.2004-0536.
4. Kawai, T., Forrester, S.J., O'Brien, S., Baggett, A., Rizzo, V., and Eguchi, S. (2017). AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. Pharmacol Res *125*, 4–13. 10.1016/j.phrs.2017.05.008.
5. Coble, J.P., Grobe, J.L., Johnson, A.K., and Sigmund, C.D. (2015). Mechanisms of brain renin angiotensin system-induced drinking and blood pressure: importance of the subfornical organ. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology *308*, R238–R249. 10.1152/ajpregu.00486.2014.
6. Porrello, E.R., Delbridge, L.M.D., and Thomas, W.G. (2009). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. Front Biosci (Landmark Ed) *14*, 958–972. 10.2741/3289.
7. Steckelings, U.M., Widdop, R.E., Sturrock, E.D., Lubbe, L., Hussain, T., Kaschina, E., Unger, T., Hallberg, A., Carey, R.M., and Sumners, C. (2022). The Angiotensin AT2 Receptor: From a Binding Site to a Novel Therapeutic Target. Pharmacol Rev *74*, 1051–1135. 10.1124/pharmrev.120.000281.
8. Hunyady, L., Catt, K.J., Clark, A.J.L., and Gáborik, Z. (2000). Mechanisms and functions of AT1 angiotensin receptor internalization. Regulatory Peptides *91*, 29–44. 10.1016/S0167-0115(00)00137-3.
9. Kendall, R.T., Lee, M.-H., Pleasant, D.L., Robinson, K., Kuppuswamy, D., McDermott, P.J., and Luttrell, L.M. (2014). Arrestin-dependent Angiotensin AT1 Receptor Signaling Regulates Akt and mTor-mediated Protein Synthesis. J Biol Chem *289*, 26155–26166. 10.1074/jbc.M114.595728.
10. Johnstone, E.K.M., Ayoub, M.A., Hertzman, R.J., See, H.B., Abhayawardana, R.S., Seeber, R.M., and Pfleger, K.D.G. (2022). Novel Pharmacology Following Heteromerization of the Angiotensin II Type 2 Receptor and the Bradykinin Type 2 Receptor. Front Endocrinol (Lausanne) *13*, 848816. 10.3389/fendo.2022.848816.
11. Delaitre, C., Boisbrun, M., Lecat, S., and Dupuis, F. (2021). Targeting the Angiotensin II Type 1 Receptor in Cerebrovascular Diseases: Biased Signaling Raises New Hopes. International Journal of Molecular Sciences *22*, 6738. 10.3390/ijms22136738.
12. Momoniat, T., Ilyas, D., and Bhandari, S. (2019). ACE inhibitors and ARBs: Managing potassium and renal function. Cleve Clin J Med *86*, 601–607. 10.3949/ccjm.86a.18024.
13. Schrader, J., Kulschewski, A., and Dendorfer, A. (2007). Inhibition of the renin-angiotensin system and the prevention of stroke. Am J Cardiovasc Drugs *7*, 25–37. 10.2165/00129784-200707010-00003.
14. Sandset, E.C., Bath, P.M.W., Boysen, G., Jatuzis, D., Kõrv, J., Lüders, S., Murray, G.D., Richter, P.S., Roine, R.O., Terént, A., et al. (2011). The angiotensin-receptor blocker candesartan for treatment of acute stroke (SCAST): a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. Lancet *377*, 741–750. 10.1016/S0140-6736(11)60104-9.
15. Boerrigter, G., Soergel, D.G., Violin, J.D., Lark, M.W., and Burnett, J.C. (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. 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.969220.
16. Lino, C.A., and Barreto-Chaves, M.L. (2022). Beta-arrestins in the context of cardiovascular diseases: Focusing on angiotensin II type 1 receptor (AT1R). Cell Signal *92*, 110253. 10.1016/j.cellsig.2022.110253.
17. Violin, J.D., DeWire, S.M., Yamashita, D., Rominger, D.H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E.J., Gowen, M., and Lark, M.W. (2010). Selectively Engaging β-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. J Pharmacol Exp Ther *335*, 572–579. 10.1124/jpet.110.173005.
18. Herrera Marcela, Sparks Matthew A., Alfonso-Pecchio Adolfo R., Harrison-Bernard Lisa M., and Coffman Thomas M. (2013). Lack of Specificity of Commercial Antibodies Leads to Misidentification of Angiotensin Type 1 Receptor Protein.

Hypertension *61*, 253–258. 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.203679.
19. Bouressam, M.-L., Lartaud, I., Dupuis, F., and Lecat, S. (2018). No answer to the lack of specificity: mouse monoclonal antibody targeting the angiotensin II type 1 receptor AT1 fails to recognize its target. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *391*, 883–889. 10.1007/s00210-018-1522-4.
20. Murphy, K.T., Hossain, M.I., Swiderski, K., Chee, A., Naim, T., Trieu, J., Haynes, V., Read, S.J., Stapleton, D.I., Judge, S.M., et al. (2019). Mas Receptor Activation Slows Tumor Growth and Attenuates Muscle Wasting in Cancer. Cancer Res *79*, 706–719. 10.1158/0008-5472.CAN-18-1207.
21. Deminice, R., Hyatt, H., Yoshihara, T., Ozdemir, M., Nguyen, B., Levine, S., and Powers, S. (2020). Human and Rodent Skeletal Muscles Express Angiotensin II Type 1 Receptors. Cells *9*, 1688. 10.3390/cells9071688.
22. White, C.W., Johnstone, E.K.M., See, H.B., and Pfleger, K.D.G. (2019). NanoBRET ligand binding at a GPCR under endogenous promotion facilitated by CRISPR/Cas9 genome editing. Cellular Signalling *54*, 27–34. 10.1016/j.cellsig.2018.11.018.
23. Soave, M., Briddon, S.J., Hill, S.J., and Stoddart, L.A. (2019). Fluorescent ligands: Bringing light to emerging GPCR paradigms. British Journal of Pharmacology *177*, 978–991. 10.1111/bph.14953.
24. 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. 10.1074/jbc.M203606200.
25. Sridharan, R., Zuber, J., Connelly, S.M., Mathew, E., and Dumont, M.E. (2014). Fluorescent Approaches for Understanding Interactions of Ligands with G Protein Coupled Receptors. Biochim Biophys Acta *1838*, 15–33. 10.1016/j.bbamem.2013.09.005.
26. Stoddart, L.A., Johnstone, E.K.M., Wheal, A.J., Goulding, J., Robers, M.B., Machleidt, T., Wood, K.V., Hill, S.J., and Pfleger, K.D.G. (2015). Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs. Nat Methods *12*, 661–663. 10.1038/nmeth.3398.
27. Stoddart, L.A., White, C.W., Nguyen, K., Hill, S.J., and Pfleger, K.D.G. (2016). Fluorescence- and bioluminescence-based approaches to study GPCR ligand binding. British Journal of Pharmacology *173*, 3028–3037. 10.1111/bph.13316.
28. Soave, M., Stoddart, L.A., White, C.W., Kilpatrick, L.E., Goulding, J., Briddon, S.J., and Hill, S.J. (2021). Detection of genome-edited and endogenously expressed G protein-coupled receptors. FEBS J *288*, 2585–2601. 10.1111/febs.15729.
29. Von Bohlen, O., and Halbach, U. (1999). The isolated mammalian brain: an in vivo preparation suitable for pathway tracing. European Journal of Neuroscience *11*, 1096–1100. 10.1046/j.1460-9568.1999.00543.x.
30. Ali, A., Johnstone, E.K.M., Baby, B., See, H.B., Song, A., Rosengren, K.J., Pfleger, K.D.G., Ayoub, M.A., and Vijayan, R. (2021). Insights into the Interaction of LVV-Hemorphin-7 with Angiotensin II Type 1 Receptor. International Journal of Molecular Sciences *22*, 209. 10.3390/ijms22010209.
31. Johnstone, E.K.M., See, H.B., Abhayawardana, R.S., Song, A., Rosengren, K.J., Hill, S.J., and Pfleger, K.D.G. (2021). Investigation of Receptor Heteromers Using NanoBRET Ligand Binding. International Journal of Molecular Sciences *22*, 1082. 10.3390/ijms22031082.
32. Johnstone, E.K.M., and Pfleger, K.D.G. (2021). Profiling novel pharmacology of receptor complexes using Receptor-HIT. Biochemical Society Transactions *49*, 1555–1565. 10.1042/BST20201110.
33. Tóth, A.D., Garger, D., Prokop, S., Soltész-Katona, E., Várnai, P., Balla, A., Turu, G., and Hunyady, L. (2021). A general method for quantifying ligand binding to unmodified receptors using Gaussia luciferase. Journal of Biological Chemistry *296*, 100366. 10.1016/j.jbc.2021.100366.
34. Kamarulzaman, E.E., Gazzali, A.M., Acherar, S., Frochot, C., Barberi-Heyob, M., Boura, C., Chaimbault, P., Sibille, E., Wahab, H.A., and Vanderesse, R. (2015). New Peptide-Conjugated Chlorin-Type Photosensitizer Targeting Neuropilin-1 for Anti-Vascular Targeted Photodynamic Therapy. International Journal of Molecular Sciences *16*, 24059–24080. 10.3390/ijms161024059.
35. Meyer, M., Foulquier, S., Dupuis, F., Flament, S., Grimaud, L., Henrion, D., Lartaud, I., Monard, G., Grillier-Vuissoz, I., and Boisbrun, M. (2018). Synthesis and evaluation of new designed multiple ligands directed towards both peroxisome proliferator-activated receptor-γ and angiotensin II type 1 receptor. European Journal of Medicinal Chemistry *158*, 334–352. 10.1016/j.ejmech.2018.08.082.
36. Breschi, M.C., Calderone, V., Digiacomo, M., Macchia, M., Martelli, A., Martinotti, E., Minutolo, F., Rapposelli, S., Rossello, A., Testai, L., et al. (2006). New NO-Releasing Pharmacodynamic Hybrids of Losartan and Its Active Metabolite: Design, Synthesis, and Biopharmacological Properties. J. Med. Chem. *49*, 2628–2639. 10.1021/jm0600186.
37. Beer, P.D., Cadman, J., Lloris, J.M., Martínez-Máñez, R., Soto, J., Pardo, T., and Marcos, M.D. (2000). Anion interaction with ferrocene-functionalised cyclic and open-chain polyaza and aza-oxa cycloalkanes. J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1805–1812. 10.1039/B000079P.
38. Ma, Y., Dias, A., Brinkenfeldt, N.K., and Martinez, K.L. Quantitative fluorescence imaging of ligand binding events on the β1- adrenergic receptor. in preparation.
39. Unal, H., and Karnik, S.S. (2014). Constitutive Activity in the Angiotensin II Type 1 Receptor: Discovery and Applications. Adv Pharmacol *70*, 155–174. 10.1016/B978-0-12-417197-8.00006-7.
40. Pires, P.W., Ko, E., Pritchard, H.A.T., Rudokas, M., Yamasaki, E., and Earley, S. (2017). The angiotensin II receptor type 1b is the primary sensor of intraluminal pressure in cerebral artery smooth muscle cells. J Physiol *595*, 4735–4753. 10.1113/JP274310.
41. Lavington, S., and Watts, A. (2020). Lipid nanoparticle technologies for the study of G protein-coupled receptors in lipid environments. Biophys Rev *12*, 1287–1302. 10.1007/s12551-020-00775-5.
42. Wan, Q., Okashah, N., Inoue, A., Nehmé, R., Carpenter, B., Tate, C.G., and Lambert, N.A. (2018).

Mini G protein probes for active G protein-coupled receptors (GPCRs) in live cells. J Biol Chem *293*, 7466–7473. 10.1074/jbc.RA118.001975.

43. Tadevosyan, A., Létourneau, M., Folch, B., Doucet, N., Villeneuve, L.R., Mamarbachi, A.M., Pétrin, D., Hébert, T.E., Fournier, A., Chatenet, D., et al. (2015). Photoreleasable ligands to study intracrine angiotensin II signalling. J Physiol *593*, 521–539. 10.1113/jphysiol.2014.279109.
44. Li, A., Liu, S., Huang, R., Ahn, S., and Lefkowitz, R.J. (2023). Loss of biased signaling at a G proteincoupled receptor in overexpressed systems. PLoS One *18*, e0283477. 10.1371/journal.pone.0283477.
45. Fillion, D., Devost, D., Sleno, R., Inoue, A., and Hébert, T.E. (2019). Asymmetric Recruitment of β-Arrestin1/2 by the Angiotensin II Type I and Prostaglandin F2α Receptor Dimer. Front Endocrinol (Lausanne) *10*, 162. 10.3389/fendo.2019.00162.
46. Michel, G., Matthes, H.W.D., Hachet-Haas, M., Baghdadi, K.E., Mey, J. de, Pepperkok, R., Simpson, J.C., Galzi, J.-L., and Lecat, S. (2014). Plasma membrane translocation of REDD1 governed by GPCRs contributes to mTORC1 activation. J Cell Sci *127*, 773–787. 10.1242/jcs.136432.
47. René, P., Lanfray, D., Richard, D., and Bouvier, M. (2021). Pharmacological chaperone action in humanized mouse models of MC4R-linked obesity. JCI Insight *6*, e132778, 132778. 10.1172/jci.insight.132778.
48. Esteoulle, L., Daubeuf, F., Collot, M., Riché, S., Durroux, T., Brasse, D., Marchand, P., Karpenko, J., Klymchenko, A.S., and Bonnet, D. (2020). A near-infrared fluorogenic dimer enables background-free imaging of endogenous GPCRs in living mice. Chem. Sci. *11*, 6824–6829. 10.1039/D0SC01018A.
49. Comeo, E., Kindon, N.D., Soave, M., Stoddart, L.A., Kilpatrick, L.E., Scammells, P.J., Hill, S.J., and Kellam, B. (2020). Subtype-Selective Fluorescent Ligands as Pharmacological Research Tools for the Human Adenosine A2A Receptor. J. Med. Chem. *63*, 2656–2672. 10.1021/acs.jmedchem.9b01856.
50. Comeo, E., Trinh, P., Nguyen, A.T., Nowell, C.J., Kindon, N.D., Soave, M., Stoddart, L.A., White, J.M., Hill, S.J., Kellam, B., et al. (2021). Development and Application of Subtype-Selective Fluorescent Antagonists for the Study of the Human Adenosine A1 Receptor in Living Cells. J Med Chem *64*, 6670–6695. 10.1021/acs.jmedchem.0c02067.
51. Colin, M., Delaitre, C., Foulquier, S., and Dupuis, F. (2023). The AT1/AT2 Receptor Equilibrium Is a Cornerstone of the Regulation of the Renin Angiotensin System beyond the Cardiovascular System. Molecules *28*, 5481. 10.3390/molecules28145481.
52. Gottlieb, H.E., Kotlyar, V., and Nudelman, A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. J. Org. Chem. *62*, 7512–7515. 10.1021/jo971176v.
53. 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. 10.1038/sj.bjp.0706725.
54. Bouressam, M.-L., Lecat, S., Raoul, A., Gaucher, C., Perrin-Sarrado, C., Lartaud, I., and Dupuis, F. (2019). S-nitrosoglutathione inhibits cerebrovascular angiotensin II-dependent and -independent AT1 receptor responses: A possible role of S-nitrosation. British Journal of Pharmacology *176*, 2049–2062. 10.1111/bph.14644.
55. 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 *. Journal of Biological Chemistry *274*, 37915–37922. 10.1074/jbc.274.53.37915.
56. El Khamlichi, C., Reverchon-Assadi, F., Hervouet-Coste, N., Blot, L., Reiter, E., and Morisset-Lopez, S. (2019). Bioluminescence Resonance Energy Transfer as a Method to Study Protein-Protein Interactions: Application to G Protein Coupled Receptor Biology. Molecules *24*, 537. 10.3390/molecules24030537.
57. Kuravi, S., Lan, T.-H., Barik, A., and Lambert, N.A. (2010). Third-Party Bioluminescence Resonance Energy Transfer Indicates Constitutive Association of Membrane Proteins: Application to Class A G-Protein-Coupled Receptors and G-Proteins. Biophys J *98*, 2391–2399. 10.1016/j.bpj.2010.02.004.
58. Duran-Corbera, A., Faria, M., Ma, Y., Prats, E., Dias, A., Catena, J., Martinez, K.L., Raldua, D., Llebaria, A., and Rovira, X. (2022). A Photoswitchable Ligand Targeting the β1-Adrenoceptor Enables Light-Control of the Cardiac Rhythm**. Angewandte Chemie International Edition *61*, e202203449. 10.1002/anie.202203449.
59. Brinkenfeldt, N.K., Dias, A., Moreno-Pescador, G., Bendix, P.M., and Martinez, K.L. (2023). Quantitative Determination of Protein Concentrations in Living Cells. Preprint at bioRxiv, 10.1101/2023.05.31.542874 10.1101/2023.05.31.542874.
60. 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. 10.1161/STROKEAHA.108.531707.
61. Goyet, E., Bouquier, N., Ollendorff, V., and Perroy, J. (2016). Fast and high resolution single-cell BRET imaging. Sci Rep *6*, 28231. 10.1038/srep28231.

Supporting Information

Synthesis and pharmacological characterization of fluorescent ligands targeting the angiotensin II receptors derived from agonist, β-arrestin-biased agonist and antagonist

Céline Delaitre,[1,2] Michel Boisbrun,[3] Samir Acherar,[4] André Dias,[5] Alexandra Kleinclauss,[1] Mathilde Achard,[4] Mélissa Colin,[1] Trung Minh Nguyen,[3] Karen L. Martinez,[5] Sandra Lecat,[2*] François Dupuis[1*]

[1] Université de Lorraine, EA 3452 CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

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

[3] Université de Lorraine, CNRS, L2CM, F-54000 Nancy, France

[4] Université de Lorraine, CNRS, LCPM, F-54000 Nancy, France

[5] Department of Chemistry and Nano-Science Center, University of Copenhagen, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg, Denmark

Table of contents

1. **Data for peptides and peptide-based probes 1-6 (with or without linker)** **S3**
2. **Proton chemical shifts of peptides (AngII and ScP) and their related Cy3- peptide-based probes 1-4 (with or without linker)** **S4**
3. **Proton chemical shifts of TRV027 peptide and their related peptide-based probes 5-6 (with or without linker)** **S5**
4. **NMR spectra and LC-MS analysis of AngII (DRVYIHPF sequence)** **S6**
5. **NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-AngII (1)** **S10**
6. **NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-L-AngII (2)** **S14**
7. **NMR spectra and LC-MS analysis of ScP (DRVYIHPF sequence)** **S18**
8. **NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-ScP (3)** **S22**
9. **NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-L-ScP (4)** **S26**
10. **NMR spectra and LC-MS analysis of TRV027 (DRVYIHPF sequence)** **S30**
11. **NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-TRV027 (5)** **S34**
12. **NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-L-TRV027 (6)** **S38**
13. **NMR spectra of antagonist-based molecule 10** **S42**
14. **NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-L-Losartan (11)** **S45**
15. **Pharmacological characterization of scramble peptide (ScP)** **S49**
16. **Selectivity of the new fluorescent ligands at one dose and with dose response curves by flow cytometry** **S53**
17. **Representative confocal images** **S56**
18. **AT1 dependent calcium responses by fluorescent derivatives based on TRV027** **S57**

1. Data for peptides and peptide-based probes 1-6 (with or without linker)

Table S1: HPLC, LC-MS and HRMS data

Compounds	RP-C18 Columns	Preparative HPLC (Purification)[c]		Analytical LC-MS (Purity)[c]			HRMS[f]	
		Gradient Elution[d]	Yield	Gradient Elution[e]	Retention Time	Purity	Calcd	Obs
AngII	Nucleosil[a] (Macherey-Nagel)	1) 10–100% B over 25 min 2) 100% B over 10 min Flow rate of 7 mL/min	23%	10–100% B over 25 min Flow rate of 0.8 mL/min	8.3	95.3%	523.7750	523.7964
Scramble		5–100% B over 25 min Flow rate of 7 mL/min	55%	0–100% B over 25 min Flow rate of 0.8 mL/min	14.3	99.2%	523.7750	523.7853
TRV027		1) 5–100% B over 25 min 2) 100% B over 5 min Flow rate of 7 mL/min	34%	5–100% B over 25 min Flow rate of 0.8 mL/min	11.5	96.5%	463.7644	463.7730
Cy3-AngII (**1**)	Pursuit[b] (Agilent)	1) 5–100% B over 15 min 2) 100% B over 10 min Flow rate of 8 mL/min	42%	1) 5–100% B over 15 min 2) 100% B over 10 min Flow rate of 0.8 mL/min	11.4	95.2%	495.6108	495.6203
Cy3-ScP (**3**)			50%		11.7	92.5%	495.6108	495.6189
Cy3-TRV027 (**5**)			50%		11.8	96.9%	455.6013	455.6175
Cy3-L-AngII (**2**)			36%		11.3	94.0%	548.6407	548.6446
Cy3-L-ScP (**4**)			22%		11.6	95.2%	548.6407	548.6583
Cy3-L-TRV027 (**6**)			25%		11.7	93.0%	508.6311	508.6387

[a] Preparative (5 µm, 21 x 250 mm) and analytical (5 µm, 4.6 x 250 mm); [b] Preparative (5 µm, 21 x 150 mm) and analytical (5 µm, 4.6 x 150 mm); [c] UV detection at 280 nm; [d] Mobile-phases: A (H_20 + 0.1% TFA) and B (CH_3CN + 0.1% TFA); [e] Mobile-phases: A (H_20/ CH_3CN (95/5) + 0.1% HCO_2H) and B (CH_3CN + 0.1% HCO_2H); [f] Exact mass of the major peak $[M+2H]^+$ for peptides and $[M+3H]^+$ for **1**-**6**.

2. Proton chemical shifts of peptides (AngII and ScP) and their related peptide-based probes 1-4 (with or without linker)

Table S2: ^{1}H NMR chemicals shifts (DMSO-d_6, 400 MHz)

		AngII (DRVYIHPF)	Cy3-AngII (1)	Cy3-L-AngII (2)	ScP (YFHPDVIR)	Cy3-ScP (3)	Cy3-L-ScP (4)
Asp	**NH**	–	8.17	8.22	8.43	8.03	7.95
	αCH	4.20	4.58	4.58	4.59	4.41	4.38
	βCH$_2$	2.78/2.68	2.80/2.63	2.80/2.66	2.72/2.55	2.77/2.54	2.77/2.53
	COOH	12.40	12.41	12.41	12.55	12.49	12.48
Arg	**NH**	8.57	7.98	7.99	8.18	8.18	8.17
	αCH	4.42	4.27	4.26	4.18	4.17	4.13
	βCH$_2$	1.67	1.68	1.68	1.72/1.58	1.73/1.58	1.72/1.58
	γCH$_2$	1.45	1.46	1.46	1.47	1.46	1.48
	δCH$_2$	3.09	3.06	3.06	3.09	3.09	3.08
	εNH	7.62	7.55	7.54	7.67	7.66	7.67
Val	**NH**	7.86	7.68	7.68	7.50	7.45	7.47
	αCH	4.15	4.15	4.14	4.22	4.20	4.21
	βCH	1.94	1.91	1.93	1.95	1.94	1.93
	2 γCH$_3$	0.79/0.77	0.74	0.74	0.79/0.77	0.79/0.77	0.79/0.77
Tyr	**NH**	8.71	8.20	8.22	8.42	8.04	8.04
	αCH	4.55	4.58	4.57	3.93	4.52	4.49
	βCH$_2$	2.96/2.88	2.65/2.49	2.66/2.50	2.96/2.69	2.95/2.79	2.96/2.78
	2,6H	7.02	7.00	7.00	7.04	7.00	6.95
	3,5H	6.61	6.60	6.61	6.68	6.65	6.60
	OH	9.21	9.22	9.23	9.39	9.19	9.19
Ile	**NH**	7.82	7.83	7.82	7.88	7.90	7.86
	αCH	4.11	4.10	4.12	4.18	4.18	4.16
	βCH	1.64	1.65	1.64	1.75	1.74	1.72
	γCH$_2$	1.36/1.05	1.37/1.05	1.37/1.05	1.45/1.08	1.44/1.07	1.41/1.07
	γCH$_3$	0.74	0.74	0.74	0.81	0.82	0.83
	δCH$_3$	0.75	0.74	0.74	0.83	0.84	0.85
His	**NH**	8.31	8.17	8.22	8.68	8.48	8.45
	αCH	4.76	4.60	4.58	4.83	4.83	4.82
	βCH$_2$	3.01/2.94	2.66/2.50	2.66/2.50	3.09/2.95	3.09/2.97	3.08/2.95
	4H	7.26	7.25	7.26	7.37	7.36	7.36
	2H	8.29	8.38	8.36	8.92	8.92	8.93
	1H (NH)	14.13	14.15	14.15	14.23	14.19	14.20
Pro	**αCH**	4.34	4.38	4.36	4.32	4.32	4.31
	βCH$_2$	2.01/1.80	2.00/1.78	2.02/1.78	2.02/1.84	2.02/1.83	2.05/1/84
	γCH$_2$	1.78	1.78	1.78	1.75	1.77	1.79
	δCH$_2$	3.65/3.49	3.67/3.52	3.66/3.52	3.51/3.46	3.49/3.43	3.51/3.42
Phe	**NH**	8.01	8.01	8.00	8.77	8.40	8.39
	αCH	4.49	4.49	4.48	4.62	4.53	4.57
	βCH$_2$	2.78/2.66	2.82/2.63	2.82/2.66	2.99/2.83	2.72/2.56	2.71/2.54
	ArH	7.26-7.20	7.33-7.17	7.35-7.20	7.32-7.19	7.31-7.17	7.32-7.16
Cy3	**αCH$_2$**		2.12	2.08		2.12	2.10
	βCH$_2$		1.62-1.53	1.62-1.52		1.57 -1.39	1.62-1.48
	γCH$_2$		1.48 -1.39	1.47-1.37		1.33-1.18	1.45-1.31
	δCH$_2$		1.79	1.77		1.76	1.77
	εCH$_2$		4.12	4.11		4.03	4.09
	4 CH$_3$		1.69	1.68		1.69	1.68
	NCH$_3$		3.64	3.65		3.64	3.65
	1H/3H		6.48/6.46	6.49/6.46		6.49/6.46	6.49/6.46
	2H		8.35	8.34		8.33	8.33
	4H/4'H		7.63	7.63		7.63	7.63
	5H/5'H		7.28	7.28		7.30	7.30
	6H/6'H		7.50-7.44	7.47-7.43		7.48-7.43	7.48-7.41
	7H/7'H		7.33	7.32		7.32	7.31
Linker	**NH**			7.85			7.91
	αCH$_2$			2.35			2.25
	βCH$_2$			3.57			3.55
	γCH$_2$			3.46			3.45
	δCH$_2$			3.46			3.45
	εCH$_2$			3.57			3.55
	ξCH$_2$			3.18			3.29

3. Proton chemical shifts of TRV027 peptide and their related peptide-based probes 5-6 (with or without linker)

Table S3: ^{1}H NMR chemicals shifts (DMSO-d_6, 400 MHz)

		TRV027 (Sar-RVYIHPa)	Cy3-TRV027 (5)	Cy3-L-TRV027 (6)
Sar	**αCH$_2$**	2.69	2.73	2.74
	NCH$_3$	2.89	2.91	2.93
Arg	**NH**	8.62	8.11	8.09
	αCH	4.42	4.33	4.35
	βCH$_2$	1.61/1.50	1.62/1.52	1.64/1.53
	γCH$_2$	1.42	1.45	1.46
	δCH$_2$	3.07	3.10	3.08
	εNH	7.56	7.66	7.63
Val	**NH**	7.89	7.75	7.70
	αCH	4.18	4.12	4.17
	βCH	1.96	1.90	1.93
	2 γCH$_3$	0.78	0.75/0.74	0.75/0.74
Tyr	**NH**	8.01	8.01	8.02
	αCH	4.51	4.51	4.51
	βCH$_2$	2.81/2.67	2.82/2.63	2.81/2.64
	2,6H	7.02	7.00	7.01
	3,5H	6.61	6.60	6.61
	OH	9.19	9.21	9.22
Ile	**NH**	7.91	7.87	7.86
	Ach	4.14	4.08	4.13
	βCH	1.64	1.72	1.65
	γCH$_2$	1.38/1.06	1.39/1.05	1.38/1.07
	γCH$_3$	0.78	0.78	0.77
	δCH$_3$	0.78	0.77	0.79
His	**NH**	8.34	8.42	8.39
	αCH	4.70	4.79	4.81
	βCH$_2$	3.06/2.91	3.07/2.93	3.08/2.89
	4H	7.29	7.38	7.38
	2H	8.72	8.93	8.93
	1H (NH)	14.19	14.20	14.23
Pro	**αCH**	4.28	4.32	4.32
	βCH$_2$	2;03/1.80	2.05/1.85	2.05/1.87
	γCH$_2$	1.80	1.78	1.78
	δCH$_2$	3.55	3.63/3.51	3.62/3.53
Ala	**NH**	7.92	8.19	8.19
	αCH	4.22	4.25	4.26
	βCH$_3$	1;23	1.24	1.24
Cy3	**αCH$_2$**		2.19	2.08
	βCH$_2$		1.59-1.49	1.59-1.48
	γCH$_2$		1.47-1.29	1.44-1.31
	δCH$_2$		1.72	1.72
	εCH$_2$		4.11	4.11
	4 CH$_3$		1.68	1.69
	NCH$_3$		3.64	3.65
	1H/3H		6.49/6.46	6.49/6.46
	2H		8.34	8.34
	4H/4'H		7.63	7.63
	5H/5'H		7.30	7.28
	6H/6'H		7.48-7.39	7.4787.39
	7H/7'H		7.33	7.31
Linker	**NH**			7.85
	αCH$_2$			2.45
	βCH$_2$			3.57
	γCH$_2$			3.35
	δCH$_2$			3.37
	εCH$_2$			3.59
	ξCH$_2$			3.16

4. NMR spectra and LC-MS analysis of AngII (DRVYIHPF sequence)

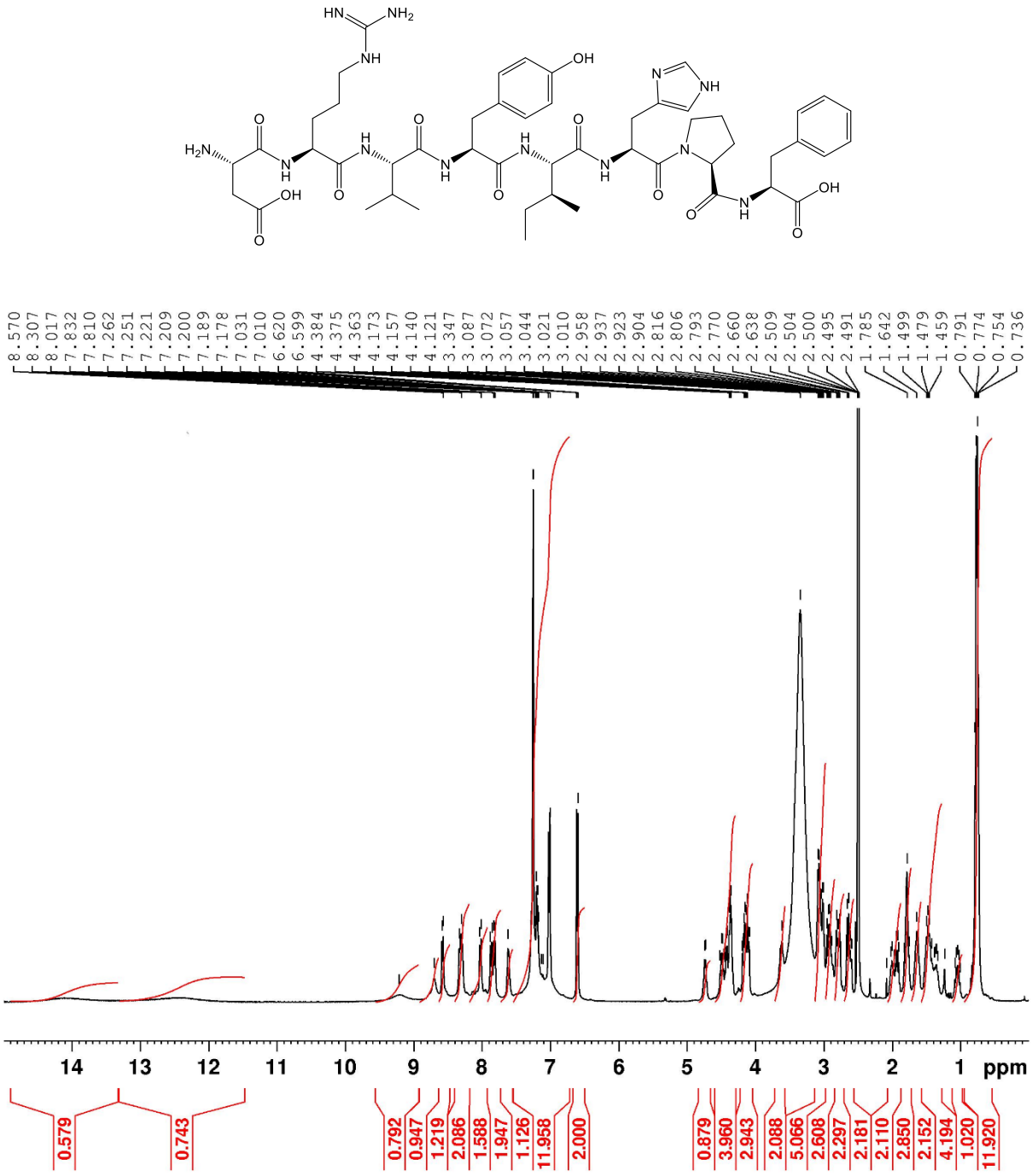


Figure S1: ^{1}H NMR spectrum of AngII (DMSO-d_6, 400 MHz)

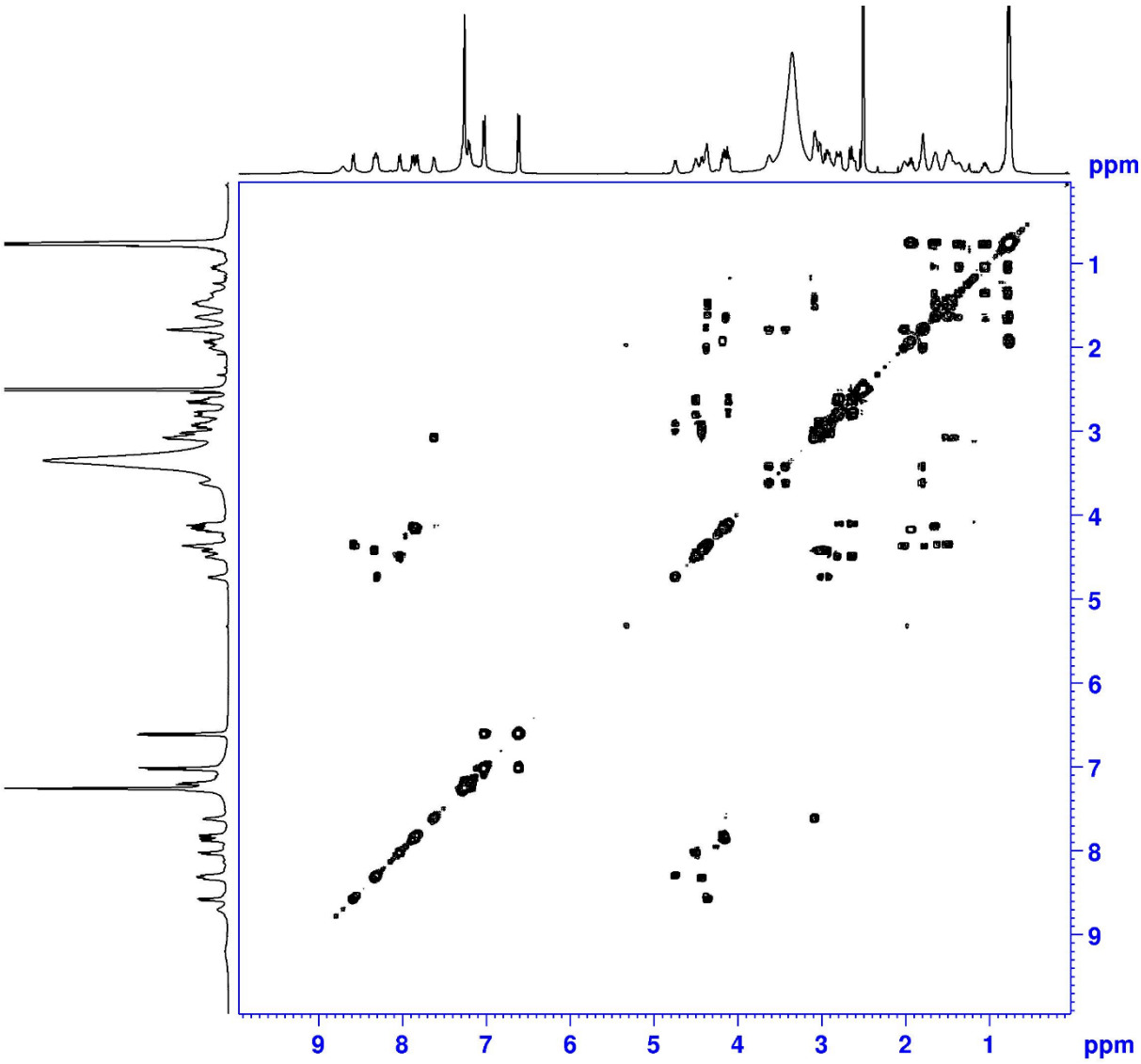


Figure S2: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of AngII (DMSO-d_6, 400 MHz)

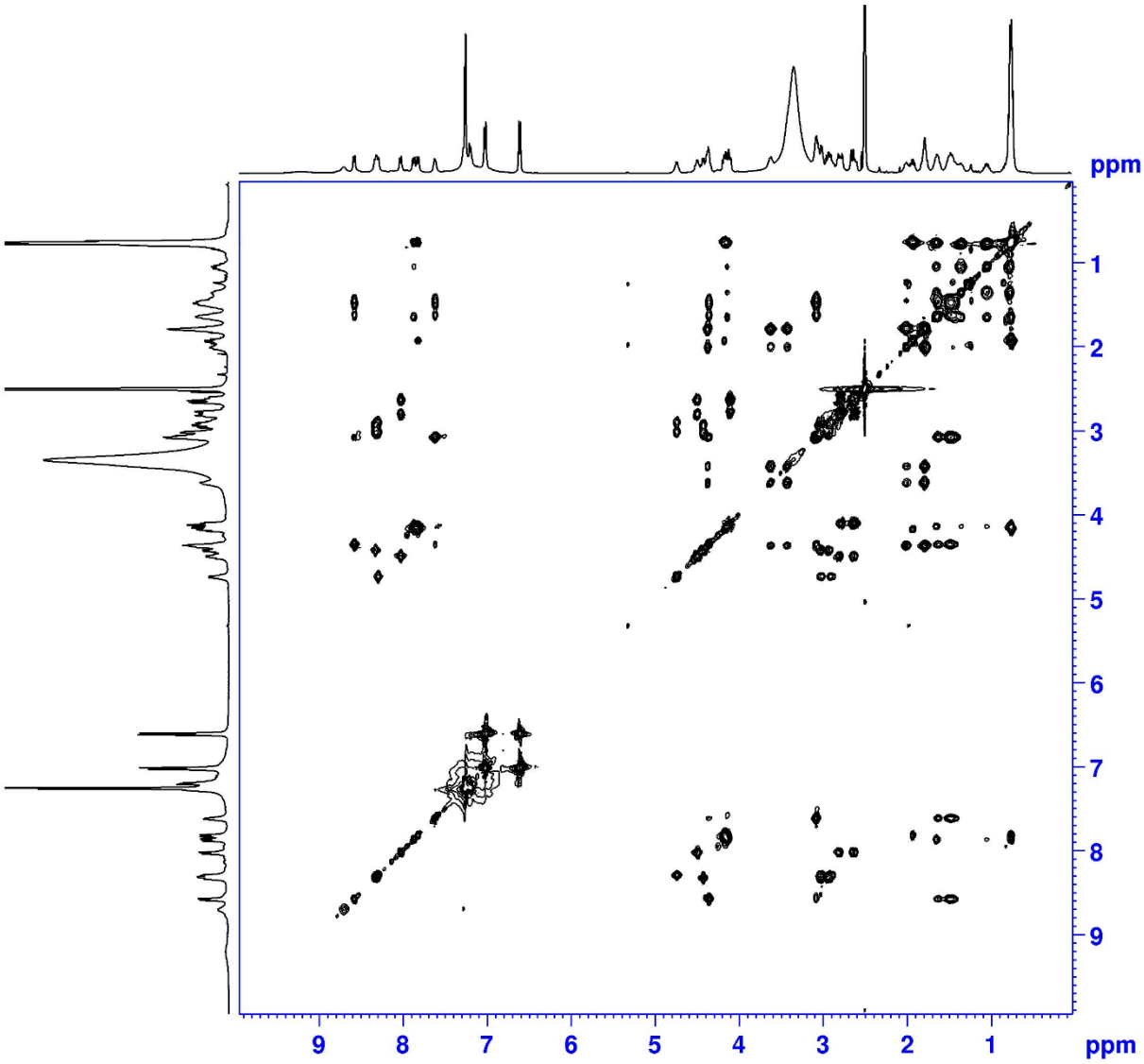


Figure S3: ^{1}H-^{1}H TOCSY NMR spectrum of AngII (DMSO-d_6, 400 MHz)

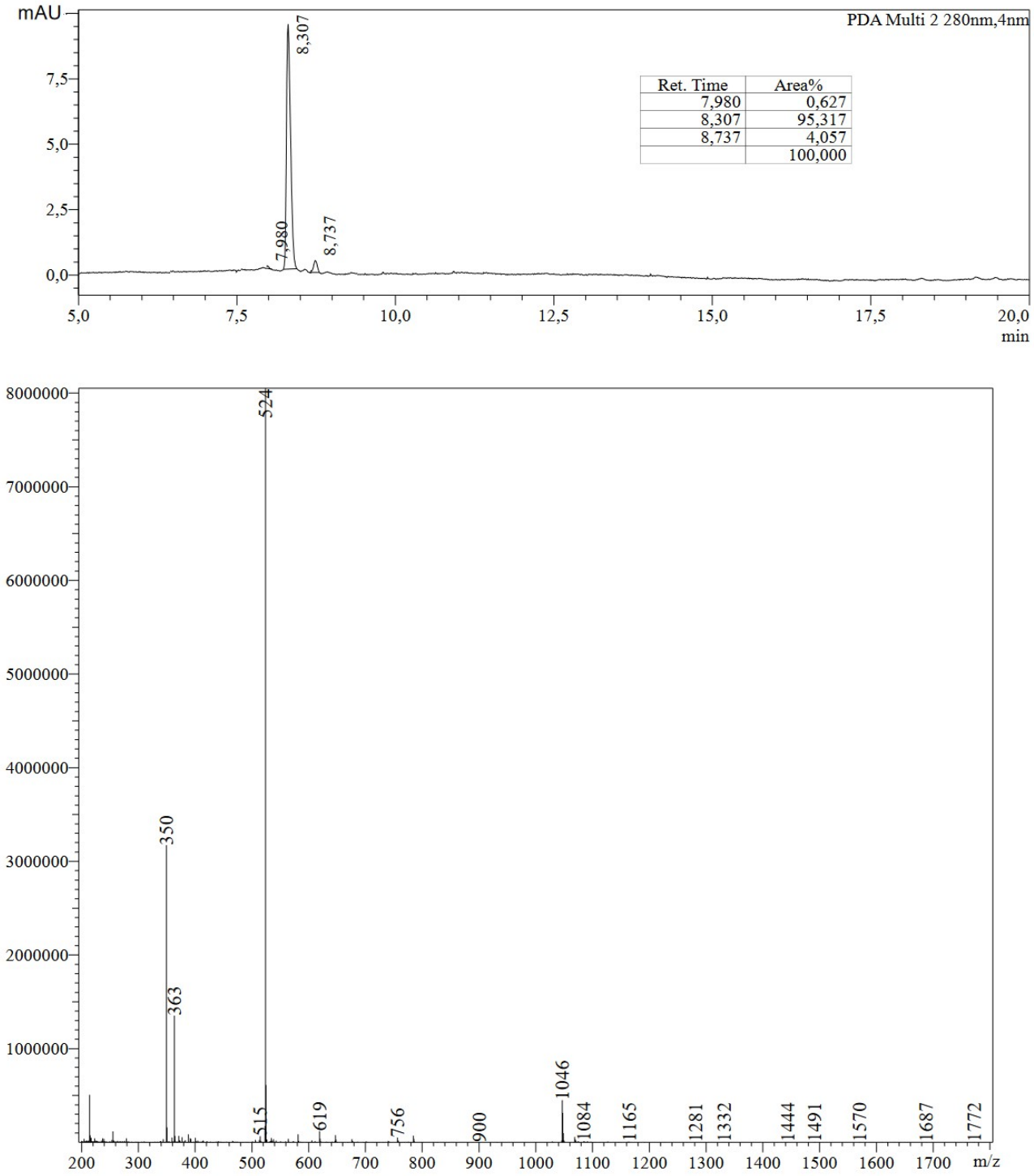


Figure S4: LC-MS analysis of AngII (see Table S1). 1) Upper part: HPLC chromatogram. 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode (LCMS-2020 detector).

5. NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-AngII (1)

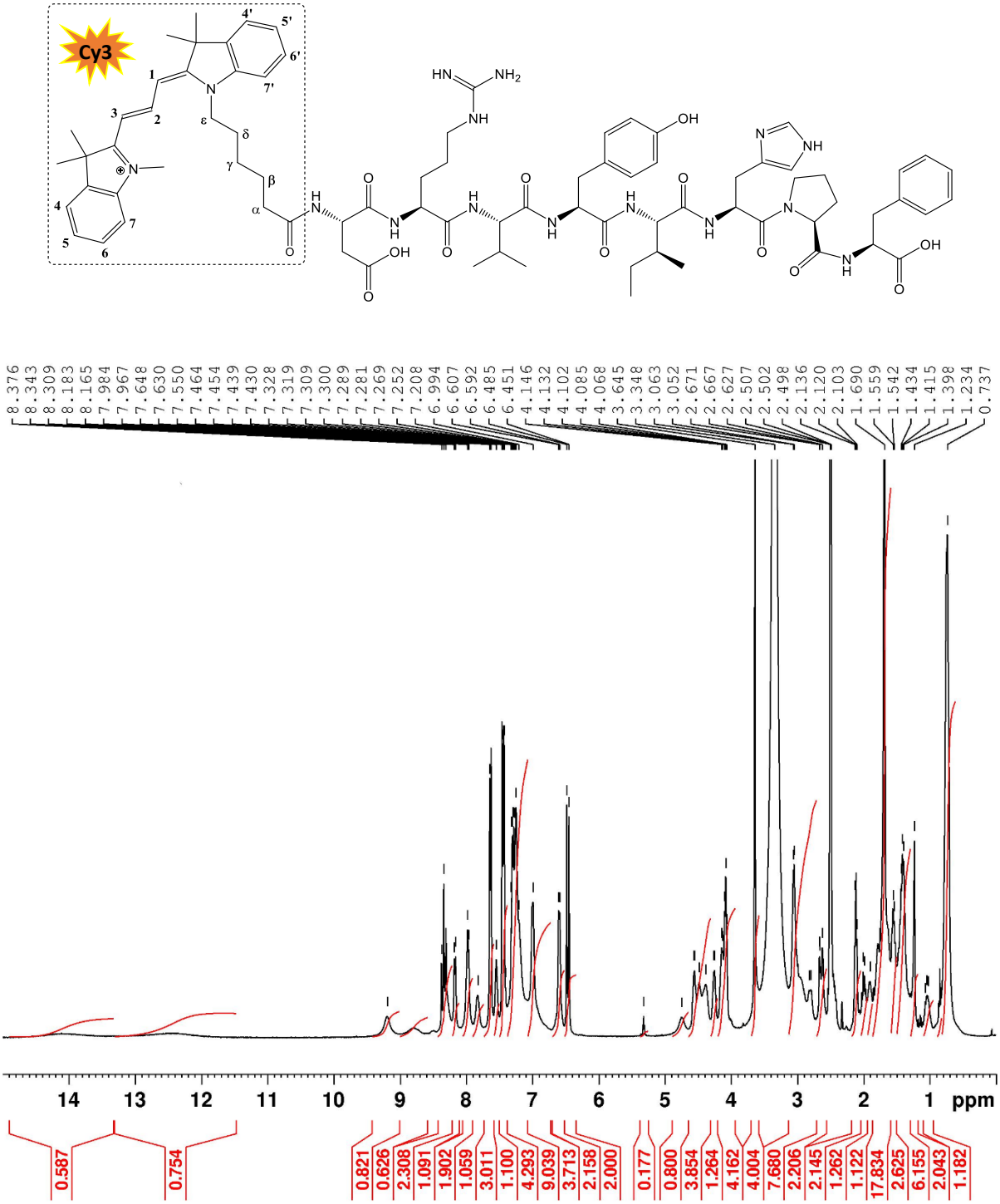


Figure S5: ^{1}H NMR spectrum of Cy3-AngII **1** (DMSO-d_6, 400 MHz)

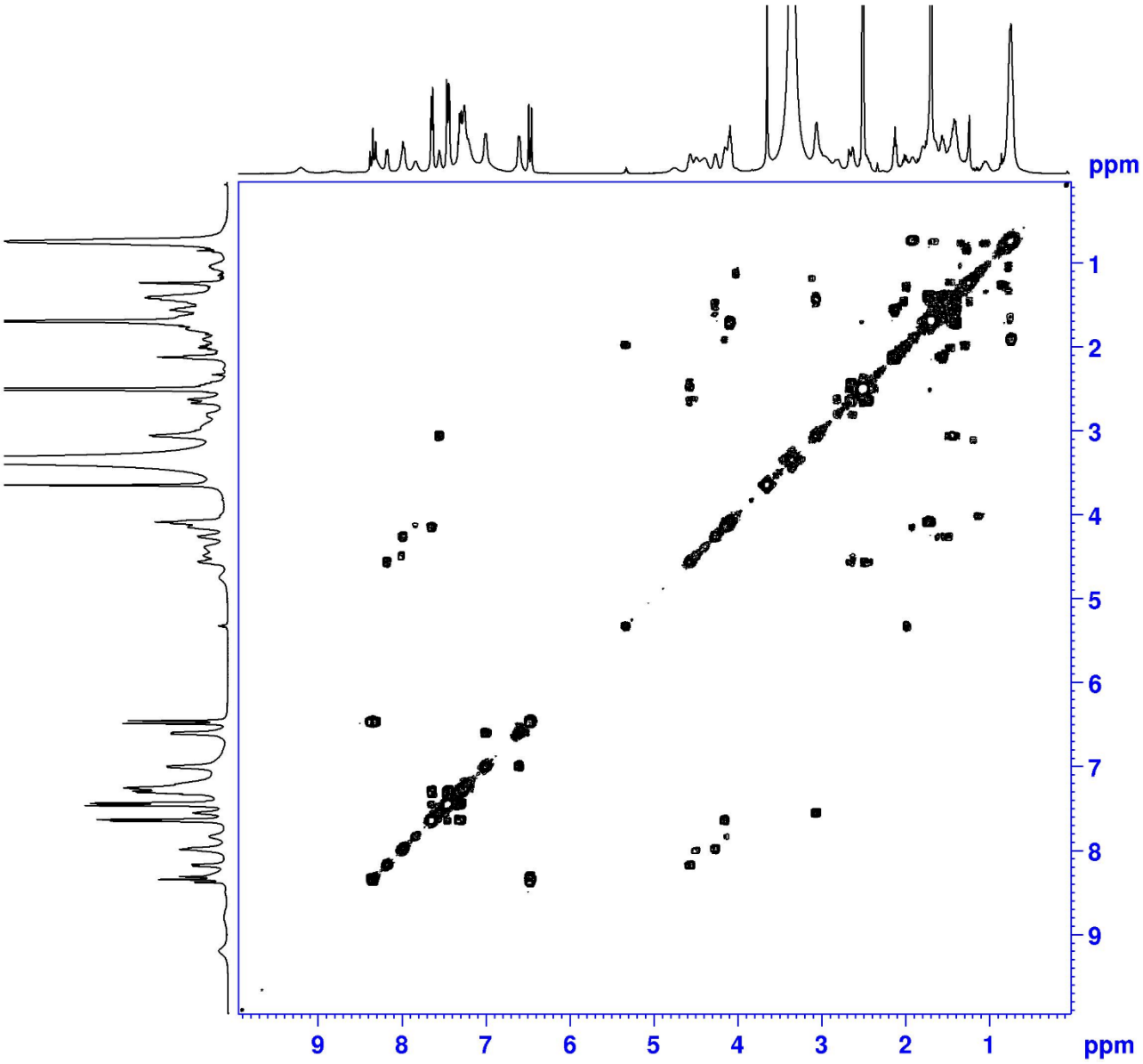


Figure S6: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of Cy3-AngII **1** (DMSO-d_6, 400 MHz)

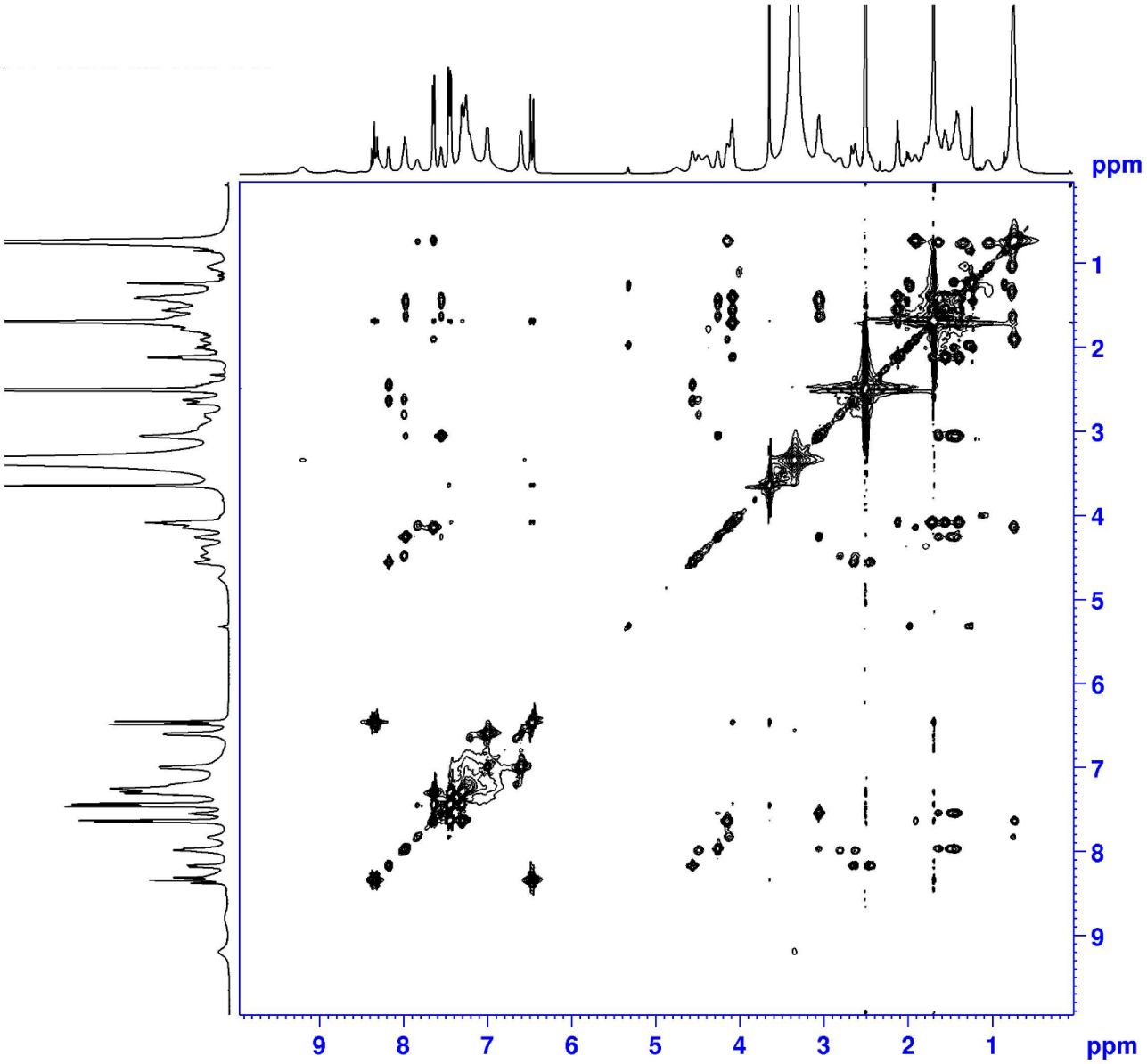


Figure S7: ^{1}H-^{1}H TOCSY NMR spectrum of Cy3-AngII **1** (DMSO-d_6, 400 MHz)

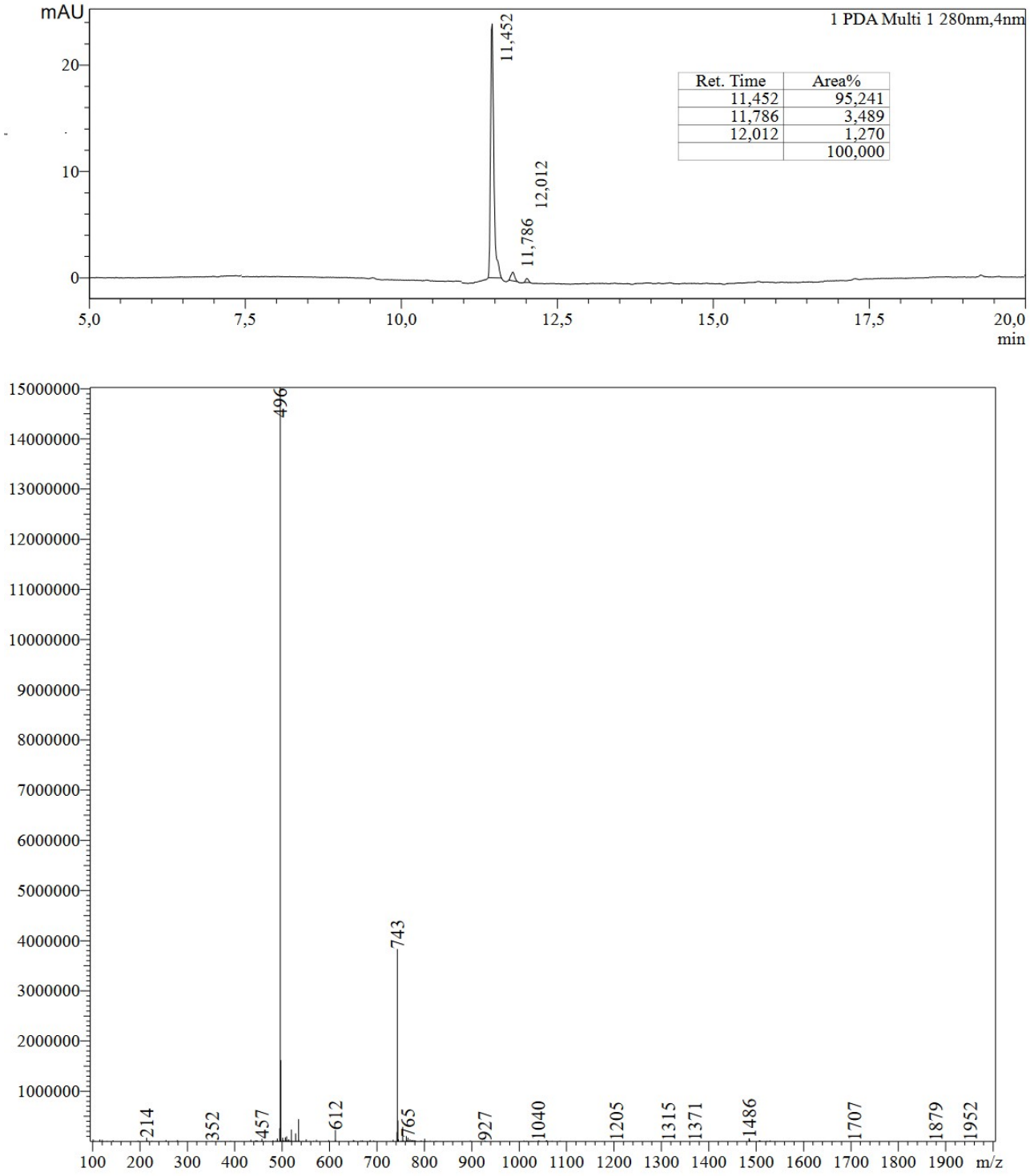


Figure S8: LC-MS analysis of Cy3-AngII **1** (see Table S1). 1) Upper part: HPLC chromatogram. 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode (LCMS-2020 detector).

6. NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-L-AngII (2)

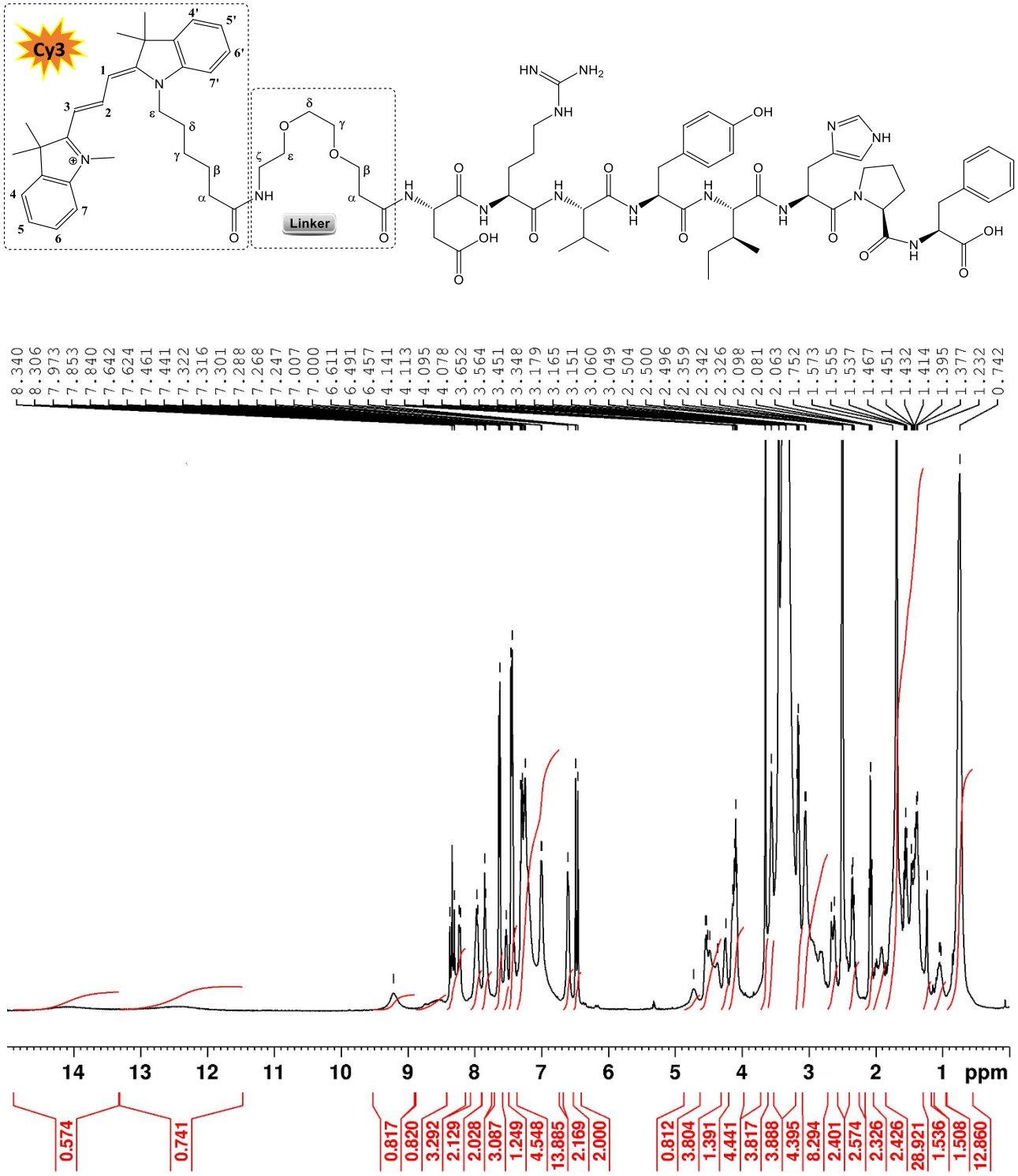


Figure S9: ^{1}H NMR spectrum of Cy3-L-AngII **2** (DMSO-d_6, 400 MHz)

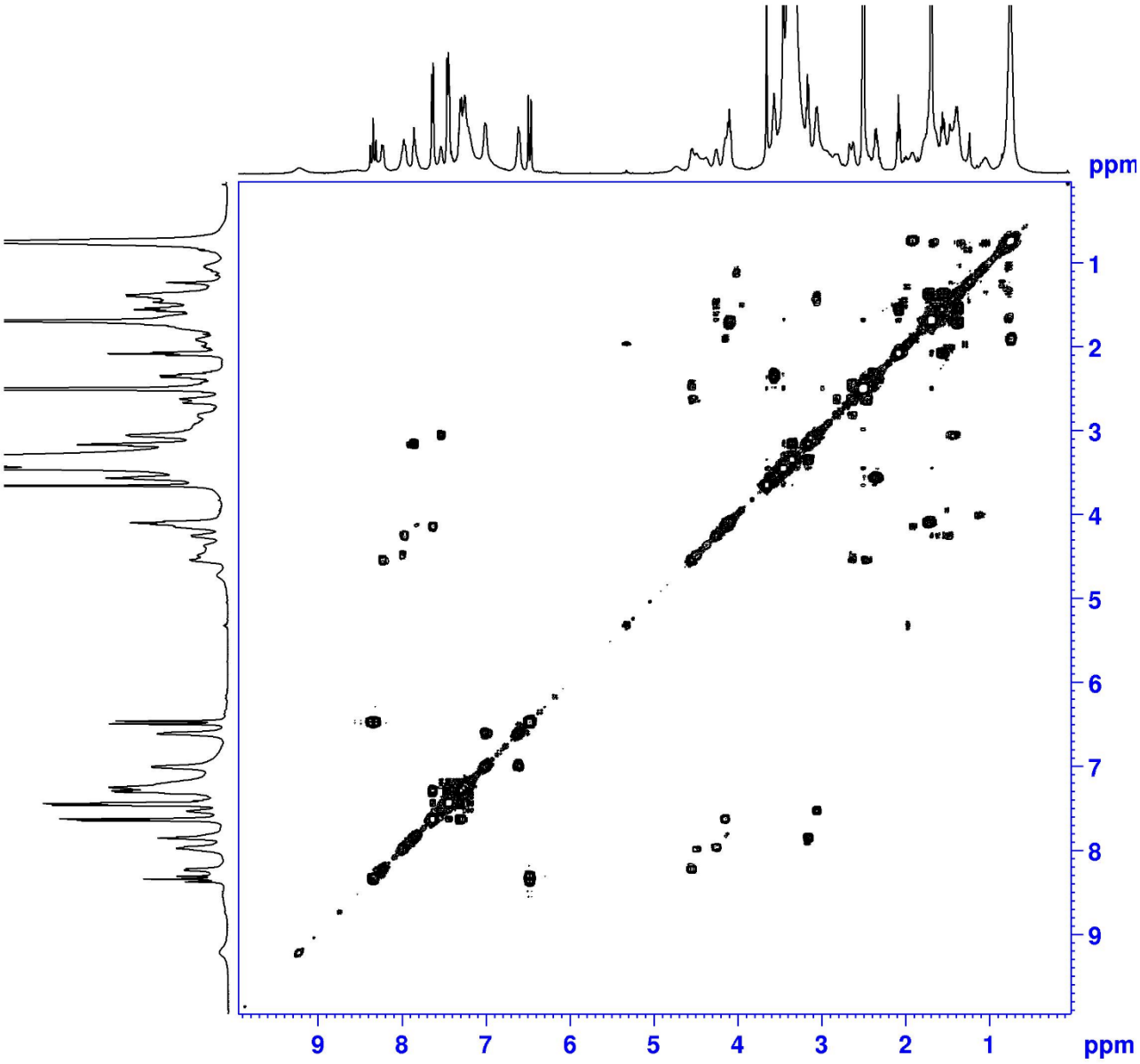


Figure S10: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of Cy3-L-AngII **2** (DMSO-d_6, 400 MHz)

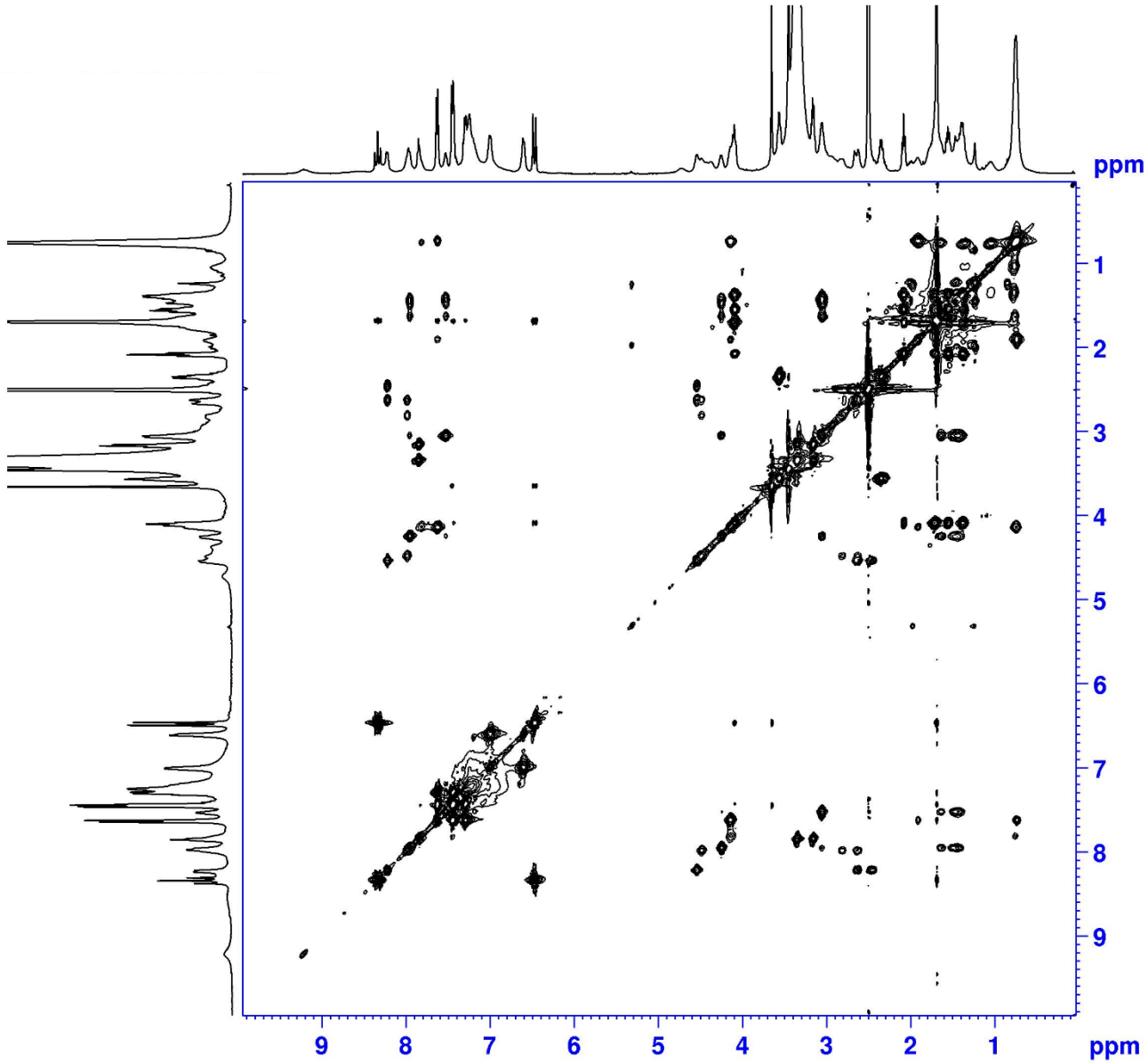


Figure S11: ^{1}H-^{1}H TOCSY NMR spectrum of Cy3-L-AngII **2** (DMSO-d_6, 400 MHz)

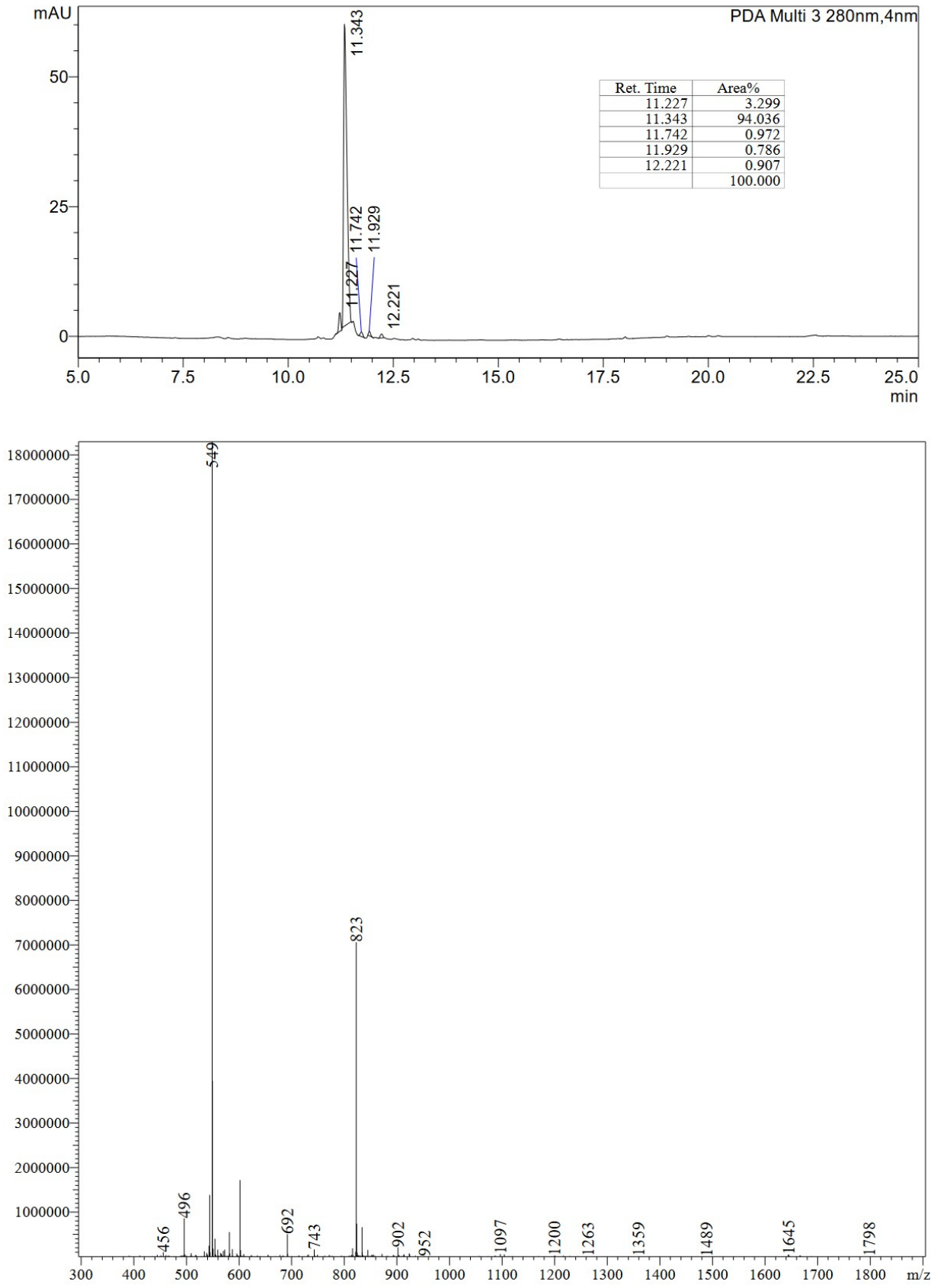


Figure S12: LC-MS analysis of Cy3-L-AngII **2** (see Table S1). 1) Upper part: HPLC chromatogram. 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode (LCMS-2020 detector).

7. NMR spectra and LC-MS analysis of ScP (YFHPDVIR sequence)

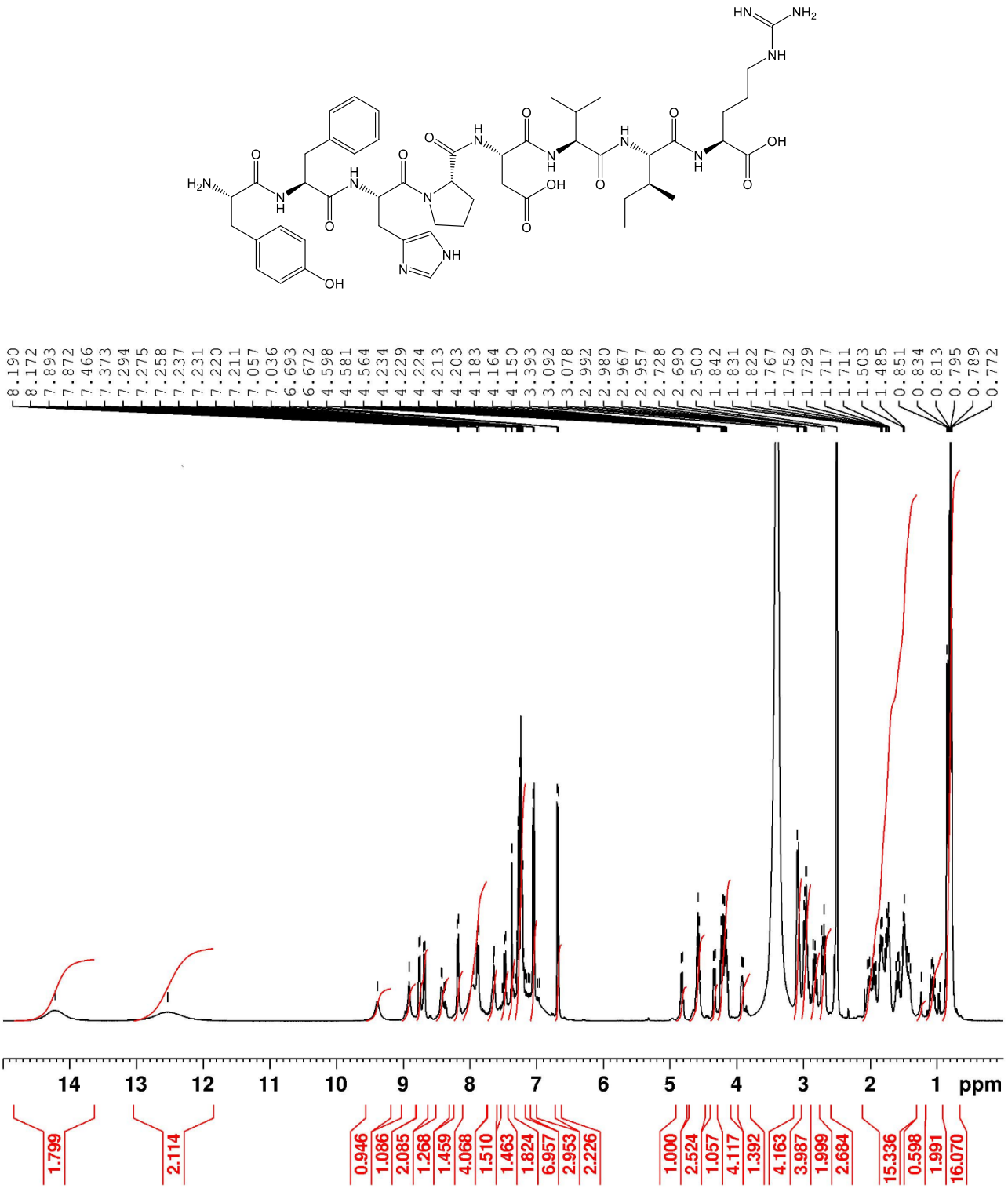


Figure S13: ^{1}H NMR spectrum of ScP (DMSO-d_6, 400 MHz)

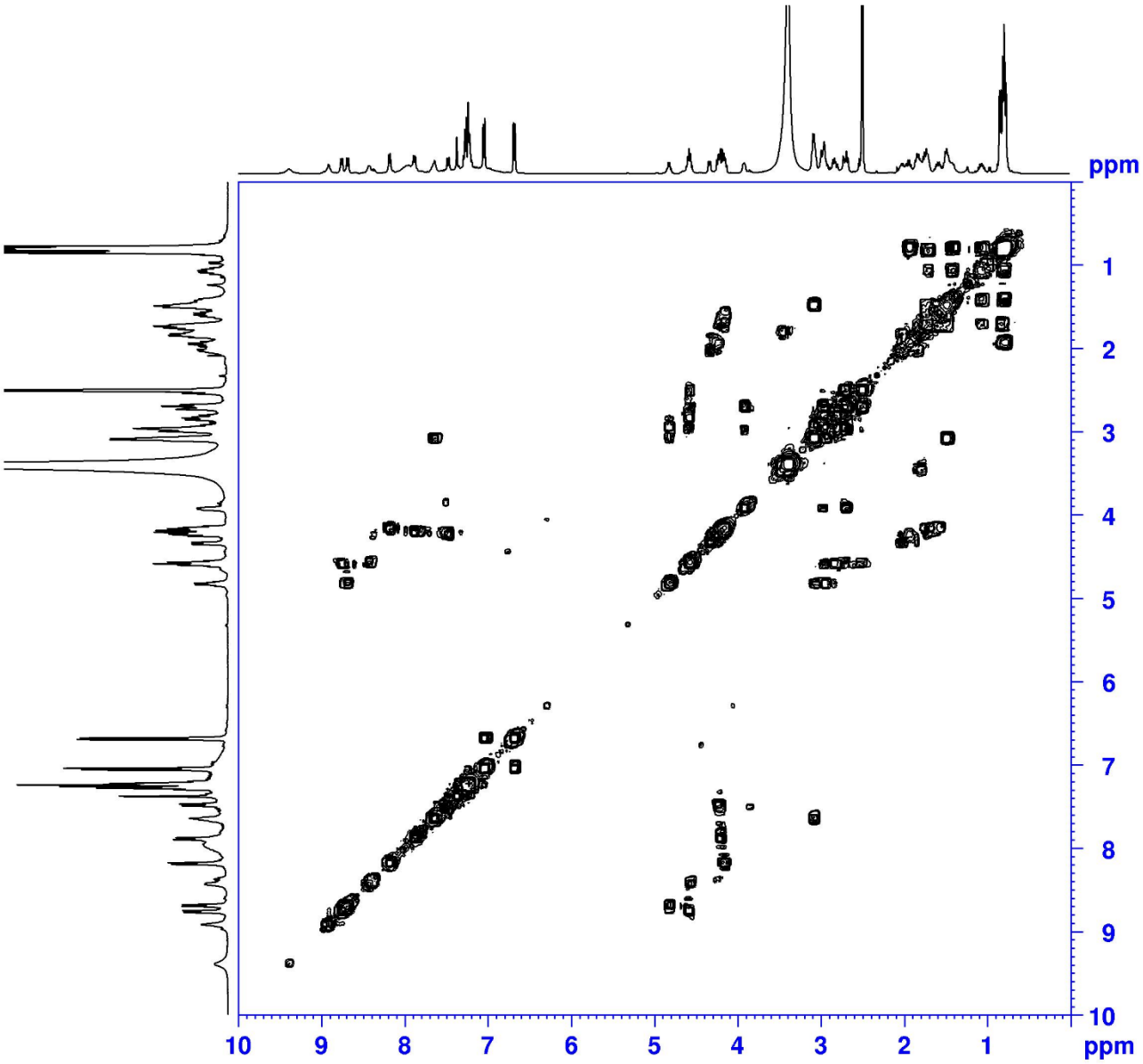


Figure S14: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of ScP (DMSO-d_6, 400 MHz)

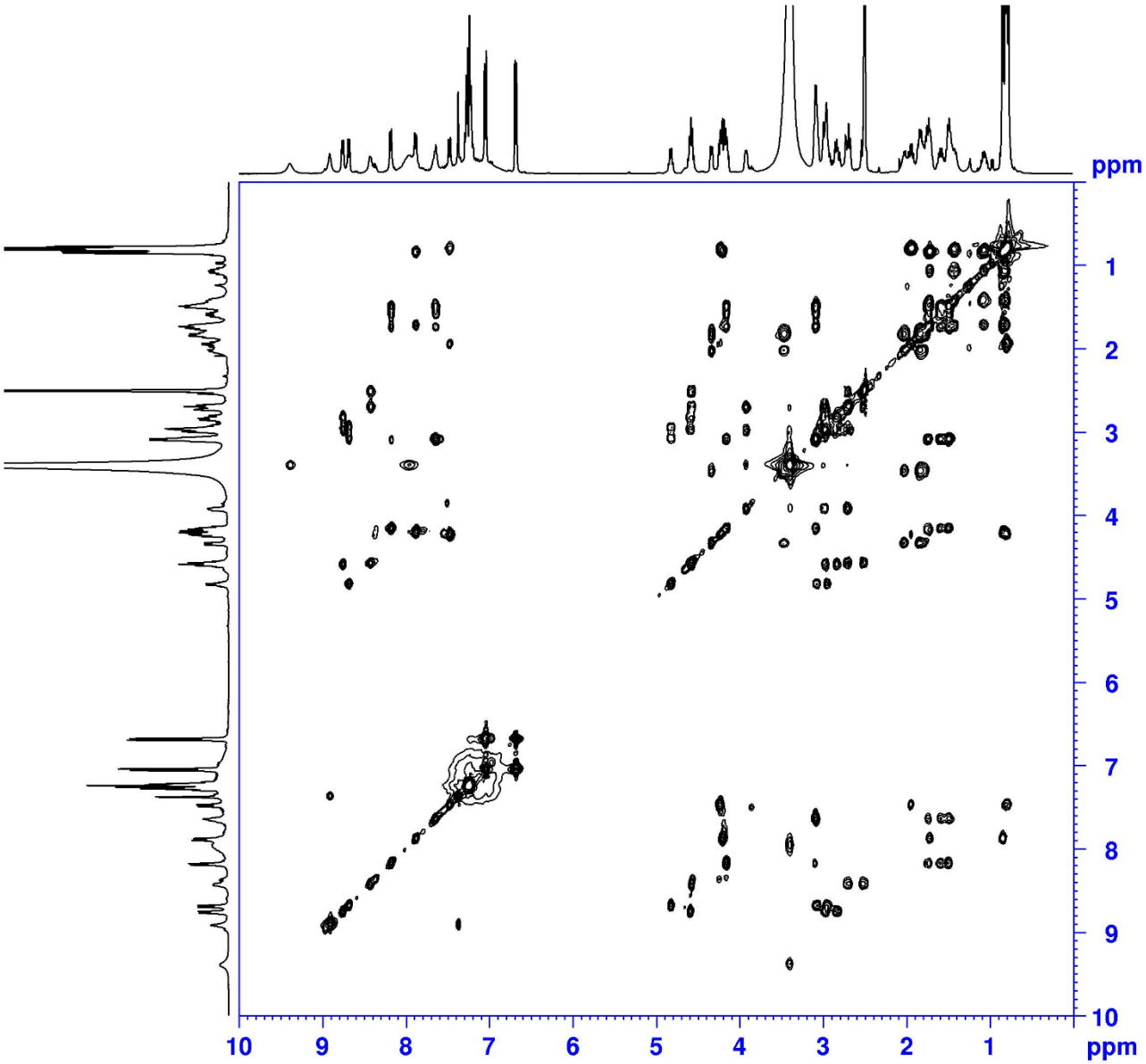


Figure S15: ^{1}H-^{1}H TOCSY NMR spectrum of ScP (DMSO-d_6, 400 MHz)

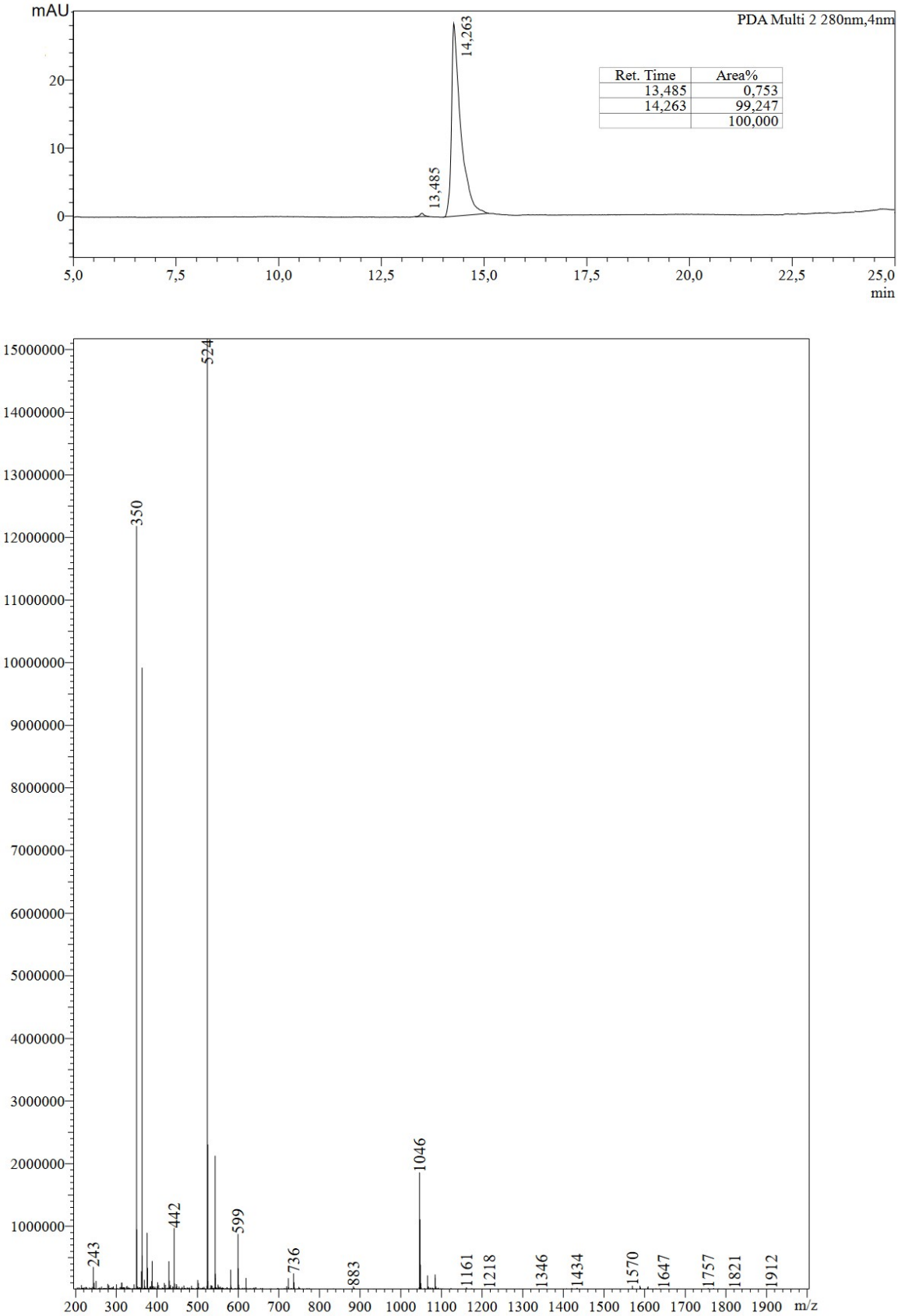


Figure S16: LC-MS analysis of ScP (see Table S1). 1) Upper part: HPLC chromatogram. 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode (LCMS-2020 detector).

8. NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-ScP (3)

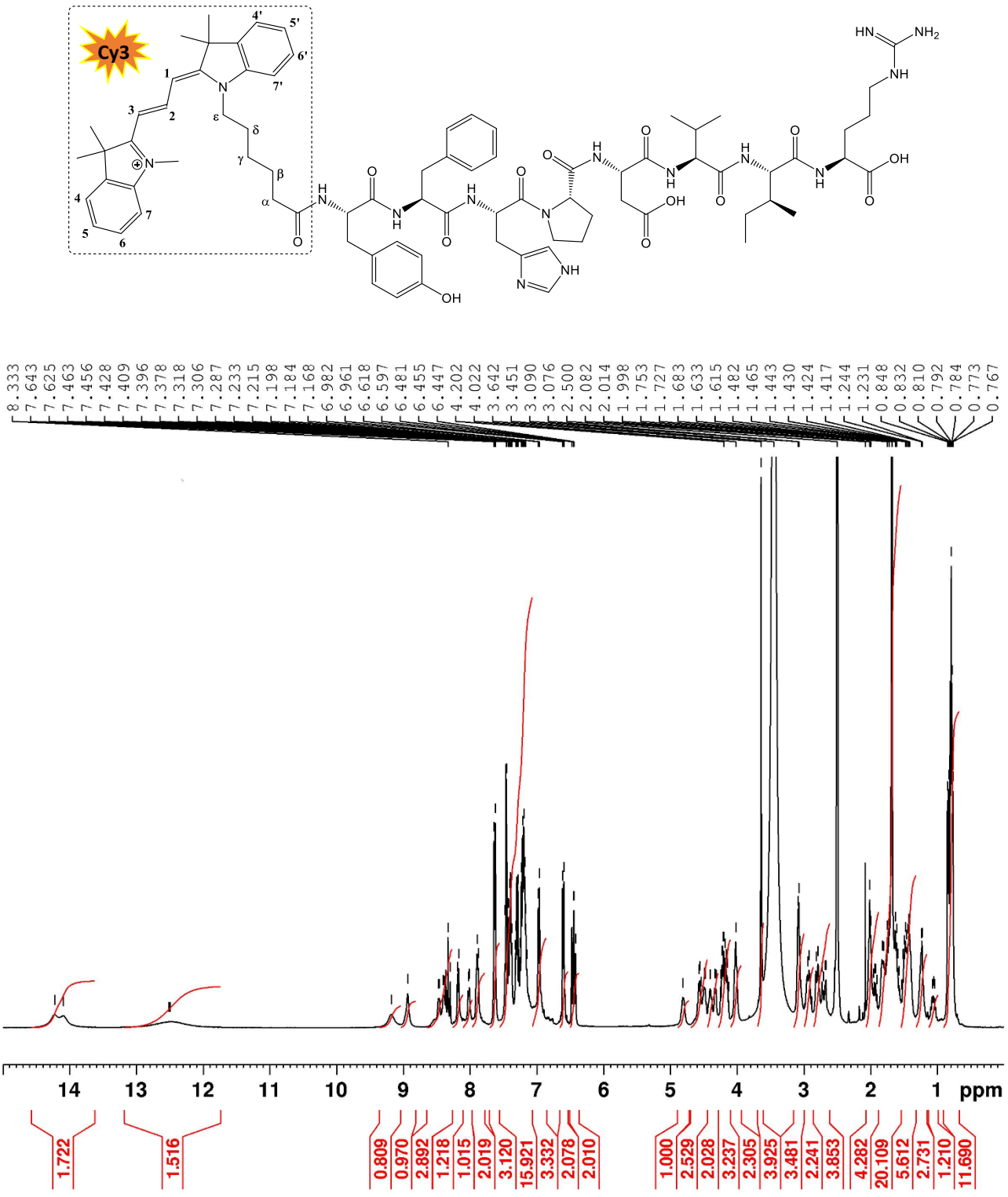


Figure S17: ^{1}H NMR spectrum of Cy3-ScP **3** (DMSO-d_6, 400 MHz)

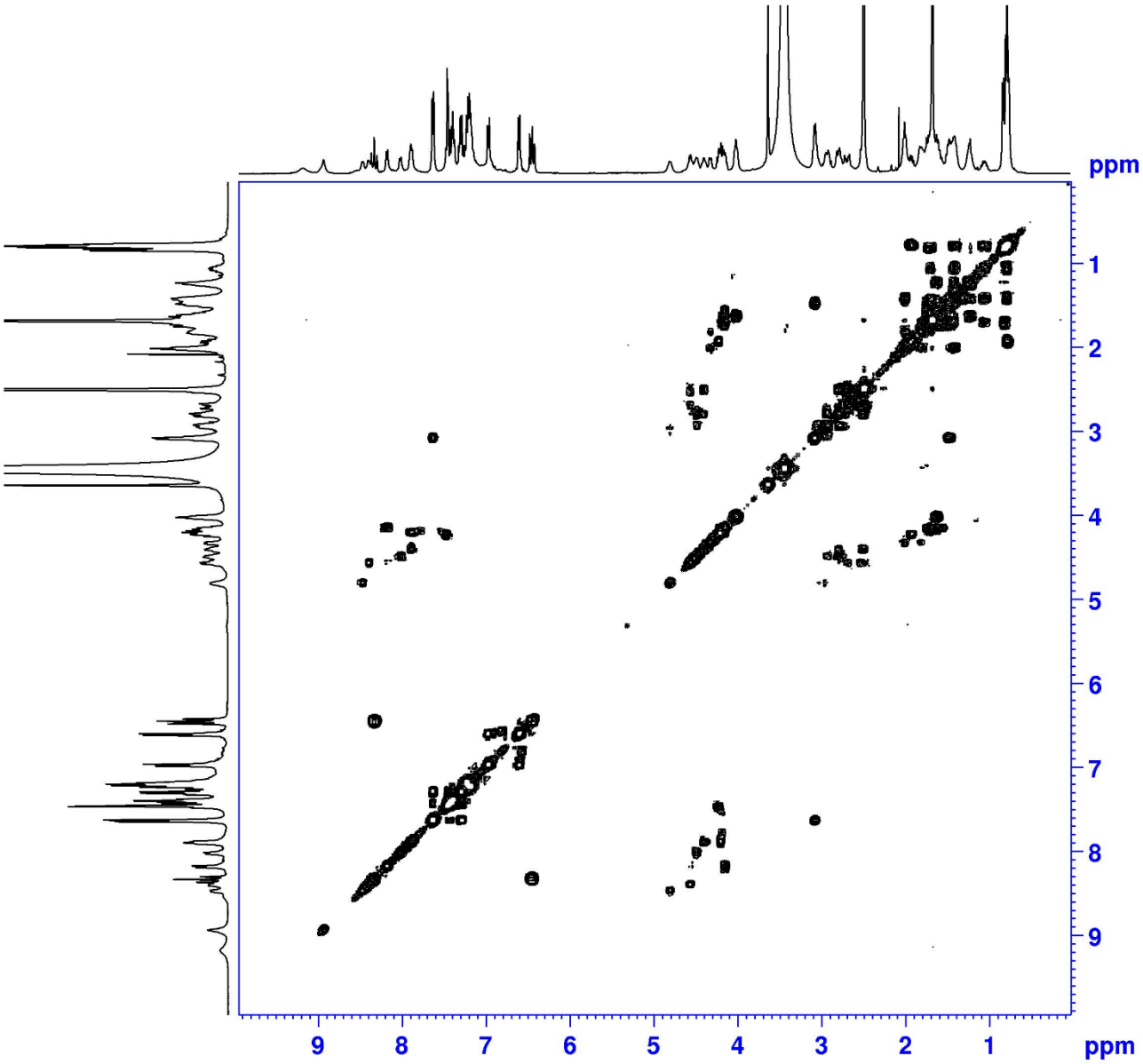


Figure S18: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of Cy3-ScP **3** (DMSO-d_6, 400 MHz)

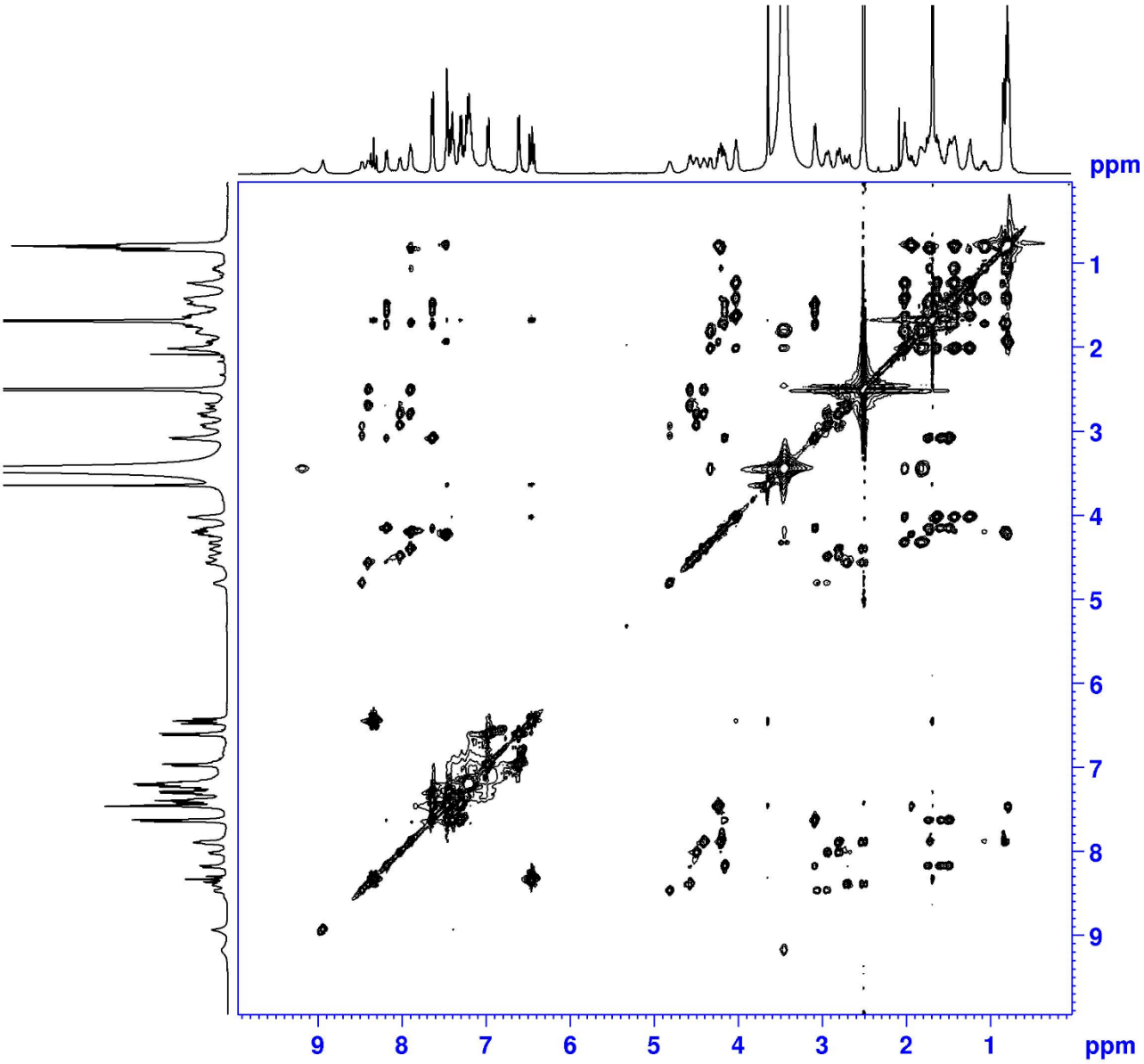


Figure S19: ^{1}H-^{1}H TOCSY NMR spectrum of Cy3-ScP **3** (DMSO-d_6, 400 MHz)

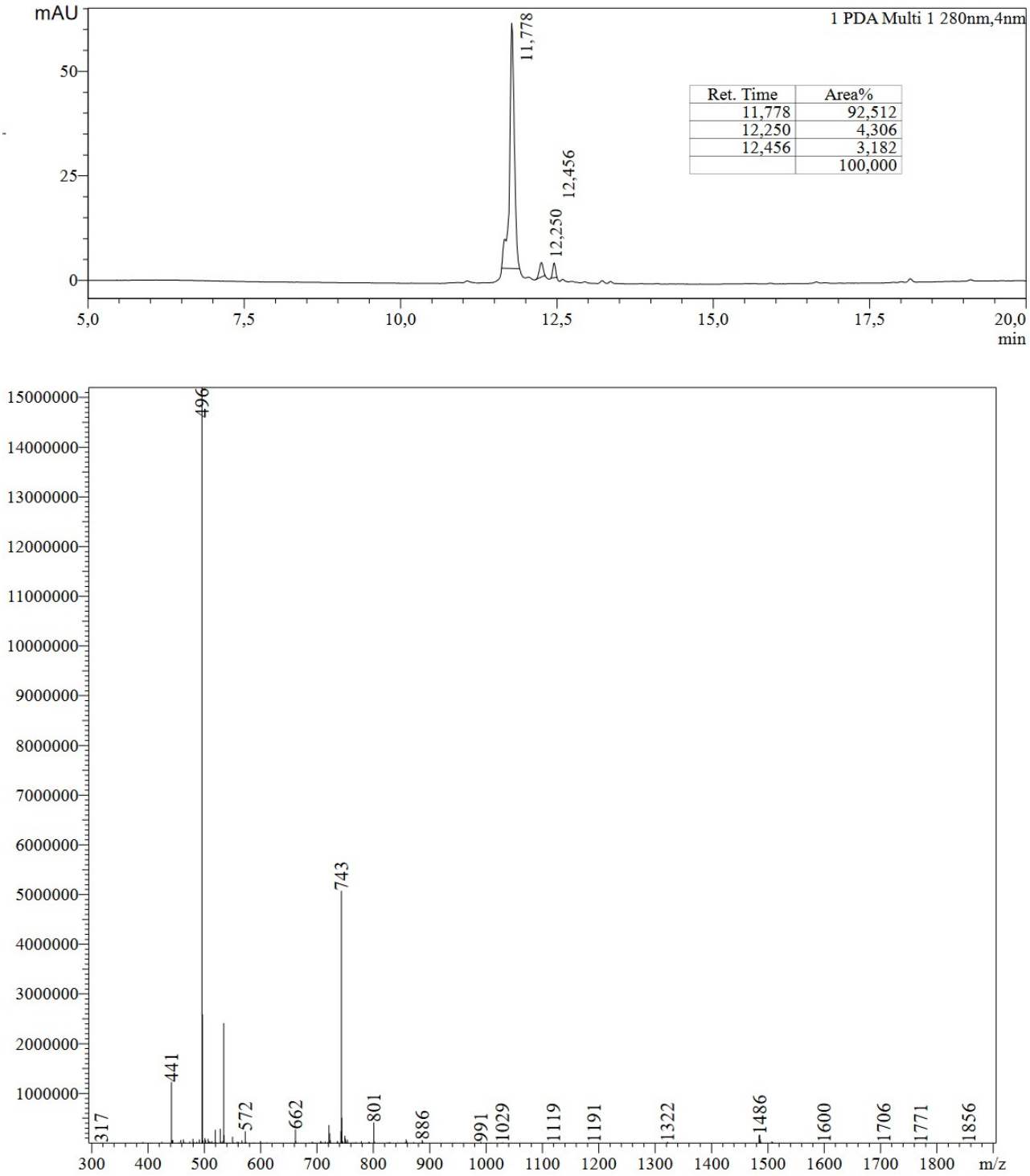


Figure S20: LC-MS analysis of Cy3-ScP **3** (see Table S1). 1) Upper part: HPLC chromatogram. 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode (LCMS-2020 detector).

9. NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-L-ScP (4)

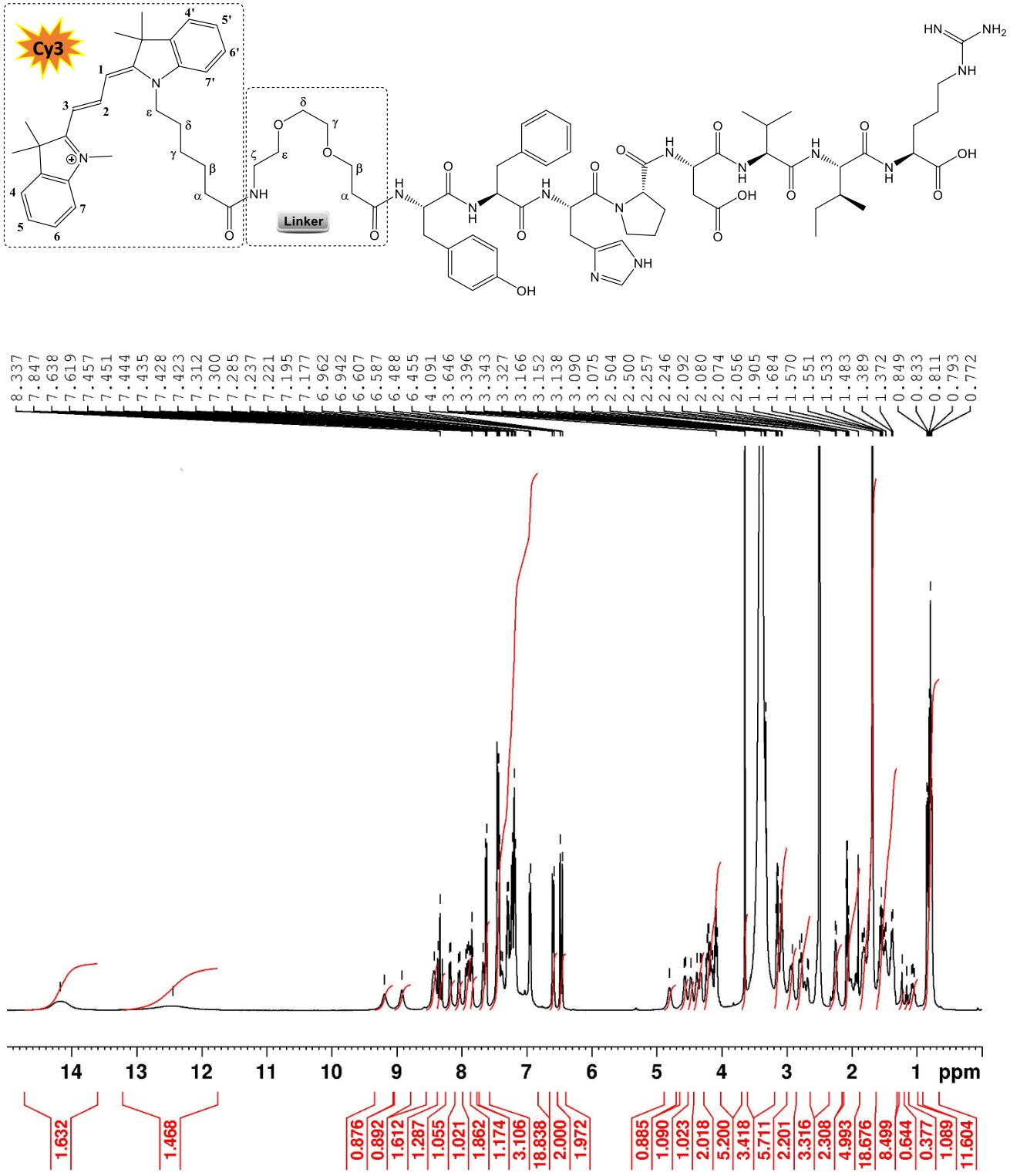


Figure S21: ^{1}H NMR spectrum of Cy3-L-ScP **4** (DMSO-d_6, 400 MHz)

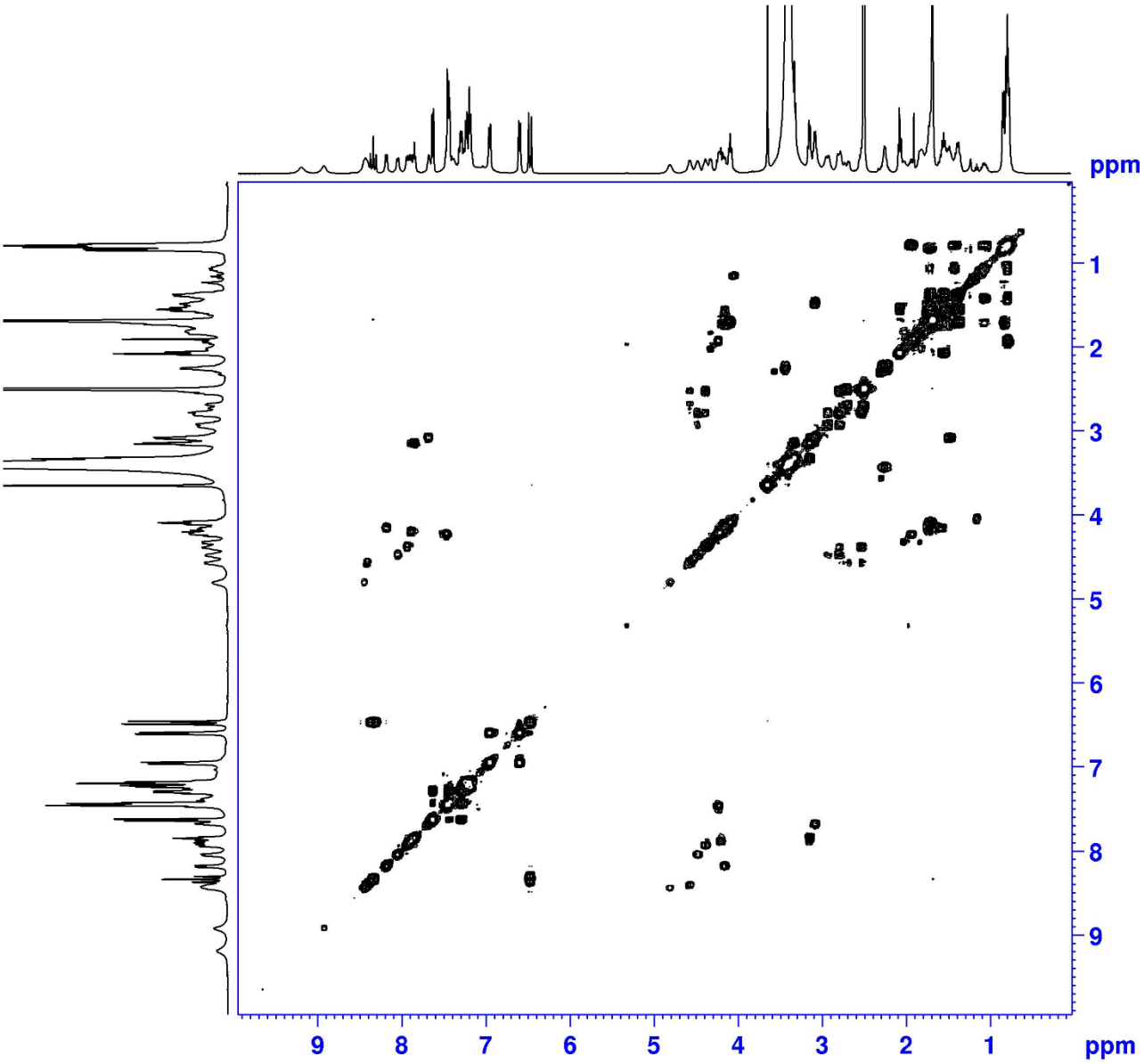


Figure S22: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of Cy3-L-ScP **4** (DMSO-d_6, 400 MHz)

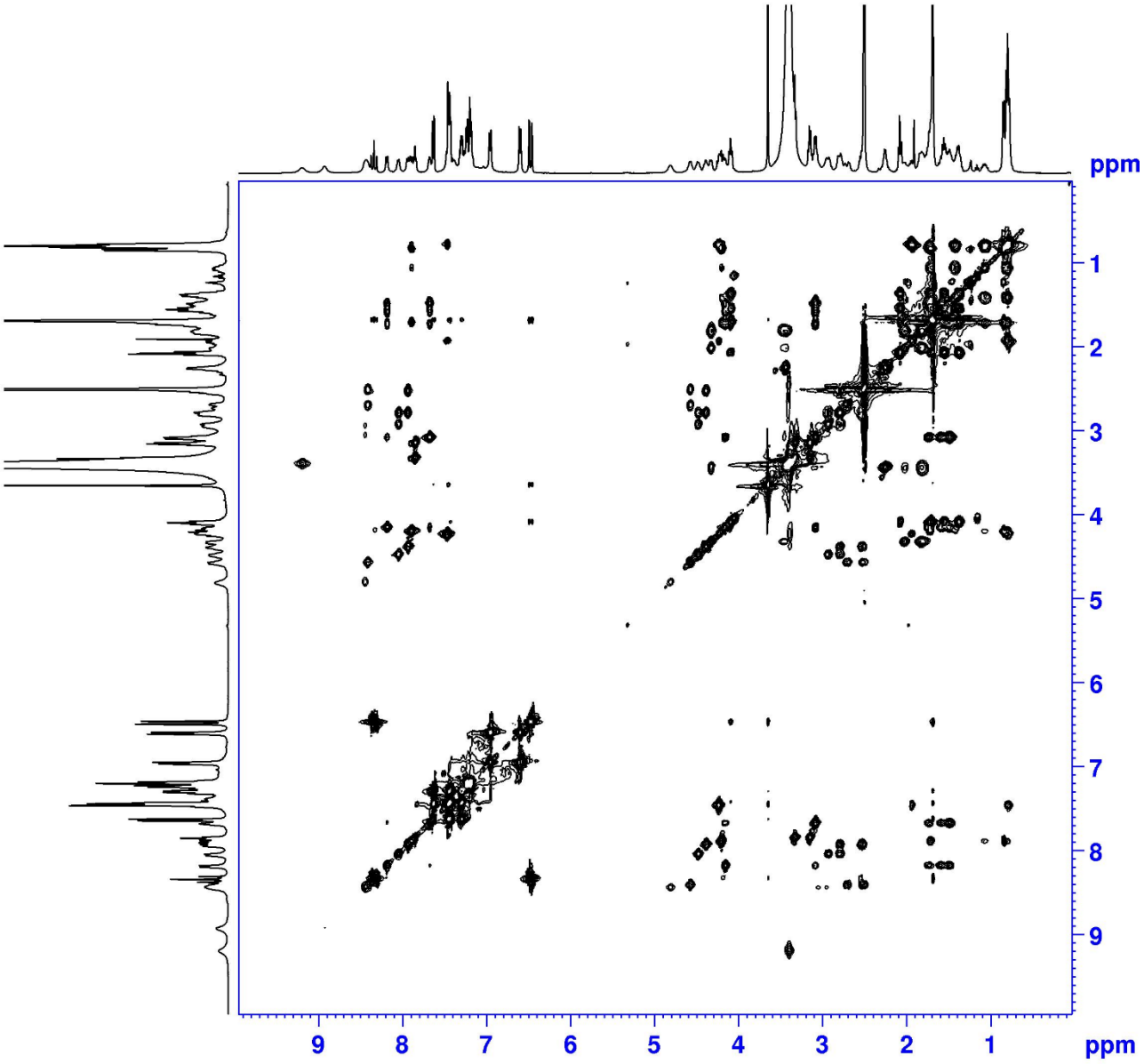


Figure S23: ^{1}H-^{1}H TOCSY NMR spectrum of Cy3-L-ScP **4** (DMSO-d_6, 400 MHz)

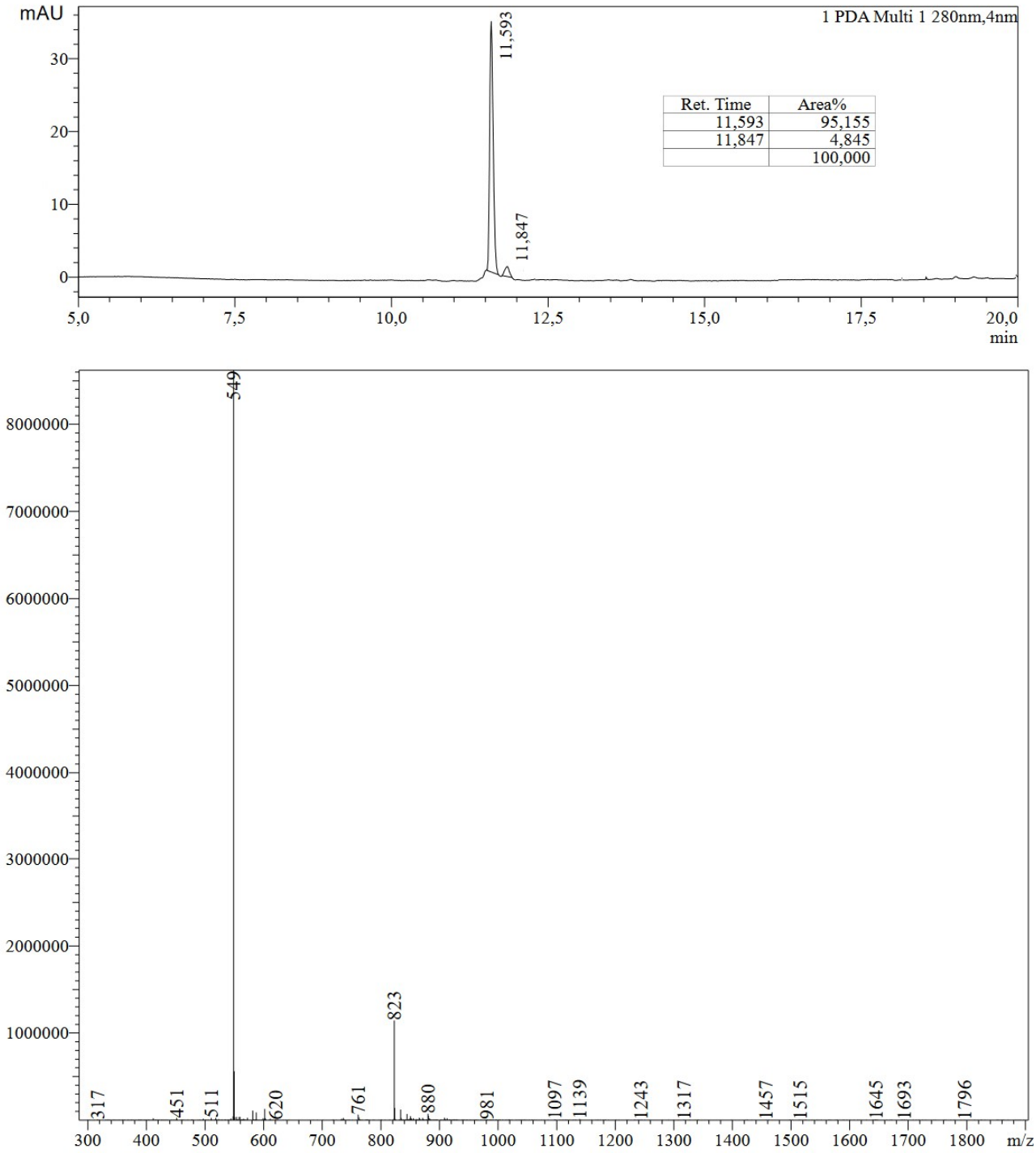


Figure S24: LC-MS analysis of Cy3-L-ScP **4** (see Table S1). 1) Upper part: HPLC chromatogram. 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode (LCMS-2020 detector).

10. NMR spectra and LC-MS analysis of TRV027 (Sar-RVYIHPa sequence)

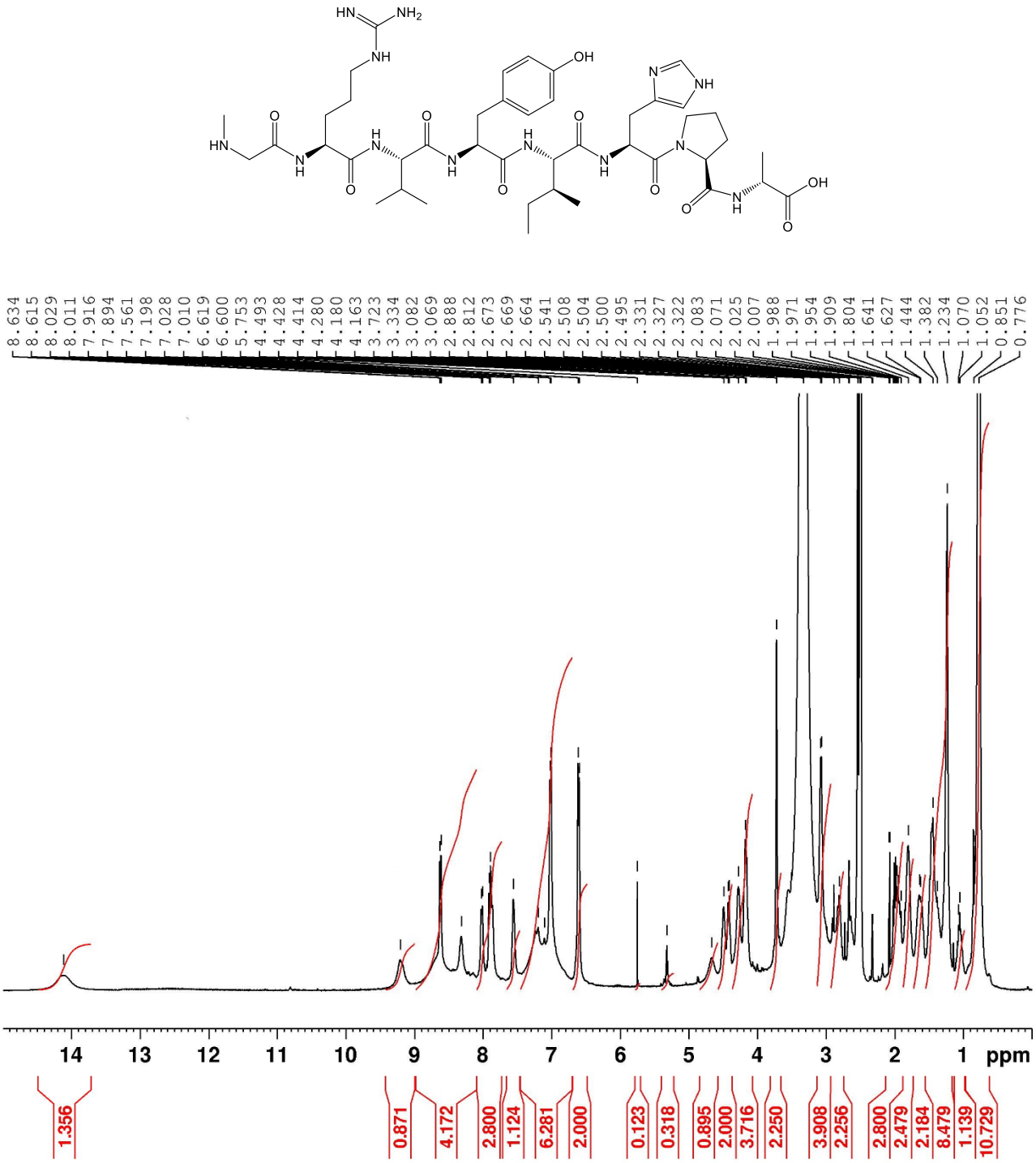


Figure S25: ^{1}H NMR spectrum of TRV027 (DMSO-d_6, 400 MHz)

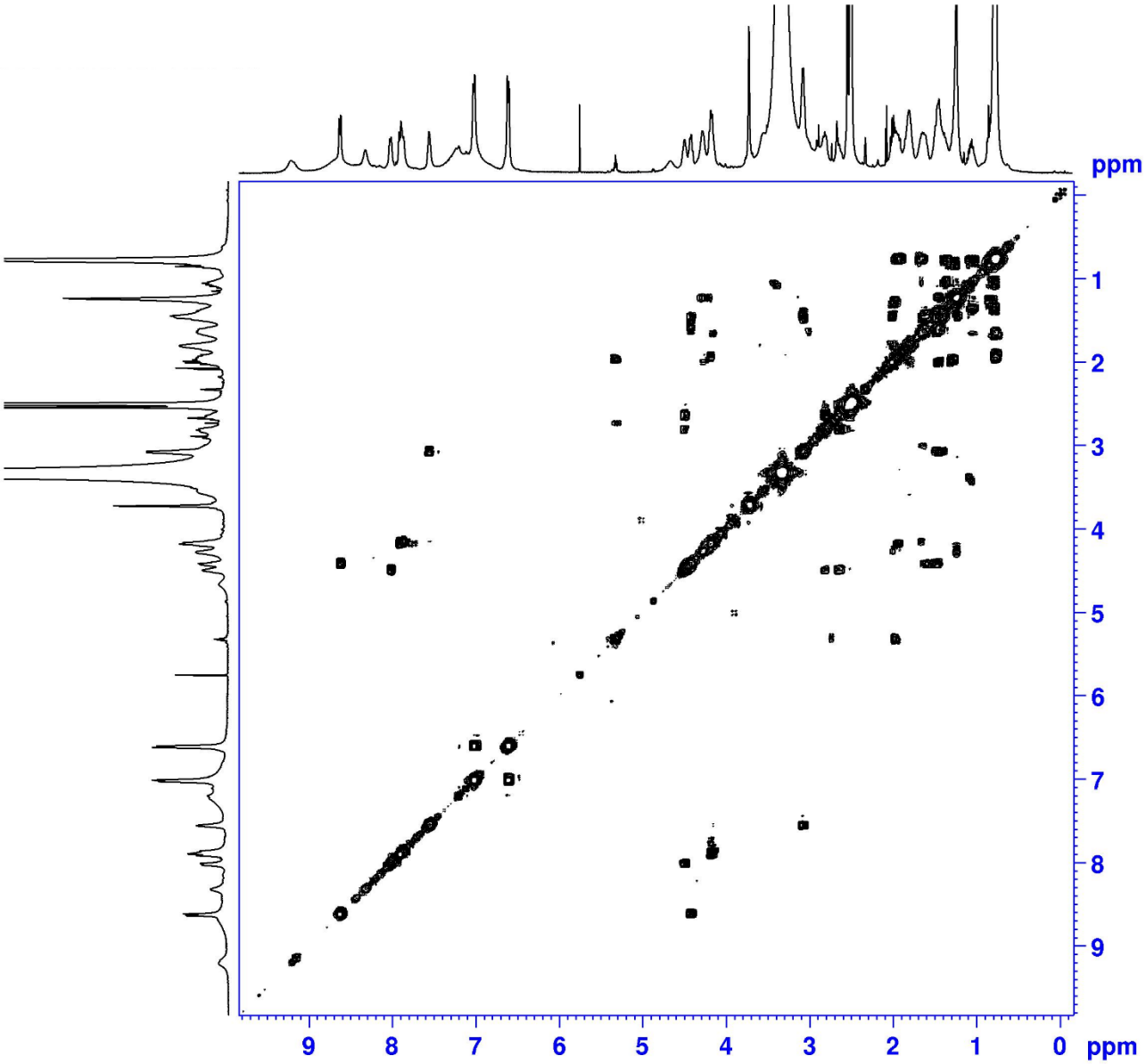


Figure S26: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of TRV027 (DMSO-d_6, 400 MHz)

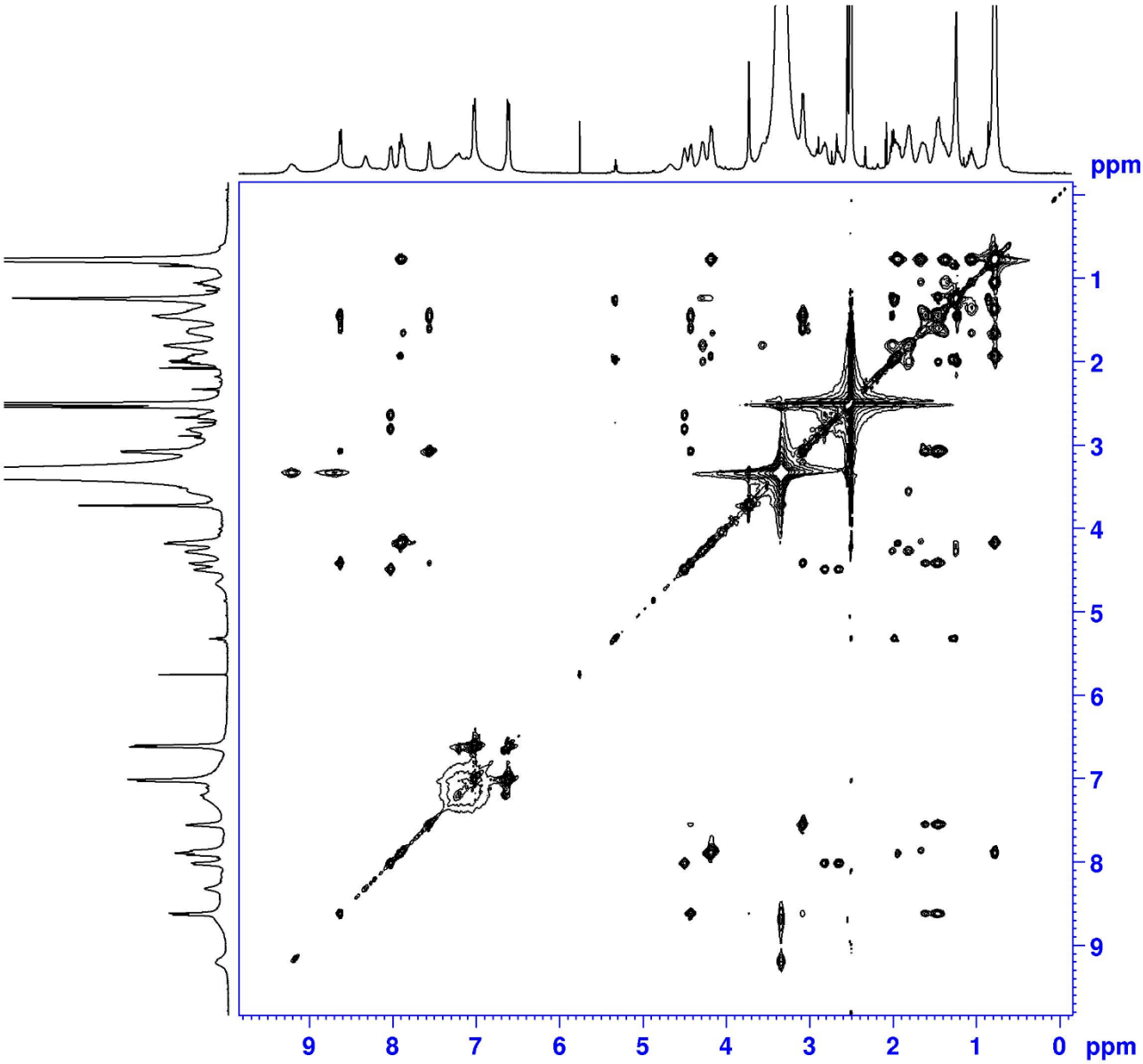


Figure S27: ^{1}H-^{1}H TOCSY NMR spectrum of TRV027 (DMSO-d_6, 400 MHz)

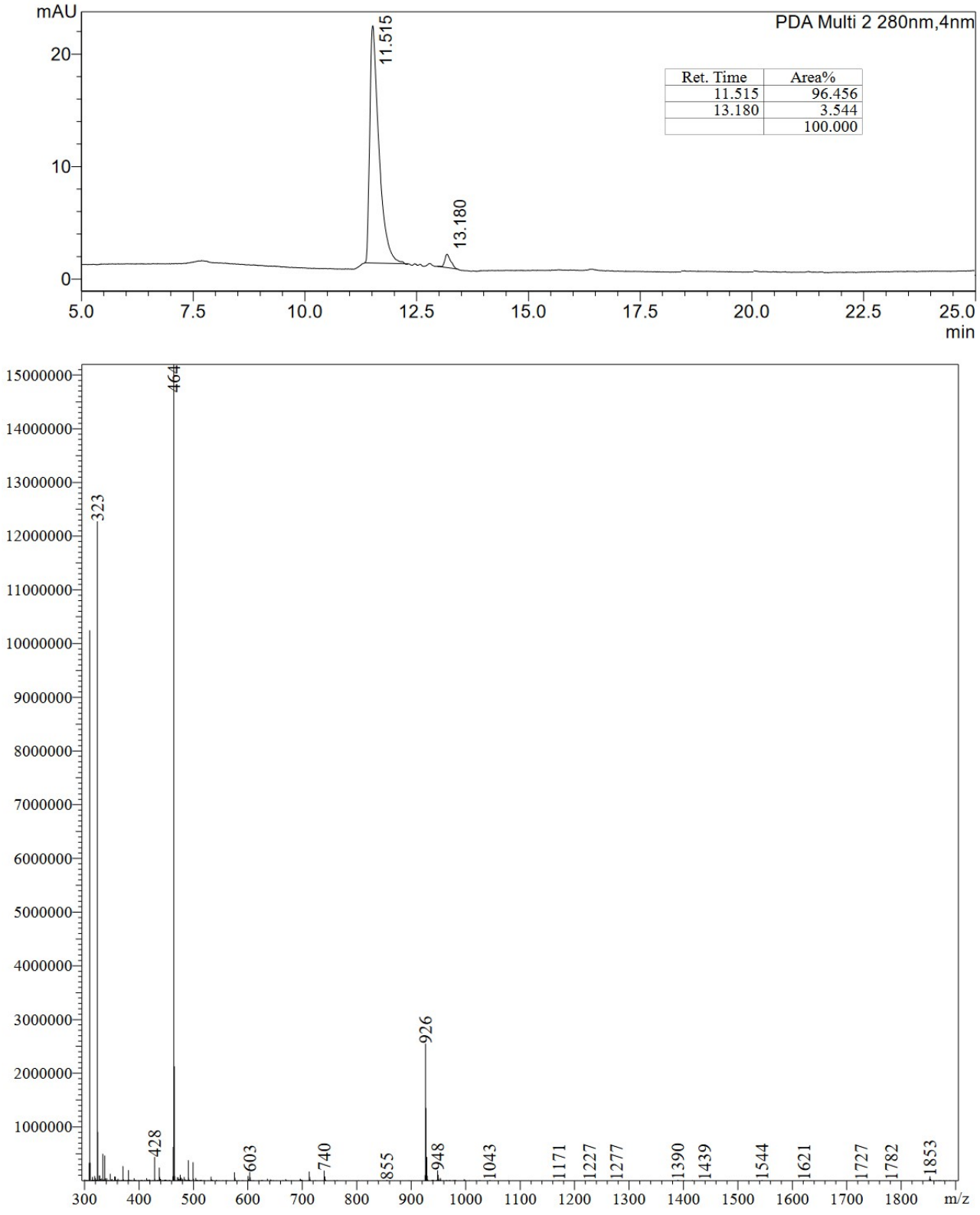
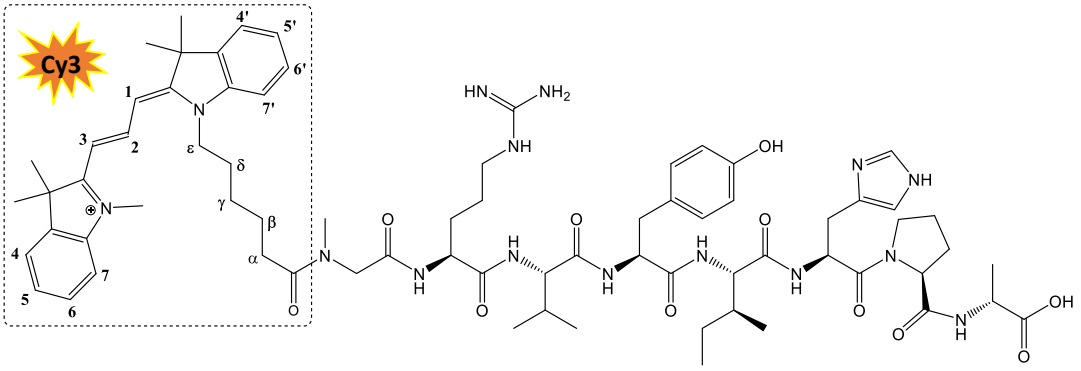


Figure S28: LC-MS analysis of TRV027 (see Table S1). 1) Upper part: HPLC chromatogram. 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode (LCMS-2020 detector).

11. NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-TRV027 (5)



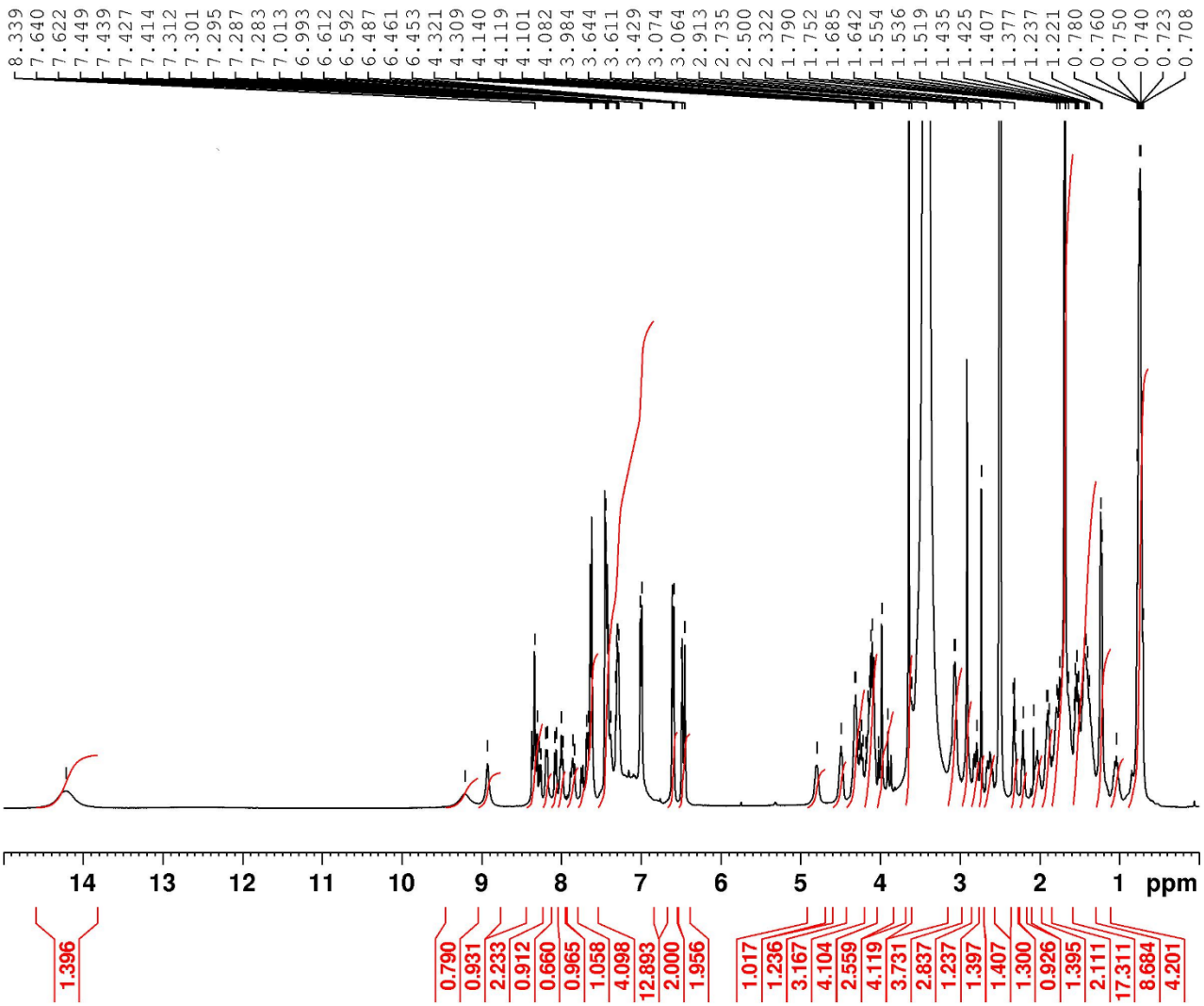


Figure S29: ^{1}H NMR spectrum of Cy3-TRV027 **5** (DMSO-d_6, 400 MHz)

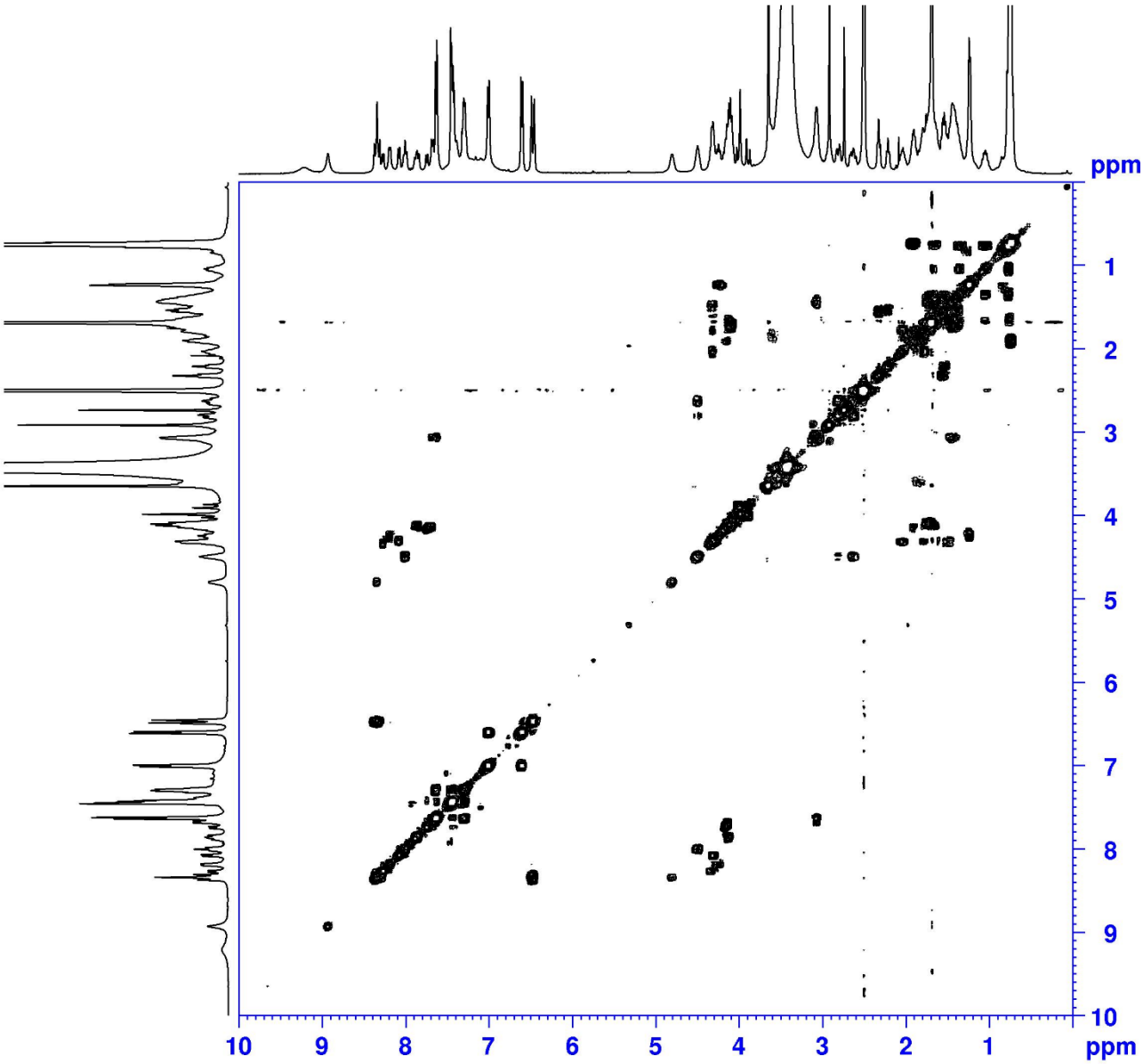


Figure S30: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of Cy3-TRV027 **5** (DMSO-d_6, 400 MHz)

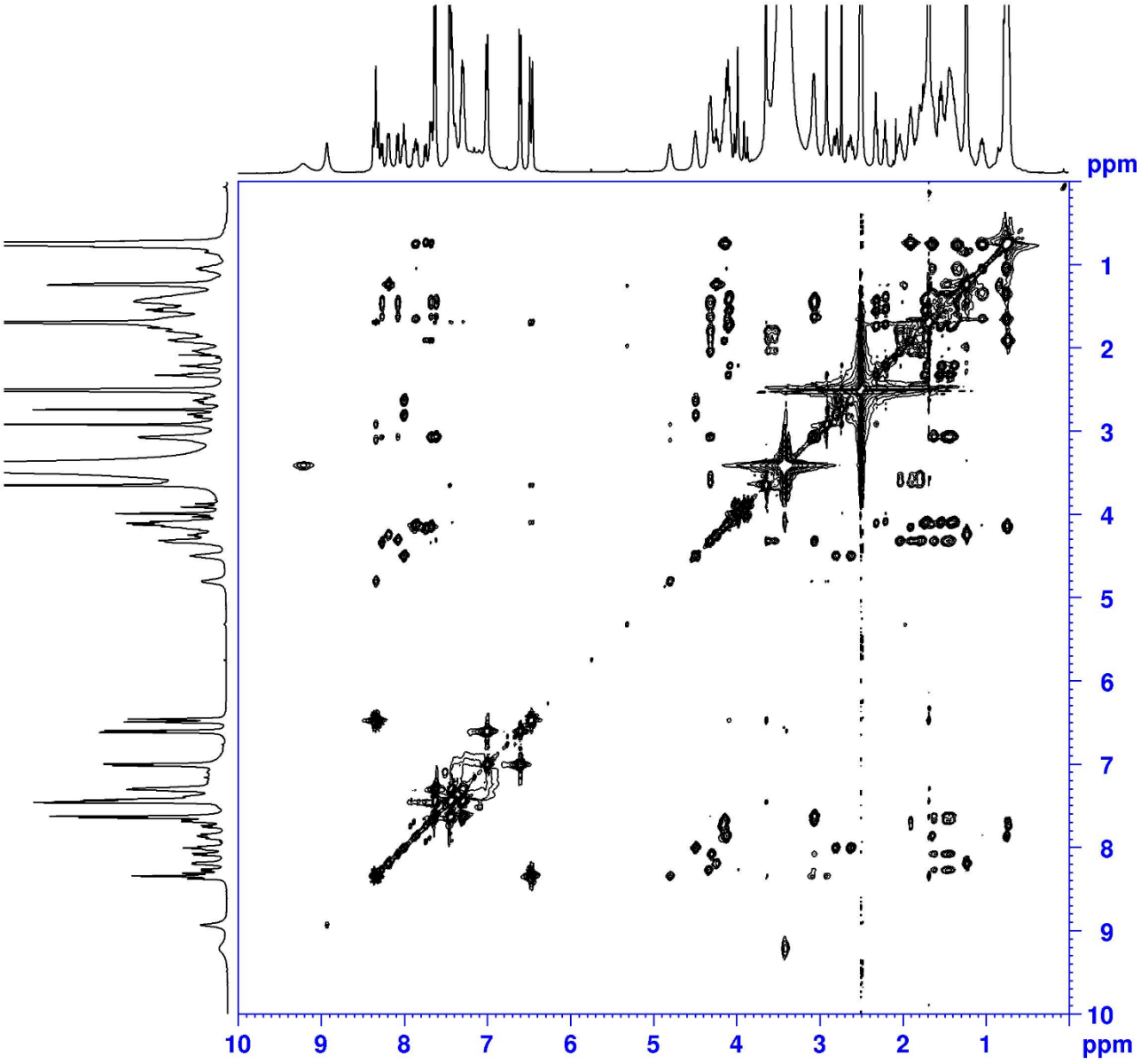


Figure S31: ^{1}H-^{1}H TOCSY NMR spectrum of Cy3-TRV027 **5** (DMSO-d_6, 400 MHz)

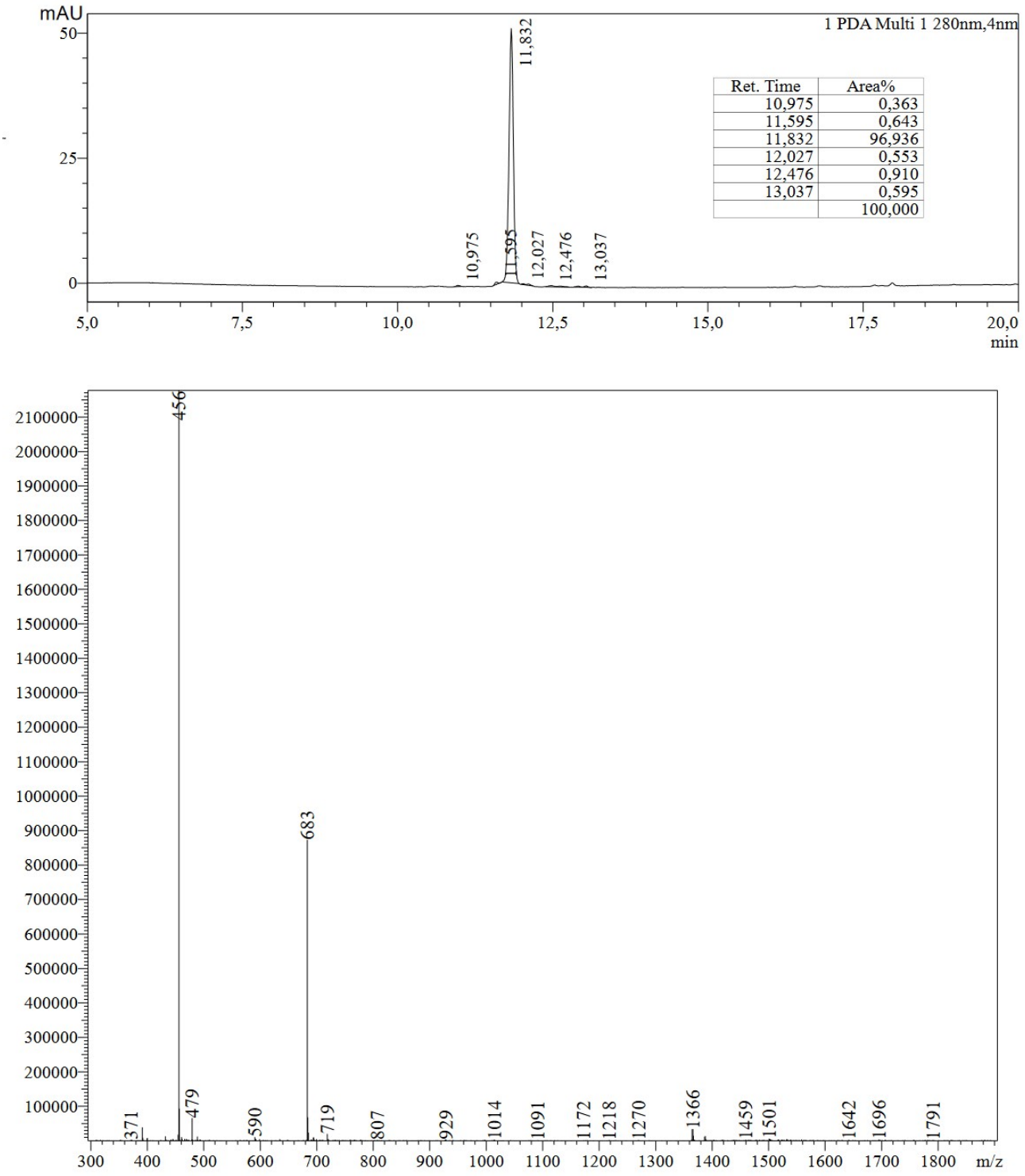


Figure S32: LC-MS analysis of Cy3-TRV027 **5** (see Table S1). 1) Upper part: HPLC chromatogram. 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode (LCMS-2020 detector).

12. NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-L-TRV027 (6)

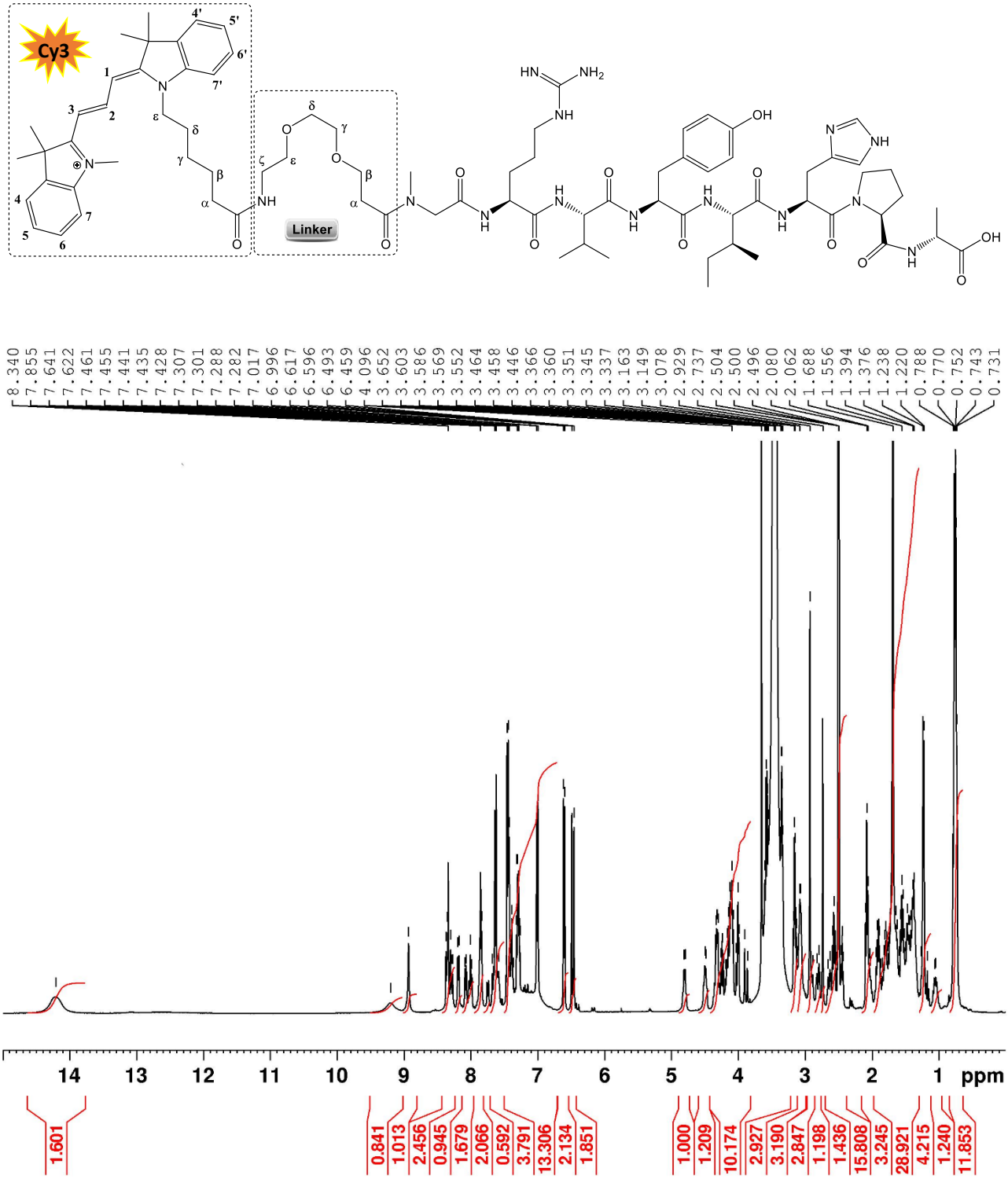


Figure S33: ^{1}H NMR spectrum of Cy3-L-TRV027 **6** (DMSO-d_6, 400 MHz)

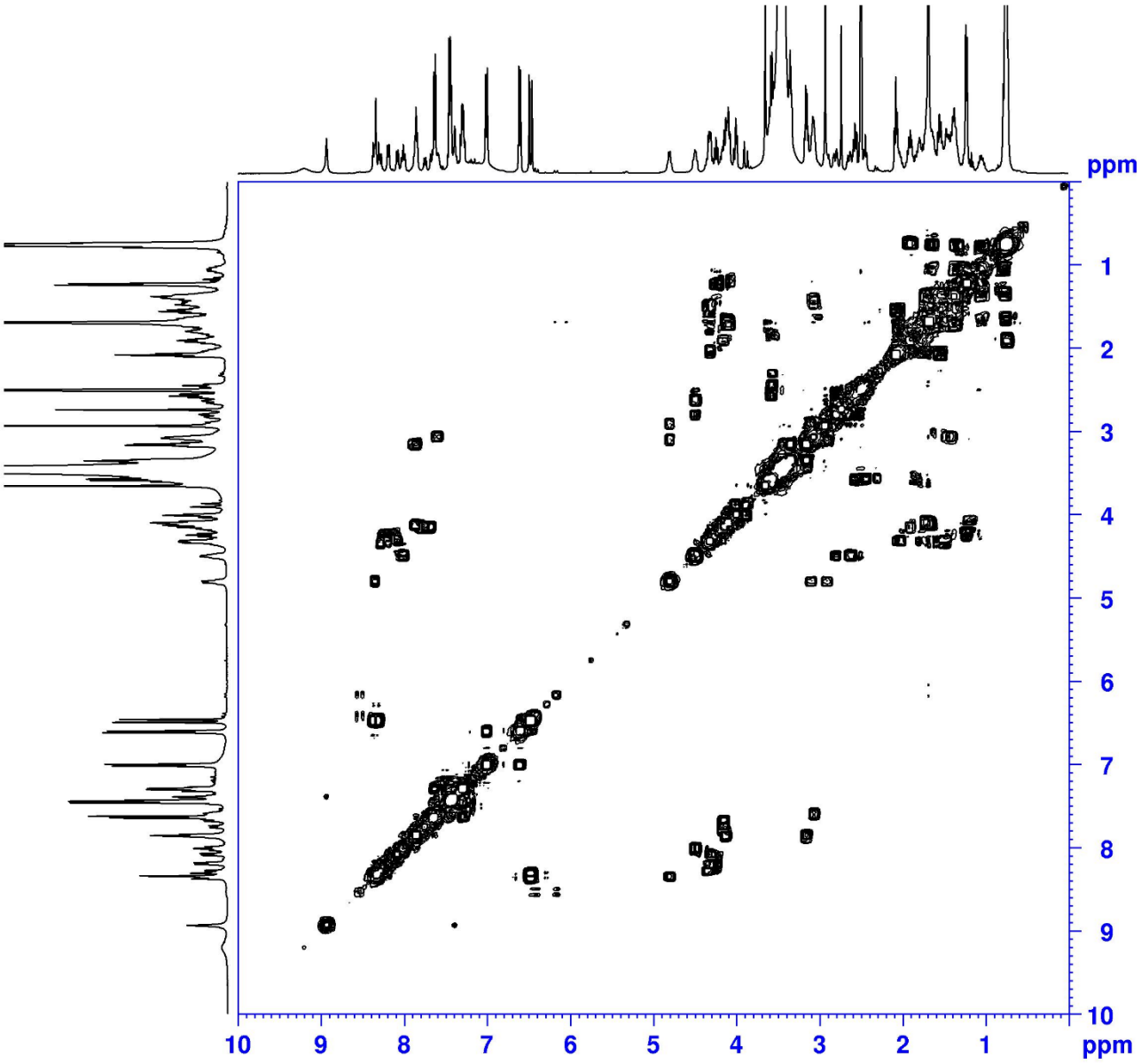


Figure S34: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of Cy3-L-TRV027 **6** (DMSO-d_6, 400 MHz)

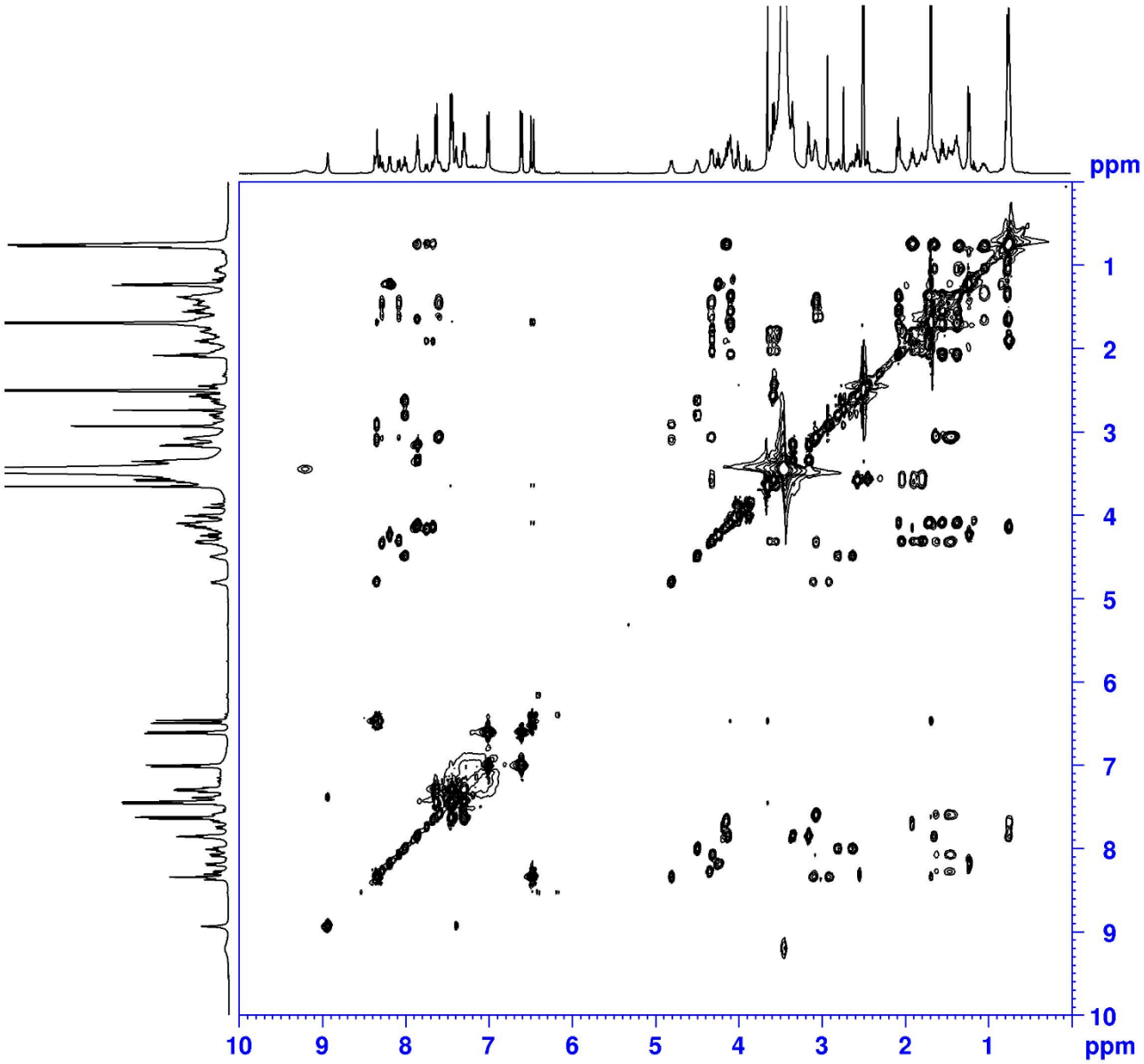


Figure S35: ^{1}H-^{1}H TOCSY NMR spectrum of Cy3-L-TRV027 **6** (DMSO-d_6, 400 MHz)

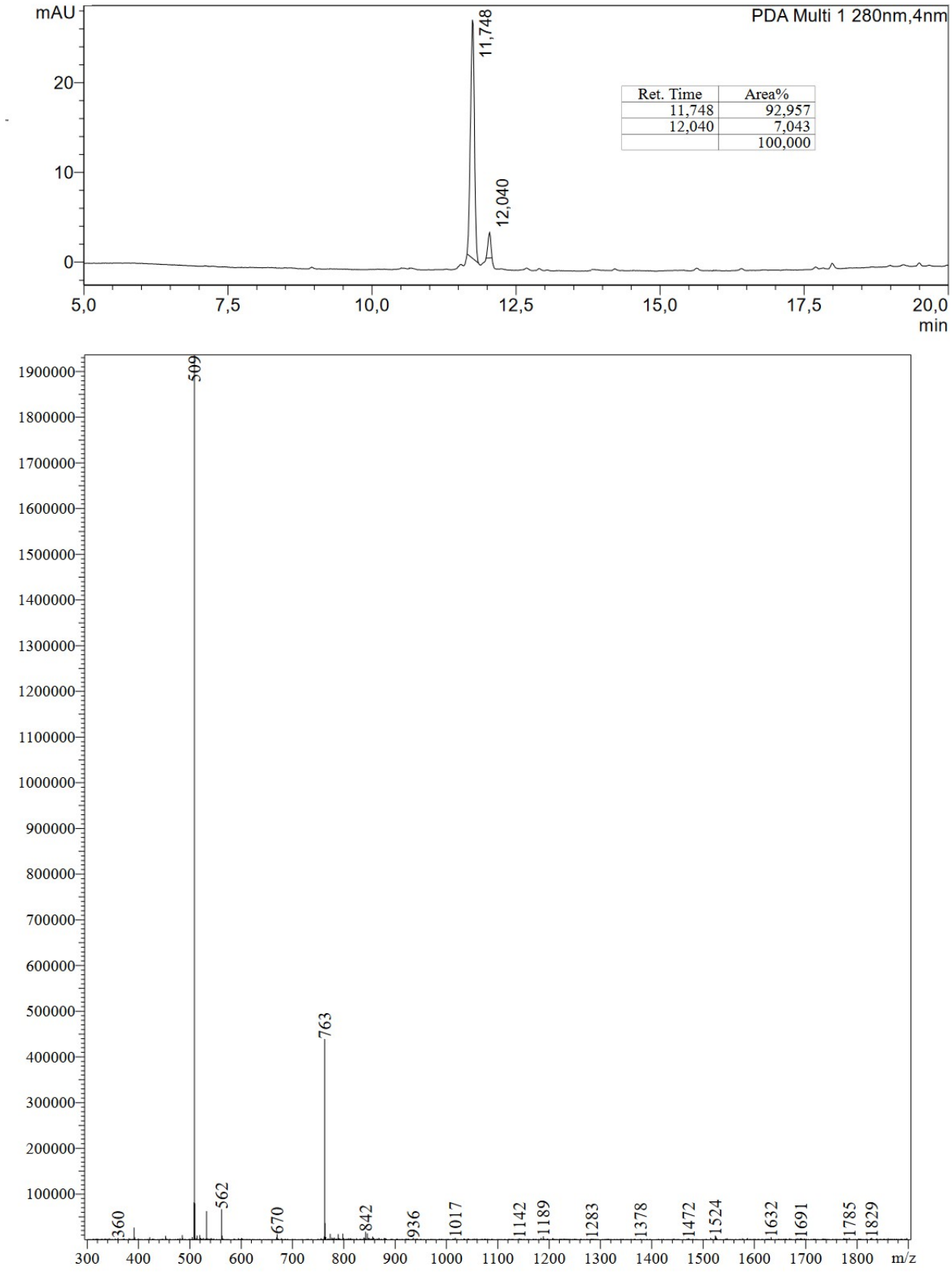


Figure S36: LC-MS analysis of Cy3-L-TRV027 **6** (see Table S1). 1) Upper part: HPLC chromatogram. 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode (LCMS-2020 detector).

13. NMR spectra of antagonist-based molecule 10

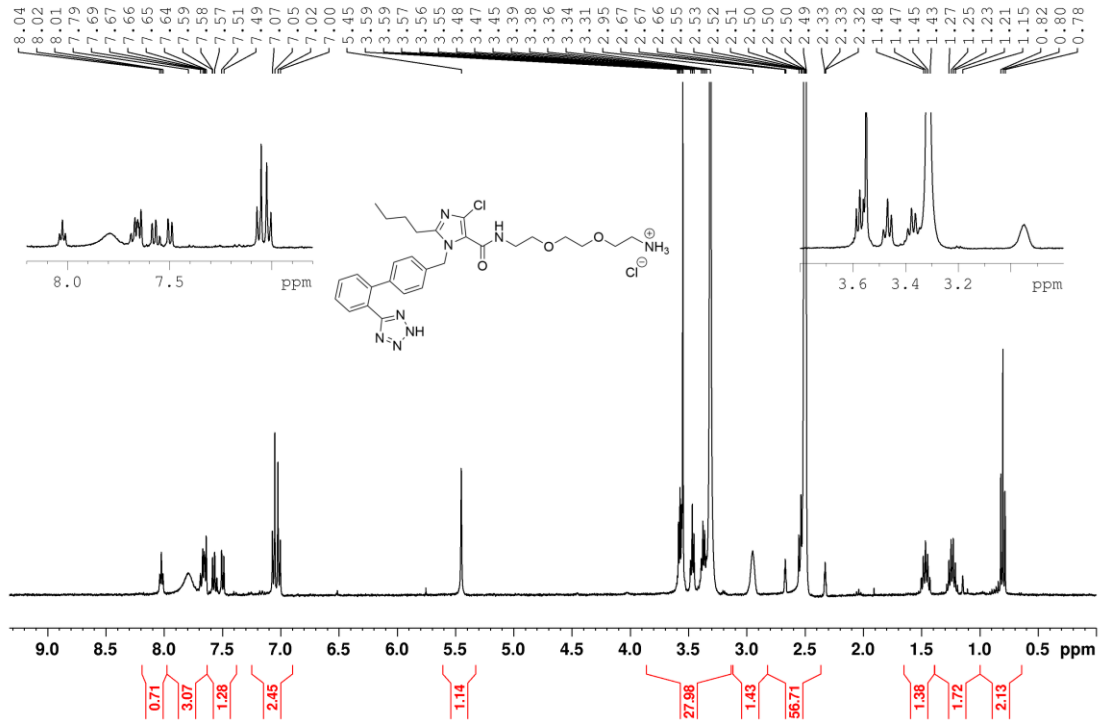


Figure S37: ^{1}H NMR spectrum of **10** (DMSO-d_6, 400 MHz)

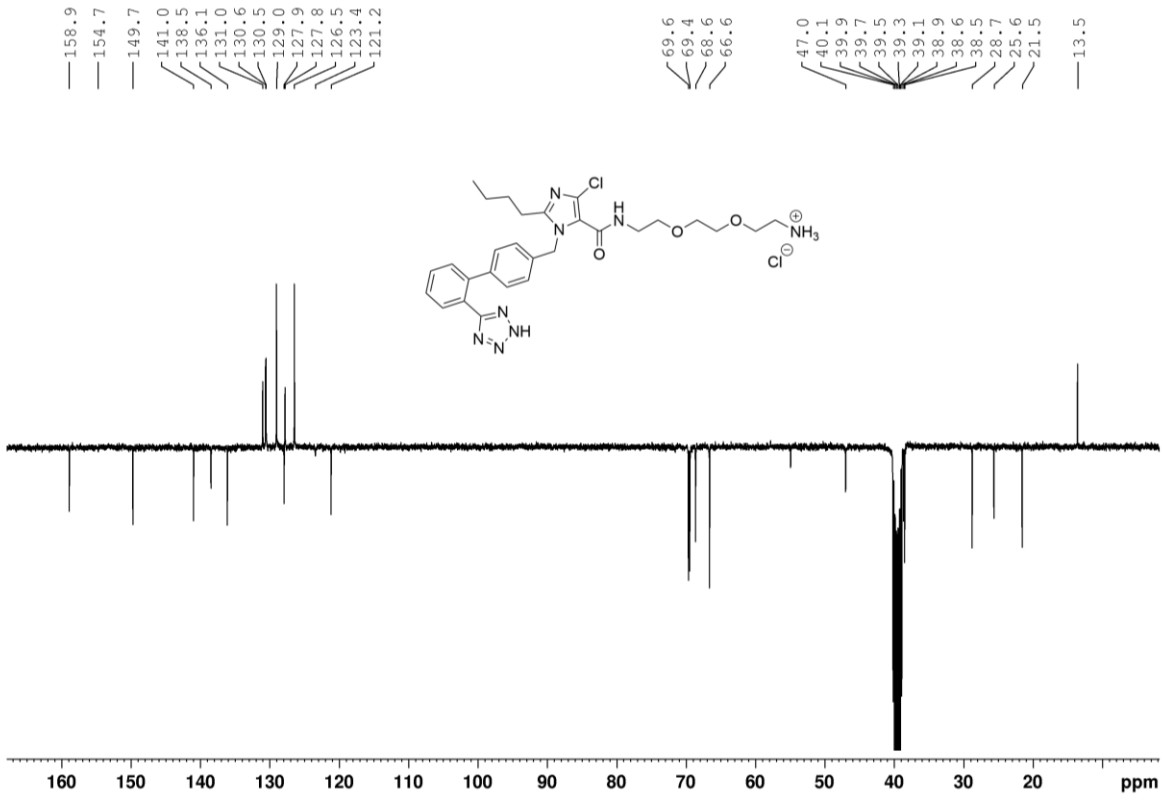


Figure S38: ^{13}C{^{1}H} APT NMR spectrum of **10** (DMSO-d_6, 100.6 MHz)

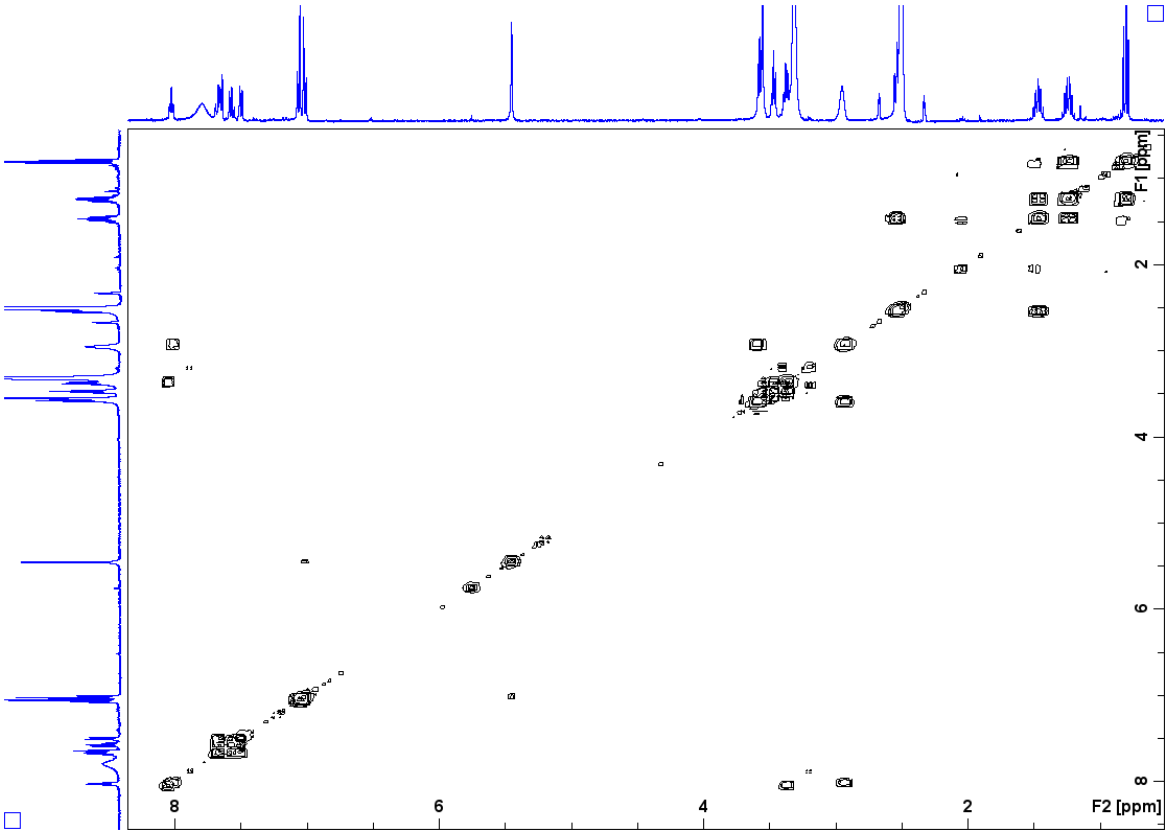


Figure S39: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of **10** (DMSO-d_6, 400 MHz)

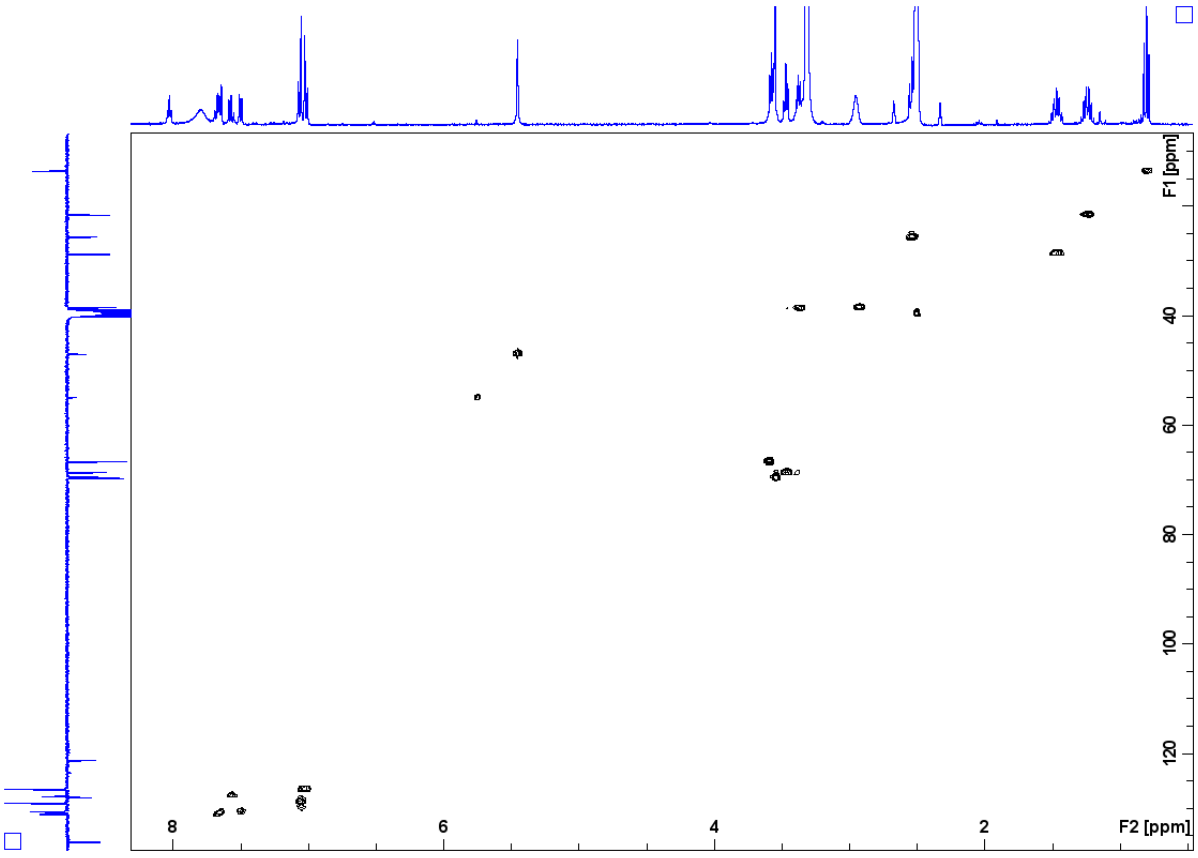


Figure S40: ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spectrum of **10** (DMSO-d_6, 400 MHz)

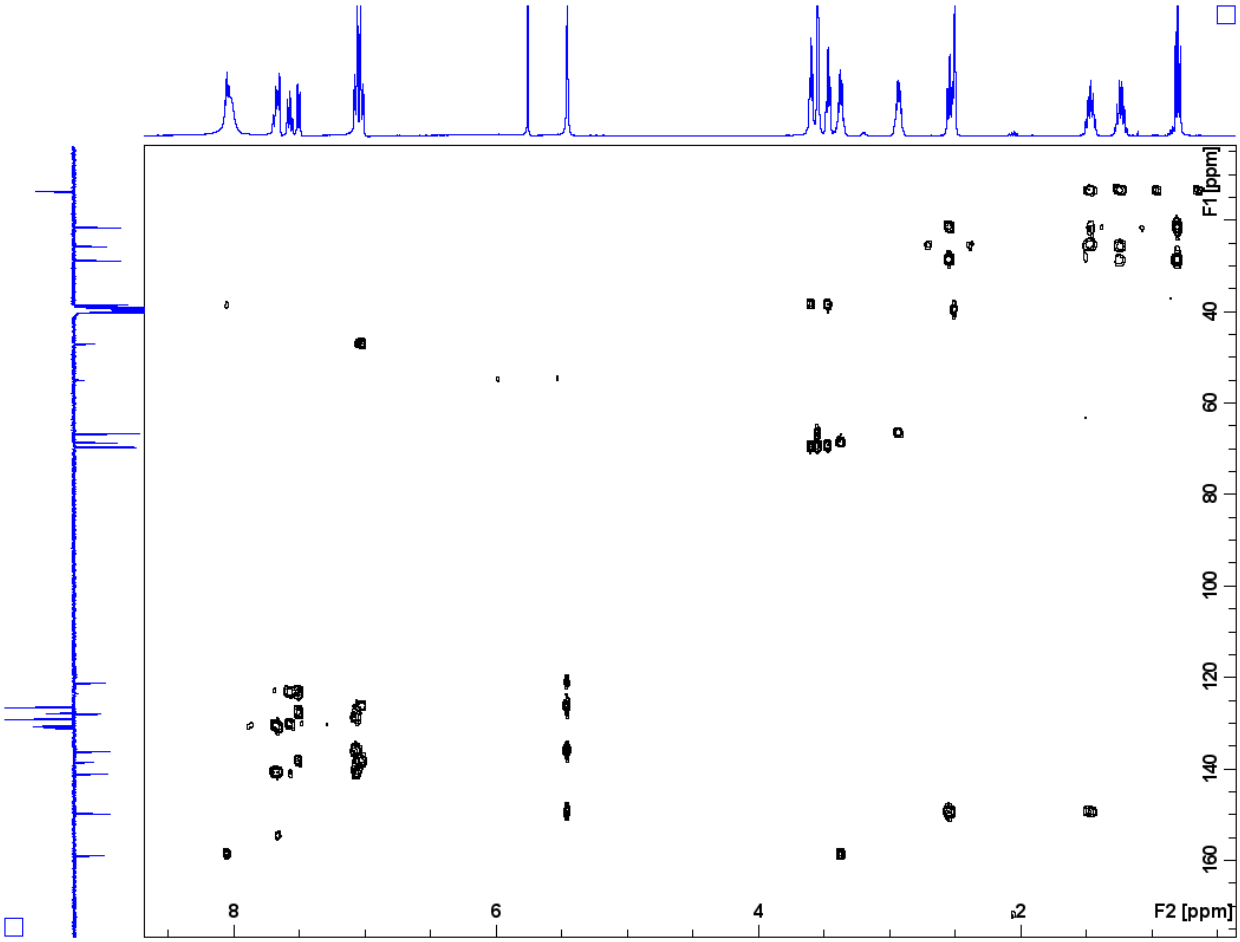


Figure S41: ^{1}H-^{13}C HMQC NMR spectrum of **10** (DMSO-d_6, 400 MHz)

14. NMR spectra and LC-MS analysis of Cy3-L-Losartan (11)

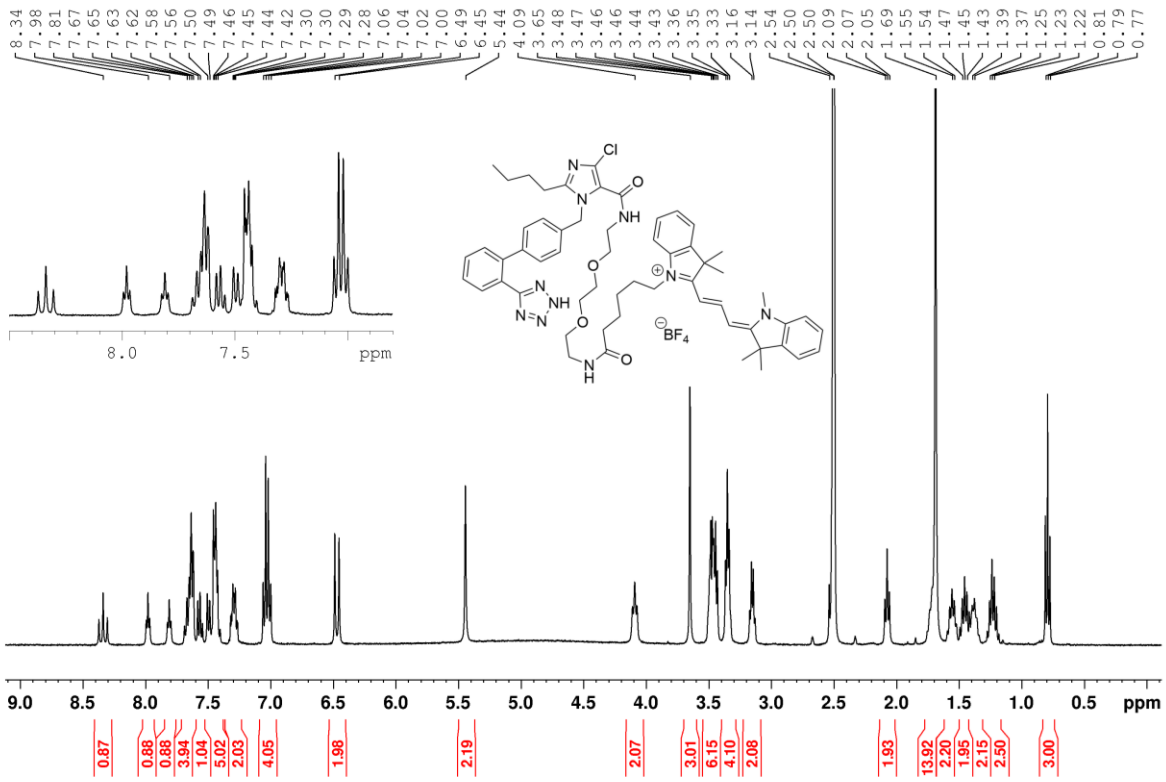


Figure S42: ^{1}H NMR spectrum of **11** (DMSO-d_6, 400 MHz)

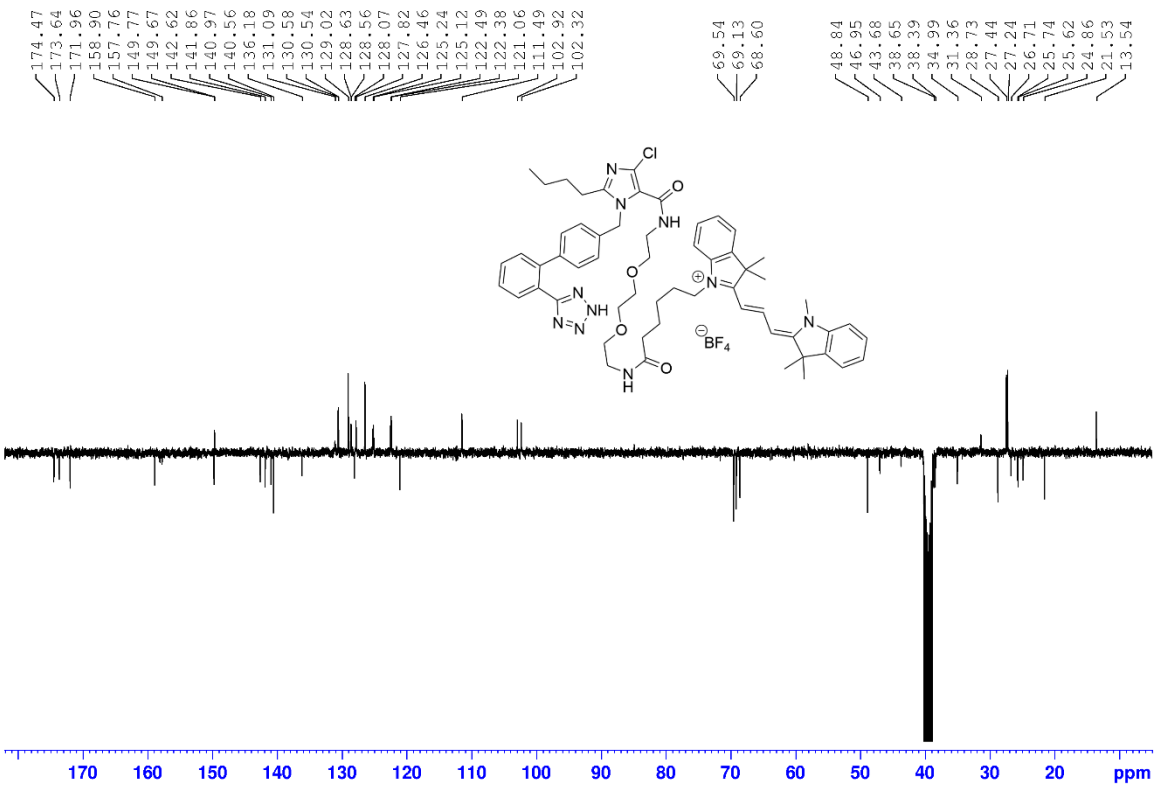


Figure S43: ^{13}C{^{1}H} APT NMR spectrum of **11** (DMSO-d_6, 100.6 MHz)

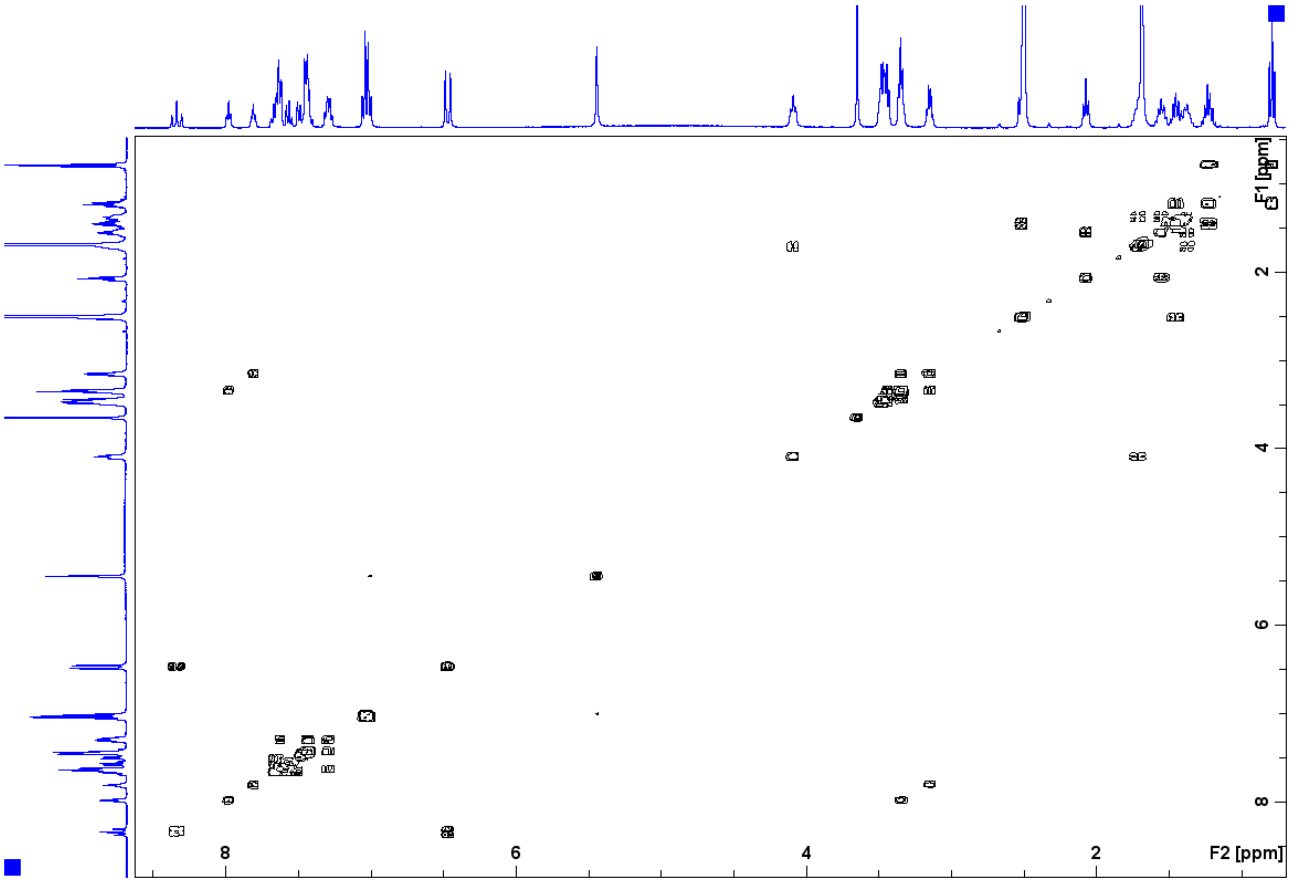


Figure S44: ^{1}H-^{1}H COSY NMR spectrum of **11** (DMSO-d_6, 400 MHz)

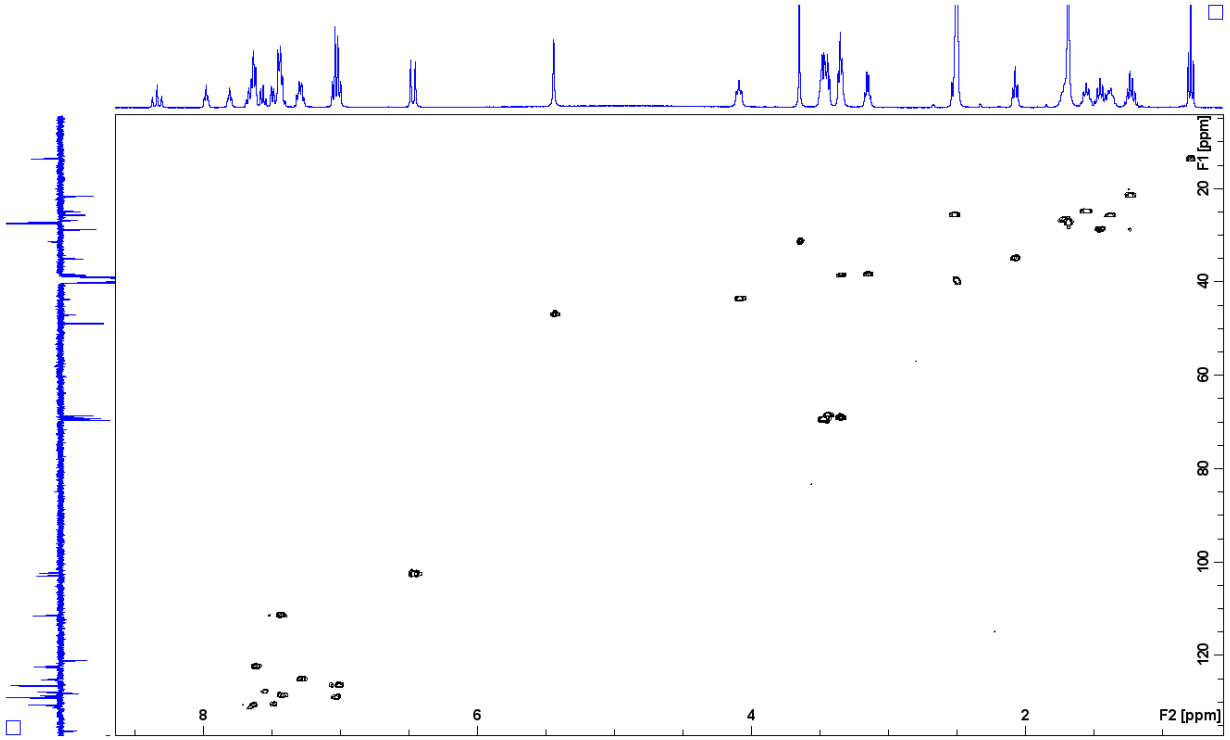


Figure S45: ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spectrum of **11** (DMSO-d_6, 400 MHz)

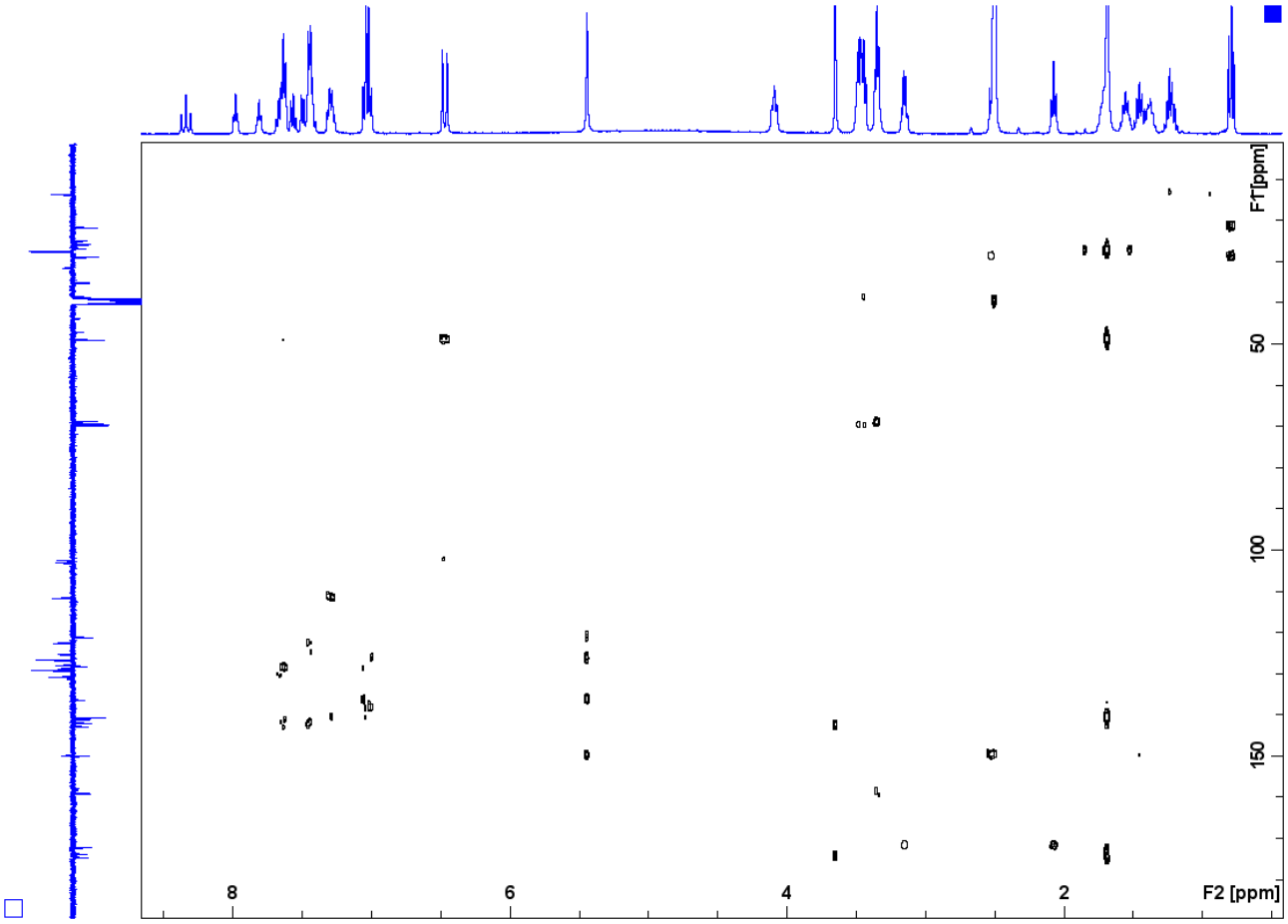


Figure S46: ^{1}H-^{13}C HMQC NMR spectrum of **11** (DMSO-d_6, 400 MHz)

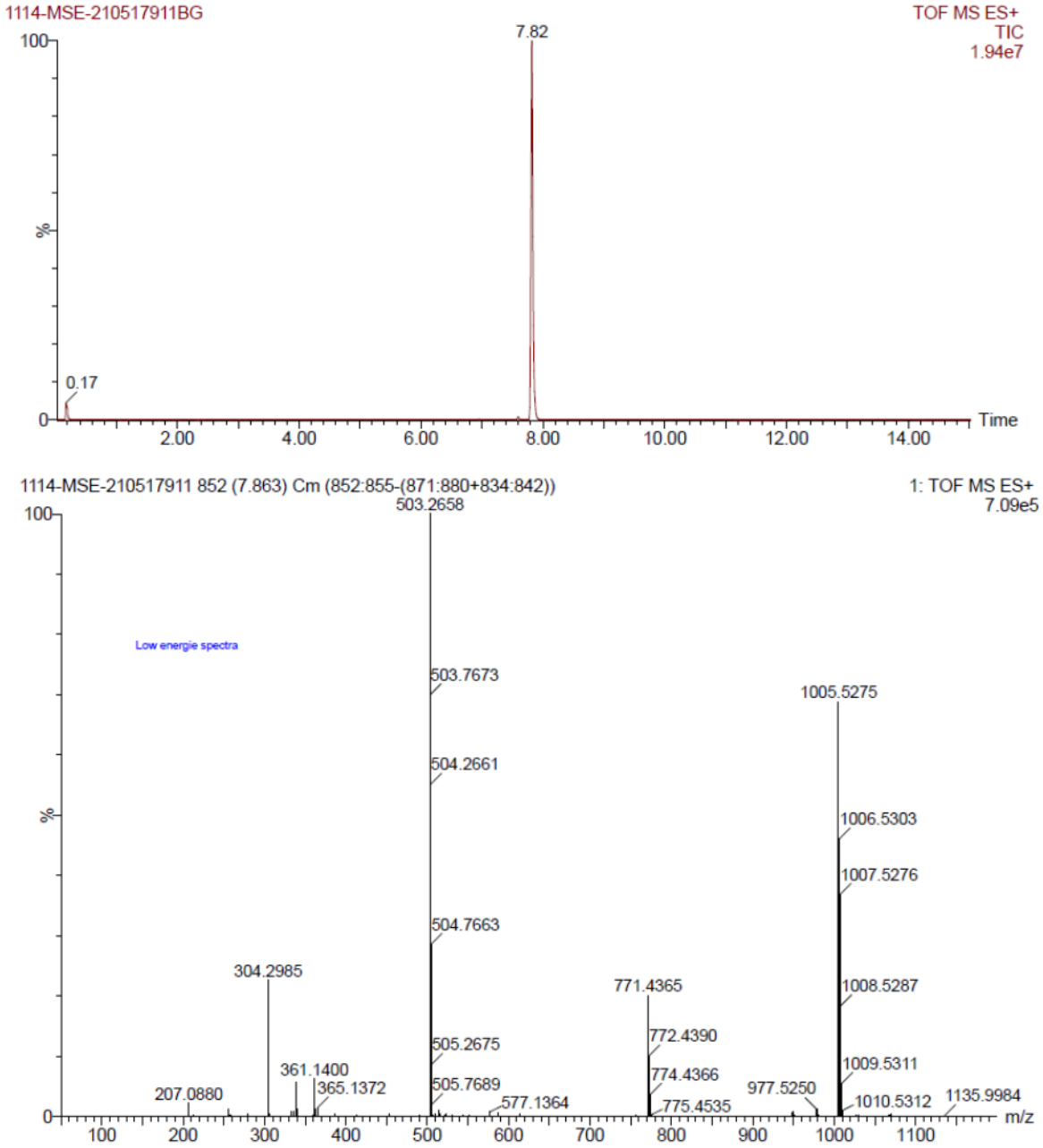


Figure S47: LC-MS analysis of **11**. 1) Upper part: HPLC analysis. Analytical RP-C18 HPLC column: Hypersil gold (1.9 µM, 2.1 x 20 mm). Mobile-phase A: H_2O + 0.1% HCO_2H. Mobile-phase B: CH_3CN. Flow rate: 500 µL/min. Gradient: 5% B isocratic for 2 minutes then 5% to 99% B in 10 minutes, 99% B isocratic for 1 minute, then 99% to 5% B in 1 minute, then 5% B isocratic for 1 minute. Detection mode: Total Ionisation Current (TIC). 2) Down part: Mass spectrum of the main peak, ESI mode. 1005.5275 $[M]^+$, 771.4365 $[M\text{-}CH_2PhPh(tetrazole)]^+$, 503.2658 $[M]^{2+}$.

15. Pharmacological characterization of scramble peptide (ScP)

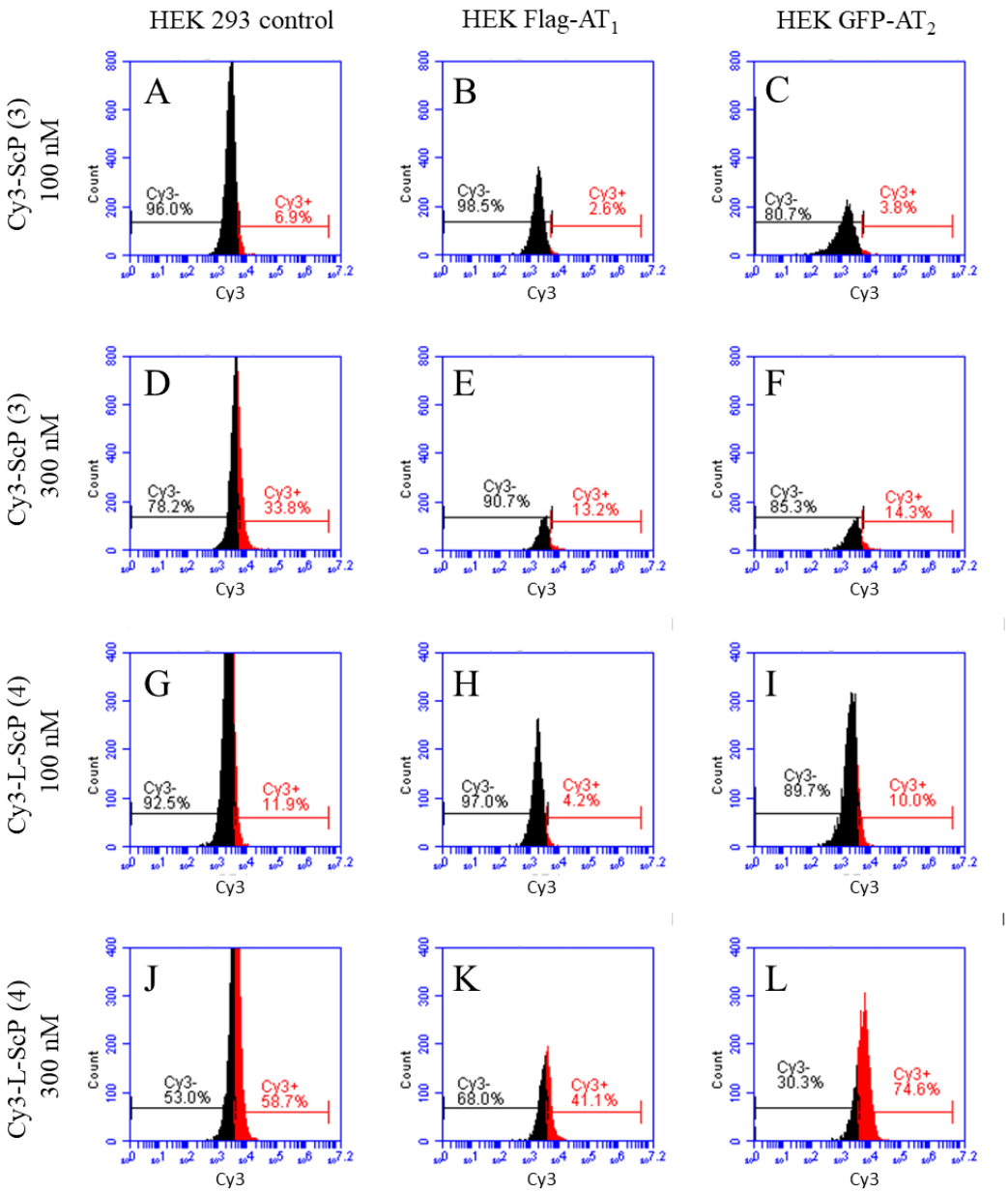


Figure S48: Binding of fluorescent scramble peptide (3-4) on cells overexpressing or not AT_1 or AT_2 receptors. Measurement of cell surface labeling of Cyanine 3 by flow cytometry on a population of HEK 293 cells (A/D/G/J), a population of HEK 293 cells overexpressing Flag-AT_1 receptor (B/E/H/K) and a population overexpressing GFP-AT_2 receptor (C/F/I/L). The cells were treated for 15 minutes at 37°C in HEPES buffer (no BSA) with 100 nM or 300 nM of Cy3-ScP (**3**) (A/B/C/D/E/F) or 100 nM or 300 nM of Cy3-L-ScP (**4**) (G/H/I/J/K/L) then rinsed before reading with the cytometer. The percentage of fluorescently labeled cells was determined after excitation with laser (561 nm) and the emission filter (586/15), detecting TAMRA or Cy3 fluorescence. (Labeled cells in red and unlabeled ones in black). Representative results from 3 separate experiments (Kaluza 2.2.1)

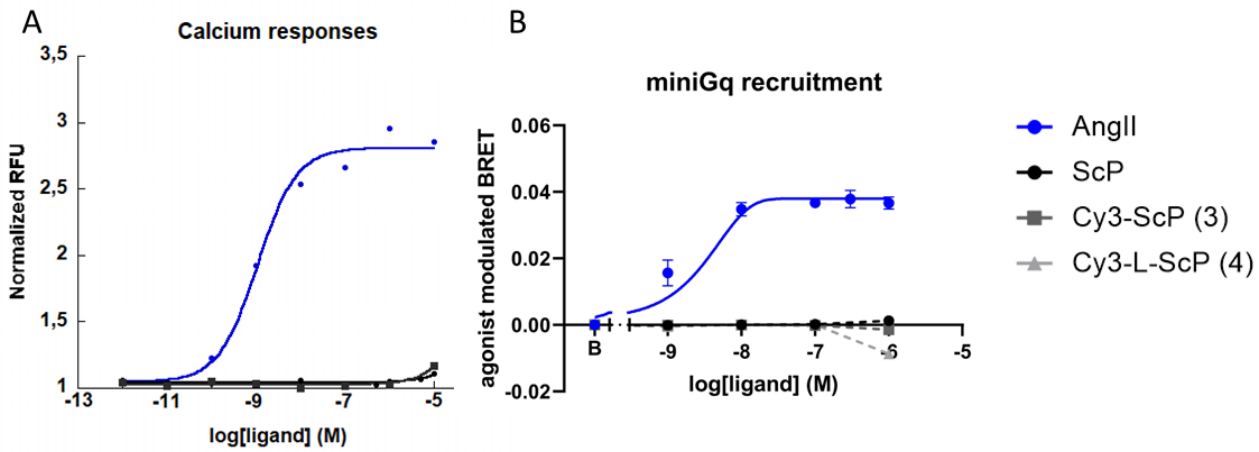


Figure S49: Effects of the scramble peptide and its fluorescent derivatives (3-4) on the G_q pathway in cells overexpressing AT_1 receptors. Calcium responses of the cells were recorded at 25°C in HEPES buffer (0.1% BSA). (A) Curves of the peaks of the calcium responses as a function of increasing concentrations of AngII or scramble peptide and its fluorescent derivatives (**3**-**4**) measured in HEK 293 cells overexpressing AT_1 receptor. Graphs shown are representative of n = 7 (AngII) or n = 1 (in duplicates, ScP) separate experiments. Each data point represents mean values (KaleidaGraph 4.0). (B) Recruitment of G_q protein by the AT_1 measured in HEK cells transiently overexpressing AT1-NLuc and Venus-miniGq. AT_1 was activated by AngII or scramble peptide and its fluorescent derivatives (**3**-**4**). Since the BRET signal was stable after 10 min of activation, the dose-response was performed 15 min after activation at 37°C in HEPES buffer (0.2% BSA). Graphs shown are representative of n = 4, or n = 1 (in duplicates, ScP) separate experiments. Each data point represents mean values ± SD. Fitting to Hill's logistic equation was used (Graphpad Prism 8.0.2).

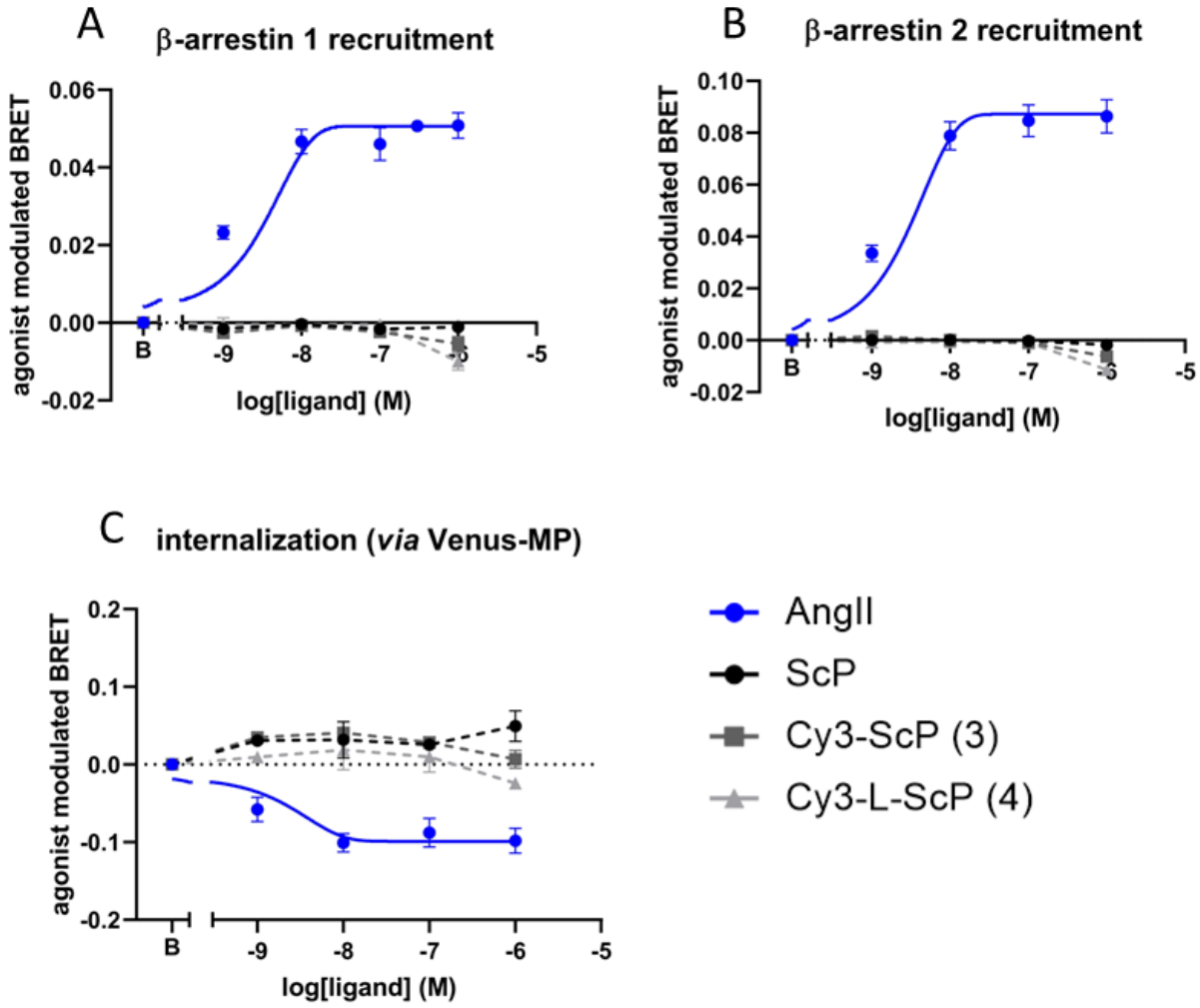


Figure S50: Effects of the scramble peptide and its fluorescent derivatives (3-4) on the β-arrestin pathway and on AT_1 internalization in cells overexpressing AT_1 receptor. Protein recruitment by AT_1 is measured in HEK 293 cells transiently overexpressing AT_1-NLuc and YPET-ARRB1 (A) or YPET-ARRB2 (B). AT_1 internalization was measured in HEK 293 cells transiently overexpressing Venus-MP (C). AT_1 receptors were activated for 15 min at 37°C in HEPES buffer (0.2% BSA) by AngII or scramble peptide and its fluorescent derivatives (**3**-**4**). Graphs shown are representative of n = 4 or n = 1 (ScP) separate experiments. Each data point represents mean values ± SD. Fitting to Hill's logistic equation was used (Graphpad Prism 8.0.2).

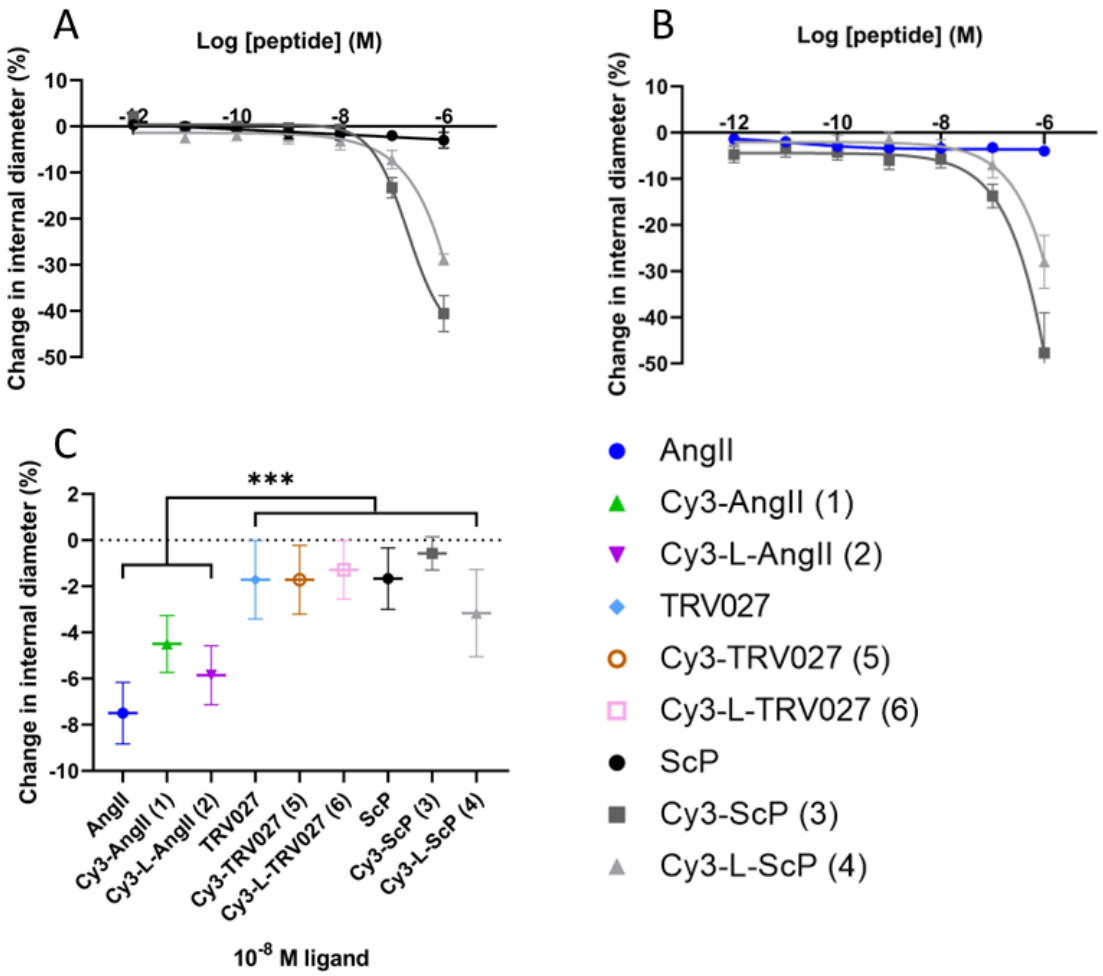


Figure S51: Measurements of the contractile responses of isolated and perfused rat middle cerebral arteries to the scramble peptide and its fluorescent derivatives (3-4) with or without AT_1 antagonist pretreatment. The concentration-response curves of the scramble peptide and its fluorescent derivatives (**3-4**) (A/B) were obtained after exposure (30 min) to (A) physiological saline solution or to (B) Losartan (10^{-5} M). Changes in internal diameter (%) are expressed as mean ± SEM. The graphs shown are representative of a minimum of n = 6 separate experiments. Fitting to Hill's equation was used (Graphpad Prism 8.0.2). Measurements of contractile responses of isolated and perfused rat middle cerebral arteries to different ligands at 10^{-8} M. AngII and the Cyanine 3 fluorescent peptides are compared to each other (C). Changes in internal diameter (%) are expressed as mean ± SEM. A two-way Anova (nature of the peptide, presence of the fluorophore) is used to calculate the P values, *P < 0.05 (P fluorophore = 0,42 ; P peptide = 0,0002 ; P interaction = 0,65) (Tukey post-hoc test) (Graphpad Prism 8.0.2)

16. Selectivity of the new fluorescent ligands at one dose and with dose response curves by flow cytometry

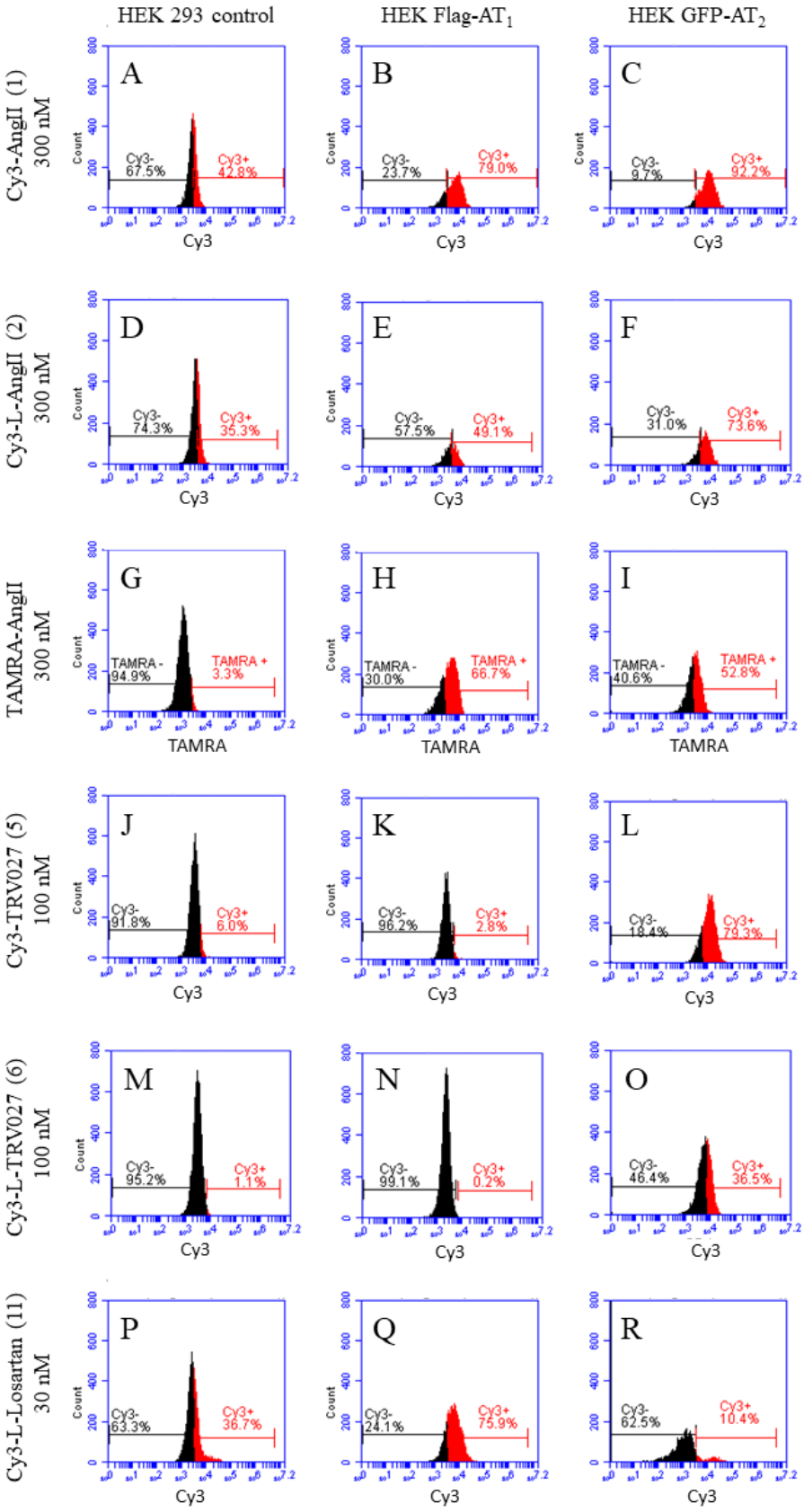


Figure S52: Selectivity at one dose of the new fluorescent ligands on cells stably overexpressing or not AT_1 or AT_2 receptors. Measurement of cell labeling of Cyanine 3 or TAMRA by flow cytometry on a population of HEK 293 cells (A/D/G/J/M/P), a population of HEK 293 cells overexpressing Flag-AT_1 receptor (B/E/H/K/N/Q) and a population overexpressing GFP-AT_2 receptor (C/F/I/L/O/R). The cells were treated for 15 min at 37°C in HEPES buffer (no BSA) with 300 nM of Cy3-AngII (**1**) (A/B/C), 300 nM of Cy3-L-AngII (**2**) (D/E/F), 300 nM of TAMRA-Ang II (G/H/I), 100 nM of Cy3-TRV027 (**5**) (J/K/L), 100 nM of Cy3-L-TRV027 (**6**) (M/N/O) or 30 nM of Cy3-L-Losartan (**11**) (P/Q/R) then rinsed before reading with the cytometer. The percentage of fluorescently labeled cells was determined after excitation with laser (561 nm) and the emission filter (586/15), detecting TAMRA or Cy3 fluorescence. (Labeled cells in red and unlabeled ones in black). Representative results from 3 separate experiments (Kaluza 2.2.1)

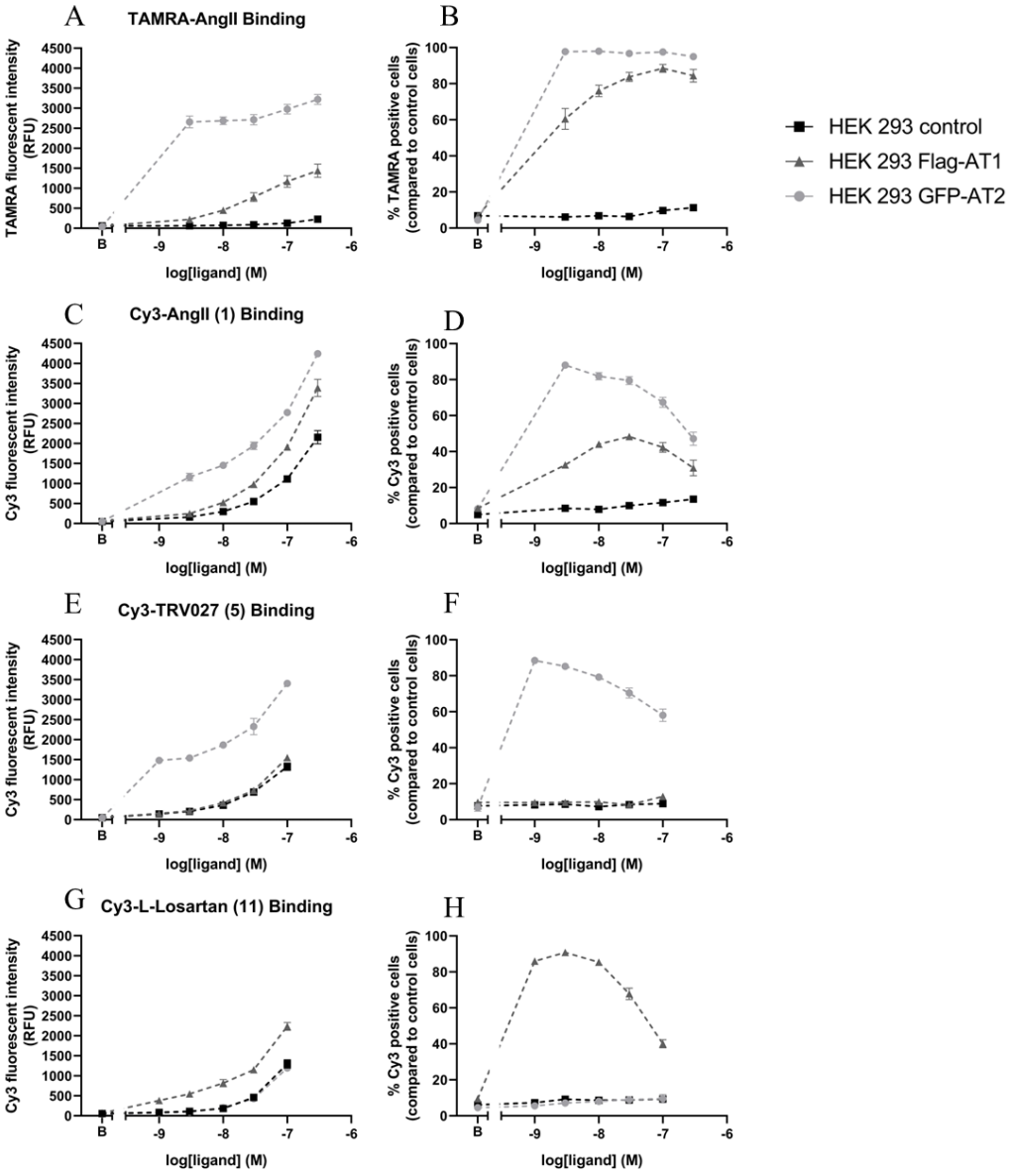


Figure S53: Binding of new fluorescent ligands on cells stably overexpressing or not AT_1 or AT_2 receptors. Measurement of cell labeling of Cyanine 3 or TAMRA by flow cytometry on a population of HEK 293 cells, a population of HEK 293 cells overexpressing Flag-AT_1 receptor and a population overexpressing GFP-AT_2 receptor. The cells were treated for 15 minutes at 37°C in HEPES buffer (0.2% BSA) with increasing concentrations of Cy3-AngII (**1**) (A/B), TAMRA-Ang II (C/D), Cy3-TRV027 (**5**) (E/F) or Cy3-L-Losartan (**11**) (G/H) then rinsed before reading with the cytometer. The total Cy3 and TAMRA median fluorescence intensity of a given cell population (A/C/E/G) and the percentage of fluorescently labeled cells relative to the HEK 293 negative control cells at the same ligand concentration (B/D/F/H) were determined after excitation with laser (561 nm) and the emission filter (586/15), detecting TAMRA or Cy3 fluorescence. Graphs shown are representative of n = 3 separate experiments. Each data point represents mean values ± SEM (Kaluza 2.2.1)

17. Representative confocal images

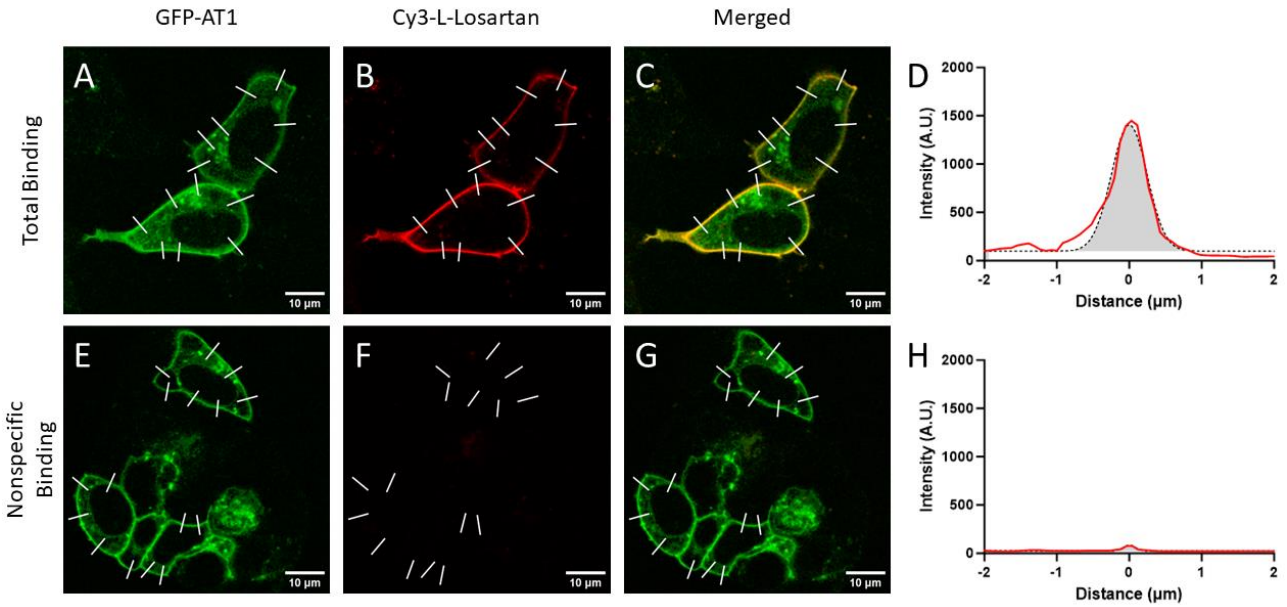


Figure S54: Representative images of GFP-AT1 cells analysed by HiTIAN. Cells transiently transfected with GFP-AT_1 were incubated with 30 nM Cy3-L-Losartan in the absence (Total, A-D) or presence of 10 µM losartan (Nonspecific Binding, E-G). Images showing either the GFP-AT_1 channel (A,E), the Cy3-L-Losartan channel (B,F) or both (C,G). The white lines show representative linear ROIs measured with the HiTIAN software. Representative intensity profiles (—) in the case of total (D) and nonspecific binding (H) are fitted with a gaussian profile (- - -) and the integrated signal (gray area) is used for RevCell analysis.

18. AT_1 dependent calcium responses by fluorescent derivatives based on TRV027

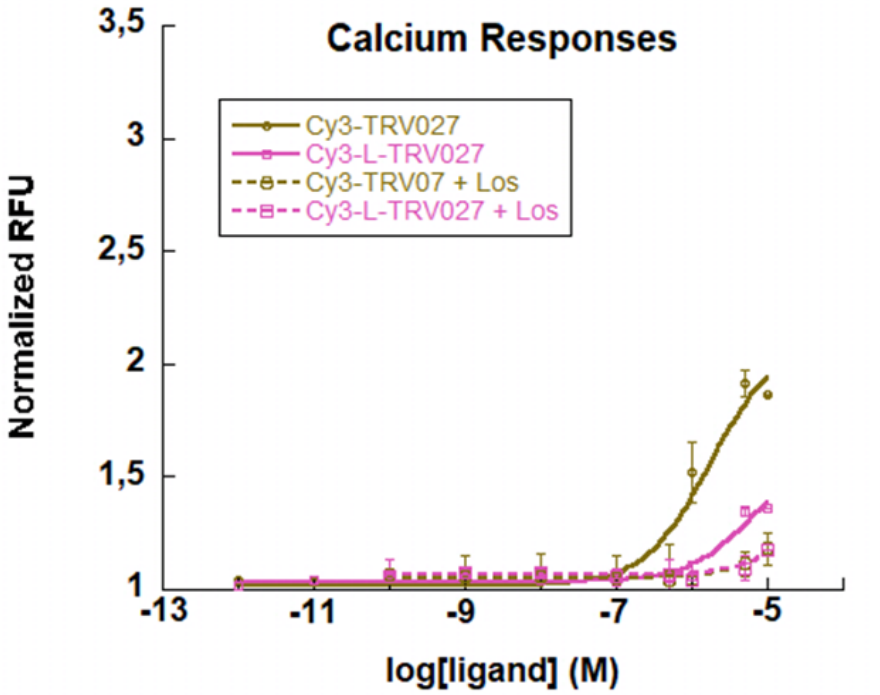


Figure S55: Effects of the new fluorescent ligands on the G_q pathway in cells overexpressing AT_1 receptor. Calcium responses of the cells were recorded at 25°C in HEPES buffer (no BSA). Curves of the peaks of the calcium responses as a function of increasing concentrations of fluorescent derivatives based on TRV027 (**5**-**6**) measured in HEK 293 cells overexpressing AT_1 receptors after pretreatment with buffer (solid curves) or losartan 10^{-5} M (dashed curves) at 37°C for 30 min. Graph shown is representative of n = 3 separate experiments. Each data point represents mean values ± SEM (KaleidaGraph 4.0).

Bibliographie

Abadir, P. M., Periasamy, A., Carey, R. M., & Siragy, H. M. (2006). Angiotensin II type 2 receptor bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *48*(2), 316-322. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000228997.88162.a8

AbdAlla, S., Lother, H., Abdel-tawab, A. M., & Quitterer, U. (2001a). The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1Receptor Antagonist. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(43), 39721-39726. https://doi.org/10.1074/jbc.M105253200

AbdAlla, S., Lother, H., el Massiery, A., & Quitterer, U. (2001b). Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nature Medicine*, *7*(9), 1003-1009. https://doi.org/10.1038/nm0901-1003

AbdAlla, S., Lother, H., Langer, A., el Faramawy, Y., & Quitterer, U. (2004). Factor XIIIA transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell*, *119*(3), 343-354. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.006

Ahn, S., Kim, J., Hara, M. R., Ren, X.-R., & Lefkowitz, R. J. (2009). β-Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(13), 8855-8865. https://doi.org/10.1074/jbc.M808463200

Alhusban, A., Fouda, A. Y., Bindu Pillai, Ishrat, T., Soliman, S., & Fagan, S. C. (2015). Compound 21 is pro-angiogenic in the brain and results in sustained recovery after ischemic stroke. *Journal of Hypertension*, *33*(1), 170. https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000364

An, J., Nakajima, T., Kuba, K., & Kimura, A. (2010). Losartan inhibits LPS-induced inflammatory signaling through a PPARgamma-dependent mechanism in human THP-1 macrophages. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, *33*(8), 831-835. https://doi.org/10.1038/hr.2010.79

Ando, H., Zhou, J., Macova, M., Imboden, H., & Saavedra, J. M. (2004). Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, *35*(7), 1726-1731. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000129788.26346.18

Andone, S., Bajko, Z., Motataianu, A., Maier, S., Barcutean, L., & Balasa, R. (2022). Neuroprotection in Stroke—Focus on the Renin-Angiotensin System : A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(7), 3876. https://doi.org/10.3390/ijms23073876

Asada, H., Inoue, A., Ngako Kadji, F. M., Hirata, K., Shiimura, Y., Im, D., Shimamura, T., Nomura, N., Iwanari, H., Hamakubo, T., Kusano-Arai, O., Hisano, H., Uemura, T., Suno, C., Aoki, J., & Iwata, S. (2020). The Crystal Structure of Angiotensin II Type 2 Receptor with Endogenous Peptide Hormone. *Structure*, *28*(4), 418-425.e4. https://doi.org/10.1016/j.str.2019.12.003

Auzan, C., & Clauser, É. (2009). Structure et fonctions des récepteurs AT1 de l'angiotensine II au cours de l'évolution. *Journal de la Société de Biologie*, *203*(4), 295-302. https://doi.org/10.1051/jbio/2009033

Azam, S., Haque, M. E., Jakaria, M., Jo, S.-H., Kim, I.-S., & Choi, D.-K. (2020). G-Protein-Coupled Receptors in CNS : A Potential Therapeutic Target for Intervention in Neurodegenerative Disorders and Associated Cognitive Deficits. *Cells*, *9*(2), 506. https://doi.org/10.3390/cells9020506

Badejo Jr, A., Greco, A. J., Casey, D. B., Cook, J. L., Murthy, S. N., & Kadowitz, P. J. (2009). Analysis of hemodynamic responses and the proliferative effect of the novel angiotensin peptide Angiotensin A. *The FASEB Journal*, *23*(S1), 935.2-935.2. https://doi.org/10.1096/fasebj.23.1_supplement.935.2

Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Müller, D. N., Luft, F. C., & Ganten, D. (2001). Tissue renin-angiotensin systems : New insights from experimental animal models in hypertension research. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *79*(2-3), 76-102. https://doi.org/10.1007/s001090100210

Barnes, J. M., Steward, L. J., Barber, P. C., & Barnes, N. M. (1993). Identification and characterisation of angiotensin II receptor subtypes in human brain. *European Journal of Pharmacology*, *230*(3), 251-258. https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90558-y

Bath, P. M. W., Martin, R. H., Palesch, Y., Cotton, D., Yusuf, S., Sacco, R., Diener, H.-C., Toni, D., Estol, C., Roberts, R., & PRoFESS Study Group. (2009). Effect of telmisartan on functional outcome, recurrence, and blood pressure in patients with acute mild ischemic stroke : A PRoFESS subgroup analysis. *Stroke*, *40*(11), 3541-3546. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.555623

Baumbach, G. L., Sigmund, C. D., & Faraci, F. M. (2003). Cerebral arteriolar structure in mice overexpressing human renin and angiotensinogen. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *41*(1), 50-55. https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000042427.05390.5c

Beautrait, A., Paradis, J. S., Zimmerman, B., Giubilaro, J., Nikolajev, L., Armando, S., Kobayashi, H., Yamani, L., Namkung, Y., Heydenreich, F. M., Khoury, E., Audet, M., Roux, P. P., Veprintsev, D. B., Laporte, S. A., & Bouvier, M. (2017). A new inhibitor of the β-arrestin/AP2 endocytic complex reveals interplay between GPCR internalization and signalling. *Nature Communications*, *8*, 15054. https://doi.org/10.1038/ncomms15054

Belcastro, E., Wu, W., Fries-Raeth, I., Corti, A., Pompella, A., Leroy, P., Lartaud, I., & Gaucher, C. (2017). Oxidative stress enhances and modulates protein S-nitrosation in smooth muscle cells exposed to S-nitrosoglutathione. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, *69*, 10-21. https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.07.004

Benicky, J., Hafko, R., Sanchez-Lemus, E., Aguilera, G., & Saavedra, J. M. (2012). Six Commercially Available Angiotensin II AT1 Receptor Antibodies are Non-specific. *Cellular and molecular neurobiology*, *32*(8), 1353-1365. https://doi.org/10.1007/s10571-012-9862-y

Bennion, D. M., Haltigan, E., Regenhardt, R. W., Steckelings, U. M., & Sumners, C. (2015). Neuroprotective mechanisms of the ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in stroke. *Current Hypertension Reports*, *17*(2), 3. https://doi.org/10.1007/s11906-014-0512-2

Bennion, D. M., Jones, C. H., Donnangelo, L. L., Graham, J. T., Isenberg, J. D., Dang, A. N., Rodriguez, V., Sinisterra, R. D. M., Sousa, F. B., Santos, R. A. S., & Sumners, C. (2018). Neuroprotection by post-stroke administration of an oral formulation of angiotensin-(1-7) in ischaemic stroke. *Experimental Physiology*, *103*(6), 916-923. https://doi.org/10.1113/EP086957

Bennion, D. M., Rosado, C. A., Haltigan, E. A., Regenhardt, R. W., Sumners, C., & Waters, M. F. (2016). Serum activity of angiotensin converting enzyme 2 is decreased in patients with acute ischemic stroke. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS*, *17*(3), 1470320316661060. https://doi.org/10.1177/1470320316661060

Bertrand, L., Parent, S., Caron, M., Legault, M., Joly, E., Angers, S., Bouvier, M., Brown, M., Houle, B., & Ménard, L. (2002). The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells : A platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRS). *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, *22*(1-4), 533-541. https://doi.org/10.1081/rrs-120014619

Bihl, J. C., Zhang, C., Zhao, Y., Xiao, X., Ma, X., Chen, Y., Chen, S., Zhao, B., & Chen, Y. (2015). Angiotensin-(1-7) Counteracts the Effects of Ang II on Vascular Smooth Muscle Cells, Vascular Remodeling and Hemorrhagic Stroke : Role of the NFκB Inflammatory Pathway. *Vascular pharmacology*, *73*, 115-123. https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.08.007

Boerrigter, G., Lark, M. W., Whalen, E. J., Soergel, D. G., Violin, J. D., & Burnett, J. C. (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. *Circulation. Heart Failure*, *4*(6), 770-778. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.962571

Boerrigter, G., Soergel, D. G., Violin, J. D., Lark, M. W., & Burnett, J. C. (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. *Circulation. Heart Failure*, *5*(5), 627-634. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.969220

Bosch, J., Yusuf, S., Pogue, J., Sleight, P., Lonn, E., Rangoonwala, B., Davies, R., Ostergren, J., Probstfield, J., & HOPE Investigators. Heart outcomes prevention evaluation. (2002). Use of ramipril in preventing stroke : Double blind randomised trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *324*(7339), 699-702. https://doi.org/10.1136/bmj.324.7339.699

BOURESSAM, M. L. (2018). *Importance de la S-nitrosation des récepteurs cérébrovasculaires de l'angiotensine II* [Thesis]. Université de Lorraine.

Bouressam, M.-L., Lartaud, I., Dupuis, F., & Lecat, S. (2018). No answer to the lack of specificity : Mouse monoclonal antibody targeting the angiotensin II type 1 receptor AT1 fails to recognize its target. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *391*(8), 883-889. https://doi.org/10.1007/s00210-018-1522-4

Bouressam, M.-L., Lecat, S., Raoul, A., Gaucher, C., Perrin-Sarrado, C., Lartaud, I., & Dupuis, F. (2019). S-nitrosoglutathione inhibits cerebrovascular angiotensin II-dependent and -independent AT1 receptor responses : A possible role of S-nitrosation. *British Journal of Pharmacology*, *176*(12), 2049-2062. https://doi.org/10.1111/bph.14644

Braun-Menendez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F., & Muñoz, J. M. (1940). The substance causing renal hypertension. *The Journal of Physiology*, *98*(3), 283-298. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1940.sp003850

Brinkenfeldt, N. K., Dias, A., Moreno-Pescador, G., Bendix, P. M., & Martinez, K. L. (2023). *Quantitative Determination of Protein Concentrations in Living Cells* [Preprint]. Biophysics. https://doi.org/10.1101/2023.05.31.542874

Bromann, P. A., Korkaya, H., & Courtneidge, S. A. (2004). The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene*, *23*(48), 7957-7968. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208079

Cabana, J., Holleran, B., Leduc, R., Escher, E., Guillemette, G., & 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. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(25), 15835-15854. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627356

Campagnole-Santos, M. J., Diz, D. I., Santos, R. A., Khosla, M. C., Brosnihan, K. B., & Ferrario, C. M. (1989). Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *American*

Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, *257*(1), H324-H329. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1989.257.1.H324

Carey, R. M. (2017a). AT2 Receptors : Potential Therapeutic Targets for Hypertension. *American Journal of Hypertension*, *30*(4), 339-347. https://doi.org/10.1093/ajh/hpw121

Carey, R. M. (2017b). BLOOD PRESSURE AND THE RENAL ACTIONS OF AT2 RECEPTORS. *Current hypertension reports*, *19*(3), 21. https://doi.org/10.1007/s11906-017-0720-7

Cézanne, L., Lecat, S., Lagane, B., Millot, C., Vollmer, J.-Y., Matthes, H., Galzi, J.-L., & Lopez, A. (2004). Dynamic Confinement of NK2 Receptors in the Plasma Membrane : IMPROVED FRAP ANALYSIS AND BIOLOGICAL RELEVANCE *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(43), 45057-45067. https://doi.org/10.1074/jbc.M404811200

Chaki, S., & Inagami, T. (1992). Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *182*(1), 388-394. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)80157-3

Choi, H., Tostes, R. C., & Webb, R. C. (2011). S-Nitrosylation inhibits protein kinase C-mediated contraction in mouse aorta. *Journal of cardiovascular pharmacology*, *57*(1), 65-71. https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181fef9cb

Chrysant, S. G. (2004). Stroke prevention with losartan in the context of other antihypertensive drugs. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, *40*(9), 791-801. https://doi.org/10.1358/dot.2004.40.9.850498

Chrysant, S. G. (2007). The pathophysiologic role of the brain renin-angiotensin system in stroke protection : Clinical implications. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, *9*(6), 454-459. https://doi.org/10.1111/j.1524-6175.2007.06602.x

Cleghorn, W. M., Branch, K. M., Kook, S., Arnette, C., Bulus, N., Zent, R., Kaverina, I., Gurevich, E. V., Weaver, A. M., & Gurevich, V. V. (2015). Arrestins regulate cell spreading and motility via focal adhesion dynamics. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(4), 622-635. https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0740

Colin, M., Delaitre, C., Foulquier, S., & Dupuis, F. (2023). The AT1/AT2 Receptor Equilibrium Is a Cornerstone of the Regulation of the Renin Angiotensin System beyond the Cardiovascular System. *Molecules*, *28*(14), Article 14. https://doi.org/10.3390/molecules28145481

Comeo, E., Kindon, N. D., Soave, M., Stoddart, L. A., Kilpatrick, L. E., Scammells, P. J., Hill, S. J., & Kellam, B. (2020). Subtype-Selective Fluorescent Ligands as Pharmacological Research Tools for the Human Adenosine A2A Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(5), 2656-2672. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01856

Conchon, S., Peltier, N., Corvol, P., & Clauser, E. (1998). A noninternalized nondesensitized truncated AT1A receptor transduces an amplified ANG II signal. *The American Journal of Physiology*, *274*(2), E336-345. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1998.274.2.E336

Cvicek, V., Iii, W. A. G., & Abrol, R. (2016). Structure-Based Sequence Alignment of the Transmembrane Domains of All Human GPCRs : Phylogenetic, Structural and Functional Implications. *PLOS Computational Biology*, *12*(3), e1004805. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004805

Dahboul, F., Perrin-Sarrado, C., Boudier, A., Lartaud, I., Schneider, R., & Leroy, P. (2014). S,S'-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other S-nitrosothiols. *European Journal of Pharmacology*, *730*, 171-179. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.02.034

Dahlöf, B., Devereux, R. B., Kjeldsen, S. E., Julius, S., Beevers, G., de Faire, U., Fyhrquist, F., Ibsen, H., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., Lindholm, L. H., Nieminen, M. S., Omvik, P., Oparil, S., Wedel, H., & LIFE Study Group. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE) : A randomised trial against atenolol. *Lancet (London, England)*, *359*(9311), 995-1003. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08089-3

Davis, M. E., Grumbach, I. M., Fukai, T., Cutchins, A., & Harrison, D. G. (2004). Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(1), 163-168. https://doi.org/10.1074/jbc.M307528200

De Silva, T. M., & Faraci, F. M. (2012). Effects of angiotensin II on the cerebral circulation : Role of oxidative stress. *Frontiers in Physiology*, *3*, 484. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00484

de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., & Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological Reviews*, *52*(3), 415-472.

Delaitre, C., Boisbrun, M., Lecat, S., & Dupuis, F. (2021). Targeting the Angiotensin II Type 1 Receptor in Cerebrovascular Diseases : Biased Signaling Raises New Hopes. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), Article 13. https://doi.org/10.3390/ijms22136738

Deminice, R., Hyatt, H., Yoshihara, T., Ozdemir, M., Nguyen, B., Levine, S., & Powers, S. (2020). Human and Rodent Skeletal Muscles Express Angiotensin II Type 1 Receptors. *Cells*, *9*(7), 1688. https://doi.org/10.3390/cells9071688

de Oliveira-Sales, E. B., Nishi, E. E., Boim, M. A., Dolnikoff, M. S., Bergamaschi, C. T., & Campos, R. R. (2010). Upregulation of AT1R and iNOS in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) is essential for the sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C Wistar rat model. *American Journal of Hypertension*, *23*(7), 708-715. https://doi.org/10.1038/ajh.2010.64

Deslauriers, B., Ponce, C., Lombard, C., Larguier, R., Bonnafous, J. C., & Marie, J. (1999). N-glycosylation requirements for the AT1a angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane. *The Biochemical Journal*, *339 (Pt 2)*(Pt 2), 397-405.

DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2007). β-Arrestins and Cell Signaling. *Annual Review of Physiology*, *69*(1), 483-510. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749

Di, J.-H., Li, C., Yu, H.-M., Zheng, J.-N., & Zhang, G.-Y. (2012). nNOS downregulation attenuates neuronal apoptosis by inhibiting nNOS-GluR6 interaction and GluR6 nitrosylation in cerebral ischemic reperfusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *420*(3), 594-599. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.039

Diener, H.-C., Sacco, R. L., Yusuf, S., Cotton, D., Ôunpuu, S., Lawton, W. A., Palesch, Y., Martin, R. H., Albers, G. W., Bath, P., Bornstein, N., Chan, B. P. L., Chen, S.-T., Cunha, L., Dahlöf, B., Keyser, J. D., Donnan, G. A., Estol, C., Gorelick, P., … Yoon, B.-W. (2008). Effects of aspirin plus extended-release dipyridamole versus clopidogrel and telmisartan on disability and cognitive function after recurrent stroke in patients with ischaemic stroke in the Prevention Regimen for Effectively Avoiding Second Strokes (PRoFESS) trial : A double-blind, active and placebo-controlled study. *Lancet neurology*, *7*(10), 875-884. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70198-4

Dimitropoulou, C., White, R. E., Fuchs, L., Zhang, H., Catravas, J. D., & Carrier, G. O. (2001). Angiotensin II Relaxes Microvessels Via the AT2 Receptor and Ca2+-Activated K+ (BKCa) Channels. *Hypertension*, *37*(2), 301-307. https://doi.org/10.1161/01.HYP.37.2.301

Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., & Acton, S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research*, *87*(5), E1-9. https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1

Dostal, D. E., Hunt, R. A., Kule, C. E., Bhat, G. J., Karoor, V., McWhinney, C. D., & Baker, K. M. (1997). Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function : Intracardiac effects and signal transduction pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *29*(11), 2893-2902. https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0524

Dupré, D. J., Robitaille, M., Rebois, R. V., & Hébert, T. E. (2009). The Role of Gβγ Subunits in the Organization, Assembly, and Function of GPCR Signaling Complexes. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *49*, 31-56. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-061008-103038

Dupuis, F., Atkinson, J., Limiñana, P., & Chillon, J.-M. (2005). Comparative effects of the angiotensin II receptor blocker, telmisartan, and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cerebrovascular structure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, *23*(5), 1061-1066. https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000166848.95592.a5

Dupuis, F., Vincent, J.-M., Limiñana, P., Chillon, J.-M., Capdeville-Atkinson, C., & Atkinson, J. (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. *Journal of Hypertension*, *28*(7), 1566-1573. https://doi.org/10.1097/hjh.0b013e328339f1f3

Duran-Corbera, A., Faria, M., Ma, Y., Prats, E., Dias, A., Catena, J., Martinez, K. L., Raldua, D., Llebaria, A., & Rovira, X. (2022). A Photoswitchable Ligand Targeting the β1-Adrenoceptor Enables Light-Control of the Cardiac Rhythm**. *Angewandte Chemie International Edition*, *61*(30), e202203449. https://doi.org/10.1002/anie.202203449

Durand, M. J., Raffai, G., Weinberg, B. D., & Lombard, J. H. (2010). Angiotensin-(1-7) and low-dose angiotensin II infusion reverse salt-induced endothelial dysfunction via different mechanisms in rat middle cerebral arteries. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *299*(4), H1024-H1033. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00328.2010

Dzau, V., & Braunwald, E. (1991). Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease : A workshop consensus statement. *American Heart Journal*, *121*(4 Pt 1), 1244-1263. https://doi.org/10.1016/0002-8703(91)90694-d

El Khamlichi, C., Reverchon-Assadi, F., Hervouet-Coste, N., Blot, L., Reiter, E., & Morisset-Lopez, S. (2019). Bioluminescence Resonance Energy Transfer as a Method to Study Protein-Protein Interactions : Application to G Protein Coupled Receptor Biology. *Molecules*, *24*(3), 537. https://doi.org/10.3390/molecules24030537

Elorza, A., Penela, P., Sarnago, S., & Mayor, F. (2003). MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(31), 29164-29173. https://doi.org/10.1074/jbc.M304314200

Engelhorn, T., Goerike, S., Doerfler, A., Okorn, C., Forsting, M., Heusch, G., & Schulz, R. (2004). The Angiotensin II Type 1—Receptor Blocker Candesartan Increases Cerebral Blood Flow, Reduces Infarct Size, and Improves Neurologic Outcome after Transient Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *24*(4), 467-474. https://doi.org/10.1097/00004647-200404000-00012

England, C. G., Ehlerding, E. B., & Cai, W. (2016). NanoLuc : A Small Luciferase is Brightening up the Field of Bioluminescence. *Bioconjugate chemistry*, *27*(5), 1175-1187. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00112

Fagan, S. C., Kozak, A., Hill, W. D., Pollock, D. M., Xu, L., Johnson, M. H., Ergul, A., & Hess, D. C. (2006). Hypertension after experimental cerebral ischemia : Candesartan provides neurovascular protection. *Journal of Hypertension*, *24*(3), 535-539. https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000209990.41304.43

Farah, C., Michel, L. Y. M., & Balligand, J.-L. (2018). Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews. Cardiology*, *15*(5), 292-316. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.224

Felker, G. M., Butler, J., Collins, S. P., Cotter, G., Davison, B. A., Ezekowitz, J. A., Filippatos, G., Levy, P. D., Metra, M., Ponikowski, P., Soergel, D. G., Teerlink, J. R., Violin, J. D., Voors, A. A., & Pang, P. S. (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 Failure*, *3*(3), 193-201. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2014.09.008

Ferreira, A. J., Jacoby, B. A., Araújo, C. A. A., Macedo, F. A. F. F., Silva, G. A. B., Almeida, A. P., Caliari, M. V., & Santos, R. A. S. (2007). The nonpeptide angiotensin-(1–7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *292*(2), H1113-H1119. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00828.2006

Ferreira, A. J., Santos, R. A., & Almeida, A. P. (2001). Angiotensin-(1-7) : Cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *38*(3 Pt 2), 665-668. https://doi.org/10.1161/01.hyp.38.3.665

Ferro, A., Coash, M., Yamamoto, T., Rob, J., Ji, Y., & Queen, L. (2004). Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *British Journal of Pharmacology*, *143*(3), 397-403. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705933

Fessart, D., Simaan, M., & Laporte, S. A. (2005). C-Src Regulates Clathrin Adapter Protein 2 Interaction with β-Arrestin and the Angiotensin II Type 1 Receptor during Clathrin- Mediated Internalization. *Molecular Endocrinology*, *19*(2), 491-503. https://doi.org/10.1210/me.2004-0246

Fischer-Ferraro, C., Nahmod, V. E., Goldstein, D. J., & Finkielman, S. (1971). ANGIOTENSIN AND RENIN IN RAT AND DOG BRAIN. *The Journal of Experimental Medicine*, *133*(2), 353-361.

Fitchett, D. (2007). Clinical trial update : Focus on the ONTARGET study. *Vascular Health and Risk Management*, *3*(6), 901-908.

Force, T., Pombo, C. M., Avruch, J. A., Bonventre, J. V., & Kyriakis, J. M. (1996). Stress-Activated Protein Kinases in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, *78*(6), 947-953. https://doi.org/10.1161/01.RES.78.6.947

Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases : Regulation and function. *European Heart Journal*, *33*(7), 829-837. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304

Fouda, A. Y., Artham, S., El-Remessy, A. B., & Fagan, S. C. (2016). Renin-angiotensin system as a potential therapeutic target in stroke and retinopathy : Experimental and clinical evidence. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *130*(4), 221-238. https://doi.org/10.1042/CS20150350

Foulquier, S., Dupuis, F., Perrin-Sarrado, C., Gatè, K. M., Leroy, P., Liminana, P., Atkinson, J., Capdeville-Atkinson, C., & Lartaud, I. (2012). Differential effects of short-term treatment with two AT1 receptor blockers on diameter of pial arterioles in SHR. *PloS One*, *7*(9), e42469. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042469

Foulquier, S., Dupuis, F., Perrin-Sarrado, C., Maguin Gaté, K., Merhi-Soussi, F., Liminana, P., Kwan, Y.-W., Capdeville-Atkinson, C., Lartaud, I., & Atkinson, J. (2011). High salt intake abolishes AT(2)-mediated vasodilation of pial arterioles in rats. *Journal of Hypertension*, *29*(7), 1392-1399. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328347050e

Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, *63*(6), 1256-1272. https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256

Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Molecular Pharmacology*, *67*(5), 1414-1425. https://doi.org/10.1124/mol.104.009001

Gáborik, Z., & Hunyady, L. (2004). Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *15*(6), 286-293. https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.06.009

Galandrin, S., Oligny-Longpré, G., & Bouvier, M. (2007). The evasive nature of drug efficacy : Implications for drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, *28*(8), 423-430. https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.06.005

Galzi, J.-L., Hachet-Haas, M., Bonnet, D., Daubeuf, F., Lecat, S., Hibert, M., Haiech, J., & Frossard, N. (2010). Neutralizing endogenous chemokines with small molecules : Principles and potential therapeutic applications. *Pharmacology & Therapeutics*, *126*(1), 39-55. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.12.003

Gao, L., Wang, W.-Z., Wang, W., & Zucker, I. H. (2008). Imbalance of angiotensin type 1 receptor and angiotensin II type 2 receptor in the rostral ventrolateral medulla : Potential mechanism for sympathetic overactivity in heart failure. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *52*(4), 708-714. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.116228

Garg, U. C., & Hassid, A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*, *83*(5), 1774-1777.

Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium*, *27*(2), 97-106. https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0095

Gicquiaux, H., Lecat, S., Gaire, M., Dieterlen, A., Mély, Y., Takeda, K., Bucher, B., & Galzi, J.-L. (2002). Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide Y Y(1) receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(8), 6645-6655. https://doi.org/10.1074/jbc.M107224200

Gironacci, M. M., Vicario, A., Cerezo, G., & Silva, M. G. (2018). The depressor axis of the renin–angiotensin system and brain disorders : A translational approach. *Clinical Science*, *132*(10), 1021-1038. https://doi.org/10.1042/CS20180189

Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R. F., & Summerville, W. W. (1934). STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION. *The Journal of Experimental Medicine*, *59*(3), 347-379.

Grobe, J. L., Mecca, A. P., Lingis, M., Shenoy, V., Bolton, T. A., Machado, J. M., Speth, R. C., Raizada, M. K., & Katovich, M. J. (2007). Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *292*(2), H736-742. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00937.2006

Grundmann, M., Merten, N., Malfacini, D., Inoue, A., Preis, P., Simon, K., Rüttiger, N., Ziegler, N., Benkel, T., Schmitt, N. K., Ishida, S., Müller, I., Reher, R., Kawakami, K., Inoue, A., Rick, U., Kühl, T., Imhof, D., Aoki, J., … Kostenis, E. (2018). Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nature Communications*, *9*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02661-3

Gryglewski, R. J., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, *320*(6061), 454-456. https://doi.org/10.1038/320454a0

Guilluy, C., Bregeon, J., Toumaniantz, G., Rolli-Derkinderen, M., Retailleau, K., Loufrani, L., Henrion, D., Scalbert, E., Bril, A., Torres, R., Offermanns, S., Pacaud, P., & Loirand, G. (2010). The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nature medicine*, *16*, 183-190. https://doi.org/10.1038/nm.2079

Guo, D.-F., Chenier, I., Lavoie, J. L., Chan, J. S. D., Hamet, P., Tremblay, J., Chen, X. M., Wang, D. H., & Inagami, T. (2006). Development of hypertension and kidney hypertrophy in transgenic mice overexpressing ARAP1 gene in the kidney. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *48*(3), 453-459. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000230664.32874.52

Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2013). Structural determinants of arrestin functions. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *118*, 57-92. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394440-5.00003-6

Habiyakare, B., Alsaadon, H., Mathai, M. L., Hayes, A., & Zulli, A. (2014). Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis : Differential effects of alamandine and Ang(1-7). *International Journal of Experimental Pathology*, *95*(4), 290-295. https://doi.org/10.1111/iep.12087

Hansen, J. L., Servant, G., Baranski, T. J., Fujita, T., Iiri, T., & Sheikh, S. P. (2000). Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation. *Circulation Research*, *87*(9), 753-759. https://doi.org/10.1161/01.res.87.9.753

Hansson, L., Lindholm, L. H., Niskanen, L., Lanke, J., Hedner, T., Niklason, A., Luomanmäki, K., Dahlöf, B., de Faire, U., Mörlin, C., Karlberg, B. E., Wester, P. O., & Björck, J. E. (1999). Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension : The Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet (London, England)*, *353*(9153), 611-616. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)05012-0

Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery : New agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(12), Article 12. https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178

He, R., Browning, D. D., & Ye, R. D. (2001). Differential roles of the NPXXY motif in formyl peptide receptor signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *166*(6), 4099-4105. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.4099

Heerding, J. N., Hines, J., Fluharty, S. J., & Yee, D. K. (2001). Identification and function of disulfide bridges in the extracellular domains of the angiotensin II type 2 receptor. *Biochemistry*, *40*(28), 8369-8377. https://doi.org/10.1021/bi002805p

Heikal, L., Martin, G. P., & Dailey, L. A. (2009). Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues : S-Nitrosophytochelatins. *Nitric Oxide*, *20*(3), 157-165. https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.11.001

Hilger, D., Masureel, M., & Kobilka, B. K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature structural & molecular biology*, *25*(1), 4-12. https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7

Hinder, F., Stubbe, H. D., Van Aken, H., Waurick, R., Booke, M., & Meyer, J. (1999). Role of nitric oxide in sepsis-associated pulmonary edema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *159*(1), 252-257. https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.1.9806024

Holloway, A. C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S., Southwell, B. R., Lew, M. J., & Thomas, W. G. (2002). Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Molecular Pharmacology*, *61*(4), 768-777. https://doi.org/10.1124/mol.61.4.768

Hornslien, A. G., Sandset, E. C., Wyller, T. B., Berge, E., & Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial (SCAST) Study Group. (2015). Effects of candesartan in acute stroke on activities of daily living and level of care at 6 months. *Journal of Hypertension*, *33*(7), 1487-1491. https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000581

Hosomi, N., Nishiyama, A., Ban, C. R., Naya, T., Takahashi, T., Kohno, M., & Koziol, J. A. (2005). Angiotensin type 1 receptor blockage improves ischemic injury following transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, *134*(1), 225-231. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.054

Hunyady, L., Baukal, A. J., Balla, T., & Catt, K. J. (1994). Independence of type I angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(40), 24798-24804.

Hunyady, L., Bor, M., Baukal, A. J., Balla, T., & Catt, K. J. (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. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(28), 16602-16609. https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16602

Hunyady, L., & Catt, K. J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *20*(5), 953-970. https://doi.org/10.1210/me.2004-0536

Hutchings, C. J., Koglin, M., & Marshall, F. H. (2010). Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *mAbs*, *2*(6), 594-606. https://doi.org/10.4161/mabs.2.6.13420

Ichiki, T., Herold, C. L., Kambayashi, Y., Bardhan, S., & Inagami, T. (1994). Cloning of the cDNA and the genomic DNA of the mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1189*(2), 247-250. https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90072-8

Inagami, T. (1999). Molecular biology and signaling of angiotensin receptors : An overview. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *10 Suppl 11*, S2-7.

Inci, S., & Spetzler, R. F. (2000). Intracranial aneurysms and arterial hypertension : A review and hypothesis. *Surgical Neurology*, *53*(6), 530-540; discussion 540-542. https://doi.org/10.1016/s0090-3019(00)00244-5

Inuzuka, T., Fujioka, Y., Tsuda, M., Fujioka, M., Satoh, A. O., Horiuchi, K., Nishide, S., Nanbo, A., Tanaka, S., & Ohba, Y. (2016). Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. *Scientific Reports*, *6*, 21613. https://doi.org/10.1038/srep21613

Ishida, M., Marrero, M. B., Schieffer, B., Ishida, T., Bernstein, K. E., & Berk, B. C. (1995). Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, *77*(6), 1053-1059. https://doi.org/10.1161/01.res.77.6.1053

Ito, T., Yamakawa, H., Bregonzio, C., Terrón, J. A., Falcón-Neri, A., & Saavedra, J. M. (2002). Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke*, *33*(9), 2297-2303. https://doi.org/10.1161/01.str.0000027274.03779.f3

Iwai, M., Chen, R., Li, Z., Shiuchi, T., Suzuki, J., Ide, A., Tsuda, M., Okumura, M., Min, L.-J., Mogi, M., & Horiuchi, M. (2005). Deletion of Angiotensin II Type 2 Receptor Exaggerated Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Null Mice. *Circulation*, *112*(11), 1636-1643. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.525550

Iwai, N., & Inagami, T. (1992). Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Letters*, *298*(2-3), 257-260. https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80071-n

Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., & Seuwen, K. (2006). The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*, *1*(8), 761-782. https://doi.org/10.1002/cmdc.200600134

Jaffe, I. Z., & Mendelsohn, M. E. (2005). Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocortocoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation Research*, *96*(6), 643-650. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000159937.05502.d1

Jang, J. H., Chun, J. N., Godo, S., Wu, G., Shimokawa, H., Jin, C. Z., Jeon, J. H., Kim, S. J., Jin, Z. H., & Zhang, Y. H. (2015). ROS and endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-dependent trafficking of angiotensin II type 2 receptor begets neuronal NOS in cardiac myocytes. *Basic Research in Cardiology*, *110*(3), 21. https://doi.org/10.1007/s00395-015-0477-6

Jankowski, V., Vanholder, R., van der Giet, M., Tölle, M., Karadogan, S., Gobom, J., Furkert, J., Oksche, A., Krause, E., Tran, T. N. A., Tepel, M., Schuchardt, M., Schlüter, H., Wiedon, A., Beyermann, M., Bader, M., Todiras, M., Zidek, W., & Jankowski, J. (2007). Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(2), 297-302. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000253889.09765.5f

Jarvis, S. (2012). Angiotensin receptor blockers in clinical practice—Implications of the ONTARGET study. *The Journal of International Medical Research*, *40*(1), 10-17. https://doi.org/10.1177/147323001204000102

Jesus, I. C. G. de, Scalzo, S., Alves, F., Marques, K., Rocha-Resende, C., Bader, M., Santos, R. A. S., & Guatimosim, S. (2018). Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against ANG II hypertrophy in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *314*(6), C702-C711. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00153.2017

Jiang, T., Gao, L., Guo, J., Lu, J., Wang, Y., & Zhang, Y. (2012). Suppressing inflammation by inhibiting the NF-κB pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, *167*(7), 1520-1532. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02105.x

Jiang, T., Yu, J.-T., Zhu, X.-C., Zhang, Q.-Q., Tan, M.-S., Cao, L., Wang, H.-F., Lu, J., Gao, Q., Zhang, Y.-D., & Tan, L. (2014). Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. *British Journal of Pharmacology*, *171*(18), 4222-4232. https://doi.org/10.1111/bph.12770

Johnstone, E. K. M., Ayoub, M. A., Hertzman, R. J., See, H. B., Abhayawardana, R. S., Seeber, R. M., & Pfleger, K. D. G. (2022). Novel Pharmacology Following Heteromerization of the Angiotensin II Type 2 Receptor and the Bradykinin Type 2 Receptor. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 848816. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.848816

Johnstone, E. K. M., & Pfleger, K. D. G. (2021). Profiling novel pharmacology of receptor complexes using Receptor-HIT. *Biochemical Society Transactions*, *49*(4), 1555-1565. https://doi.org/10.1042/BST20201110

Johnstone, E. K. M., See, H. B., Abhayawardana, R. S., Song, A., Rosengren, K. J., Hill, S. J., & Pfleger, K. D. G. (2021). Investigation of Receptor Heteromers Using NanoBRET Ligand Binding. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/ijms22031082

Jones-Tabah, J., Clarke, P. B., & Hébert, T. E. (2017). Measuring G protein-coupled receptor signalling in the brain with resonance energy transfer based biosensors. *Current Opinion in Pharmacology*, *32*, 44-48. https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.10.008

Joseph, J. P., Mecca, A. P., Regenhardt, R. W., Bennion, D. M., Rodríguez, V., Desland, F., Patel, N. A., Pioquinto, D. J., Unger, T., Katovich, M. J., Steckelings, U. M., & Sumners, C. (2014). The angiotensin type 2 receptor agonist Compound 21 elicits cerebroprotection in endothelin-1 induced ischemic stroke. *Neuropharmacology*, *81*, 134-141. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.044

Jusufovic, M., Sandset, E. C., Bath, P. M., Berge, E., & Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial (SCAST) Study Group. (2016). Early blood pressure lowering treatment in acute stroke. Ordinal analysis of vascular events in the Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial (SCAST). *Journal of Hypertension*, *34*(8), 1594-1598. https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000980

Jusufovic, M., Sandset, E. C., Bath, P. M. W., Karlson, B. W., Berge, E., & Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial Study Group. (2015). Effects of blood pressure lowering in patients with acute ischemic stroke and carotid artery stenosis. *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, *10*(3), 354-359. https://doi.org/10.1111/ijs.12418

Kader, A., Frazzini, V. I., Solomon, R. A., & Trifiletti, R. R. (1993). Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, *24*(11), 1709-1716. https://doi.org/10.1161/01.STR.24.11.1709

Kagiyama, T., Kagiyama, S., & Phillips, M. (2003). Expression of angiotensin type 1 and 2 receptors in brain after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Regulatory Peptides*, *110*(3), 241-247. https://doi.org/10.1016/s0167-0115(02)00223-9

Kalra, J., Prakash, A., Kumar, P., & Majeed, A. B. A. (2015). Cerebroprotective effects of RAS inhibitors : Beyond their cardio-renal actions. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS*, *16*(3), 459-468. https://doi.org/10.1177/1470320315583582

Kangussu, L. M., Marzano, L. A. S., Souza, C. F., Dantas, C. C., Miranda, A. S., & Simões E Silva, A. C. (2020). The Renin-Angiotensin System and the Cerebrovascular Diseases : Experimental and Clinical Evidence. *Protein and Peptide Letters*, *27*(6), 463-475. https://doi.org/10.2174/0929866527666191218091823

Kanki, H., Sasaki, T., Matsumura, S., Yokawa, S., Yukami, T., Shimamura, M., Sakaguchi, M., Furuno, T., Suzuki, T., & Mochizuki, H. (2019). β-arrestin-2 in PAR-1-biased signaling has a crucial role in endothelial function via PDGF-β in stroke. *Cell Death & Disease*, *10*(2), Article 2. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1375-x

Kaposzta, Z., Baskerville, P. A., Madge, D., Fraser, S., Martin, J. F., & Markus, H. S. (2001). L-arginine and S-nitrosoglutathione reduce embolization in humans. *Circulation*, *103*(19), 2371-2375. https://doi.org/10.1161/01.cir.103.19.2371

Karnik, S., Unal, H., Kemp, J., Tirupula, K., Eguchi, S., Vanderheyden, P., & Thomas, W. (2015). Angiotensin Receptors : Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacological reviews*, *67*, 754-819. https://doi.org/10.1124/pr.114.010454

Kaschina, E., & Unger, T. (2003). Angiotensin AT1/AT2 receptors : Regulation, signalling and function. *Blood Pressure*, *12*(2), 70-88. https://doi.org/10.1080/08037050310001057

Katada, T., Oinuma, M., & Ui, M. (1986). Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(11), 5215-5221. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)89236-0

Kawai, T., Forrester, S. J., O'Brien, S. L., Baggett, A., Rizzo, V., & Eguchi, S. (2017, 005). *AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system*. Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.008

Kazama, K., Anrather, J., Zhou, P., Girouard, H., Frys, K., Milner, T. A., & Iadecola, C. (2004). Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals. *Circulation Research*, *95*(10), 1019-1026. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000148637.85595.c5

Kehoe, A. D., Eleftheriou, K. I., Heron, M., Coats, T. J., & Montgomery, H. E. (2008). Angiotensin-converting enzyme genotype may predict survival following major trauma. *Emergency Medicine Journal: EMJ*, *25*(11), 759-761. https://doi.org/10.1136/emj.2006.045336

Kelm, M., & Schrader, J. (1990). Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circulation Research*, *66*(6), 1561-1575. https://doi.org/10.1161/01.res.66.6.1561

Kendall, R. T., Lee, M.-H., Pleasant, D. L., Robinson, K., Kuppuswamy, D., McDermott, P. J., & Luttrell, L. M. (2014). Arrestin-dependent Angiotensin AT1 Receptor Signaling Regulates Akt and mTor-mediated Protein Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(38), 26155-26166. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.595728

Khan, M., Dhammu, T. S., Sakakima, H., Shunmugavel, A., Gilg, A. G., Singh, A. K., & Singh, I. (2012). The inhibitory effect of S-nitrosoglutathione on blood–brain barrier disruption and peroxynitrite formation in a rat model of experimental stroke. *Journal of Neurochemistry*, *123*(s2), 86-97. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07947.x

Khan, M., Jatana, M., Elango, C., Paintlia, A. S., Singh, A. K., & Singh, I. (2006). Cerebrovascular protection by various nitric oxide donors in rats after experimental stroke. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, *15*(2), 114-124. https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.01.008

Khan, M., Sekhon, B., Giri, S., Jatana, M., Gilg, A. G., Ayasolla, K., Elango, C., Singh, A. K., & Singh, I. (2005). S-Nitrosoglutathione Reduces Inflammation and Protects Brain against Focal Cerebral Ischemia in a Rat Model of Experimental Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *25*(2), 177-192. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600012

Khan, S. M., Sleno, R., Gora, S., Zylbergold, P., Laverdure, J.-P., Labbé, J.-C., Miller, G. J., & Hébert, T. E. (2013). The expanding roles of Gβγ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacological Reviews*, *65*(2), 545-577. https://doi.org/10.1124/pr.111.005603

Khelashvili, G., Dorff, K., Shan, J., Camacho-Artacho, M., Skrabanek, L., Vroling, B., Bouvier, M., Devi, L. A., George, S. R., Javitch, J. A., Lohse, M. J., Milligan, G., Neubig, R. R., Palczewski, K., Parmentier, M., Pin, J.-P., Vriend, G., Campagne, F., & Filizola, M. (2010). GPCR-OKB : The G Protein Coupled Receptor Oligomer Knowledge Base. *Bioinformatics*, *26*(14), 1804-1805. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq264

Kim, C. K., Yang, X.-L., Kim, Y.-J., Choi, I.-Y., Jeong, H.-G., Park, H.-K., Kim, D., Kim, T. J., Jang, H., Ko, S.-B., & Yoon, B.-W. (2015). Effect of Long-Term Treatment with Fimasartan on Transient Focal Ischemia in Rat Brain. *BioMed Research International*, *2015*, e295925. https://doi.org/10.1155/2015/295925

Kim, K.-S., Abraham, D., Williams, B., Violin, J. D., Mao, L., & Rockman, H. A. (2012). β-Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *303*(8), H1001-H1010. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00475.2012

Kjeldsen, S. E., Lyle, P. A., Kizer, J. R., Dahlöf, B., Devereux, R. B., Julius, S., Beevers, G., de Faire, U., Fyhrquist, F., Ibsen, H., Kristianson, K., Lederballe-Pedersen, O., Lindholm, L. H., Nieminen, M. S., Omvik, P., Oparil, S., Snapinn, S. M., Harris, K. E., Wedel, H., & LIFE Study Group. (2005). The effects of losartan compared to atenolol on stroke in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy. The LIFE study. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, *7*(3), 152-158. https://doi.org/10.1111/j.1524-6175.2005.04254.x

Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-Ferrer, C. F., Heringer-Walther, S., Sexton, P. M., Gembardt, F., Kellett, E., Martini, L., Vanderheyden, P., Schultheiss, H.-P., & Walther, T. (2005). G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*, *111*(14), 1806-1813. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000160867.23556.7D

Kovtun, O., Tillu, V. A., Ariotti, N., Parton, R. G., & Collins, B. M. (2015). Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *Journal of Cell Science*, *128*(7), 1269-1278. https://doi.org/10.1242/jcs.167866

Krikov, M., Thone-Reineke, C., Müller, S., Villringer, A., & Unger, T. (2008). Candesartan but not ramipril pretreatment improves outcome after stroke and stimulates neurotrophin BNDF/TrkB system in rats. *Journal of Hypertension*, *26*(3), 544-552. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282f2dac9

Kuravi, S., Lan, T.-H., Barik, A., & Lambert, N. A. (2010). Third-Party Bioluminescence Resonance Energy Transfer Indicates Constitutive Association of Membrane Proteins : Application to Class A G-Protein-Coupled Receptors and G-Proteins. *Biophysical Journal*, *98*(10), 2391-2399. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.004

Labandeira-Garcia, J. L., Rodríguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Rodriguez-Pallares, J., Lanciego, J. L., & Guerra, M. J. (2017). Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization : Implications for Aging and Neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*, 129. https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00129

Lanctot, P. M., Leclerc, P. C., Clément, M., Auger-Messier, M., Escher, E., Leduc, R., & Guillemette, G. (2005). Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *The Biochemical Journal*, *390*(Pt 1), 367-376. https://doi.org/10.1042/BJ20050189

Lanctôt, P. M., Leclerc, P. C., Escher, E., Leduc, R., & Guillemette, G. (1999). Role of N-Glycosylation in the Expression and Functional Properties of Human AT1 Receptor. *Biochemistry*, *38*(27), 8621-8627. https://doi.org/10.1021/bi9830516

Langford, E. J., Brown, A. S., Wainwright, R. J., de Belder, A. J., Thomas, M. R., Smith, R. E., Radomski, M. W., Martin, J. F., & Moncada, S. (1994). Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet (London, England)*, *344*(8935), 1458-1460. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)90287-9

Laporte, S. A., Servant, G., Richard, D. E., Escher, E., Guillemette, G., & Leduc, R. (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. *Molecular Pharmacology*, *49*(1), 89-95.

Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., Soares, E., Barbosa, C., Kjeldsen, F., Oliveira, A., Braga, J., Savergnini, S., Maia, G., Peluso, A. B., Passos-Silva, D., … Santos, R. A. S. (2013). Discovery and characterization of alamandine : A novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation Research*, *112*(8), 1104-1111. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301077

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. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(44), 42034-42048. https://doi.org/10.1074/jbc.M203606200

Leclerc, P. C., Lanctot, P. M., Auger-Messier, M., Escher, E., Leduc, R., & Guillemette, G. (2006). S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *British Journal of Pharmacology*, *148*(3), 306-313. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706725

Lee, S., Brait, V. H., Arumugam, T. V., Evans, M. A., Kim, H. A., Widdop, R. E., Drummond, G. R., Sobey, C. G., & Jones, E. S. (2012). Neuroprotective effect of an angiotensin receptor type 2 agonist following cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, *4*, 16. https://doi.org/10.1186/2040-7378-4-16

Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science (New York, N.Y.)*, *308*(5721), 512-517. https://doi.org/10.1126/science.1109237

Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P., & Llorens-Cortes, C. (1996). Distribution of angiotensin II type-2 receptor (AT2) mRNA expression in the adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, *373*(3), 322-339. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960923)373:3<322::AID-CNE2>3.0.CO;2-4

Leonhardt, J., Villela, D. C., Teichmann, A., Münter, L.-M., Mayer, M. C., Mardahl, M., Kirsch, S., Namsolleck, P., Lucht, K., Benz, V., Alenina, N., Daniell, N., Horiuchi, M., Iwai, M., Multhaup, G., Schülein, R., Bader, M., Santos, R. A., Unger, T., & Steckelings, U. M. (2017). Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *69*(6), 1128-1135. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08814

Li, A., Liu, S., Huang, R., Ahn, S., & Lefkowitz, R. J. (2023). Loss of biased signaling at a G proteincoupled receptor in overexpressed systems. *PLOS ONE*, *18*(3), e0283477. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283477

Li, J., Zhao, X., Li, X., Lerea, K. M., & Olson, S. C. (2007). Angiotensin II type 2 receptor-dependent increases in nitric oxide synthase expression in the pulmonary endothelium is mediated via a G alpha i3/Ras/Raf/MAPK pathway. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *292*(6), C2185-2196. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00204.2006

Li, J.-M., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L.-J., Tsukuda, K., Sakata, A., Fujita, T., Iwai, M., & Horiuchi, M. (2008). Temporary pretreatment with the angiotensin II type 1 receptor blocker, valsartan, prevents ischemic brain damage through an increase in capillary density. *Stroke*, *39*(7), 2029-2036. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.503458

Li, P., Chen, X.-R., Xu, F., Liu, C., Li, C., Liu, H., Wang, H., Sun, W., Sheng, Y.-H., & Kong, X.-Q. (2018). Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways. *Life Sciences*, *206*, 106-116. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.010

Li, Z., Iwai, M., Wu, L., Shiuchi, T., Jinno, T., Cui, T.-X., & Horiuchi, M. (2003). Role of AT2 receptor in the brain in regulation of blood pressure and water intake. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *284*(1), H116-121. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00515.2002

Lithell, H., Hansson, L., Skoog, I., Elmfeldt, D., Hofman, A., Olofsson, B., Trenkwalder, P., Zanchetti, A., & SCOPE Study Group. (2003). The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE) : Principal results of a randomized double-blind intervention trial. *Journal of Hypertension*, *21*(5), 875-886. https://doi.org/10.1097/00004872-200305000-00011

Liu, C., Yang, C.-X., Chen, X.-R., Liu, B.-X., Li, Y., Wang, X.-Z., Sun, W., Li, P., & Kong, X.-Q. (2018). Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Amino Acids*, *50*(8), 1071-1081. https://doi.org/10.1007/s00726-018-2583-x

Liu, H., Kitazato, K. T., Uno, M., Yagi, K., Kanematsu, Y., Tamura, T., Tada, Y., Kinouchi, T., & Nagahiro, S. (2008). Protective mechanisms of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan against cerebral ischemia : In-vivo and in-vitro studies. *Journal of Hypertension*, *26*(7), 1435-1445. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3283013b6e

Lopez-Ilasaca, M., Liu, X., Tamura, K., & Dzau, V. J. (2003). The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(12), 5038-5050. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0383

Loscalzo, J., & Welch, G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *38*(2), 87-104. https://doi.org/10.1016/S0033-0620(05)80001-5

Lou, M., Blume, A., Zhao, Y., Gohlke, P., Deuschl, G., Herdegen, T., & Culman, J. (2004). Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *24*(5), 536-547. https://doi.org/10.1097/00004647-200405000-00008

Lu, D., & Kassab, G. S. (2011). Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *Journal of the Royal Society, Interface*, *8*(63), 1379-1385. https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0177

Luan, B., Zhao, J., Wu, H., Duan, B., Shu, G., Wang, X., Li, D., Jia, W., Kang, J., & Pei, G. (2009). Deficiency of a β-arrestin-2 signal complex contributes to insulin resistance. *Nature*, *457*(7233), Article 7233. https://doi.org/10.1038/nature07617

Lukeš, T., Glatzová, D., Kvíčalová, Z., Levet, F., Benda, A., Letschert, S., Sauer, M., Brdička, T., Lasser, T., & Cebecauer, M. (2017). Quantifying protein densities on cell membranes using super-resolution optical fluctuation imaging. *Nature Communications*, *8*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01857-x

Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science (New York, N.Y.)*, *283*(5402), 655-661. https://doi.org/10.1126/science.283.5402.655

Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2002). The role of β-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Science, 115*(3), 455-465.

Luttrell, L. M., Wang, J., Plouffe, B., Smith, J. S., Yamani, L., Kaur, S., Jean-Charles, P.-Y., Gauthier, C., Lee, M.-H., Pani, B., Kim, J., Ahn, S., Rajagopal, S., Reiter, E., Bouvier, M., Shenoy, S. K., Laporte, S. A., Rockman, H. A., & Lefkowitz, R. J. (2018). Manifold roles of β-arrestins in GPCR signaling elucidated with siRNA and CRISPR/Cas9. *Science Signaling*, *11*(549). https://doi.org/10.1126/scisignal.aat7650

Lymperopoulos, A., Wertz, S. L., Pollard, C. M., Desimine, V. L., Maning, J., & McCrink, K. A. (2019). Not all arrestins are created equal : Therapeutic implications of the functional diversity of the β-arrestins in the heart. *World Journal of Cardiology, 11*(2), 47-56. https://doi.org/10.4330/wjc.v11.i2.47

Lyngsø, C., Erikstrup, N., & Hansen, J. L. (2009). Functional interactions between 7TM receptors in the renin-angiotensin system—Dimerization or crosstalk? *Molecular and Cellular Endocrinology, 302*(2), 203-212. https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.09.018

Malinski, T., Bailey, F., Zhang, Z. G., & Chopp, M. (1993). Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 13*(3), 355-358. https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.48

Marks, D. S., Vita, J. A., Folts, J. D., Keaney, J. F., Welch, G. N., & Loscalzo, J. (1995). Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *The Journal of Clinical Investigation, 96*(6), 2630-2638. https://doi.org/10.1172/JCI118328

Marui, N., Offermann, M. K., Swerlick, R., Kunsch, C., Rosen, C. A., Ahmad, M., Alexander, R. W., & Medford, R. M. (1993). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation, 92*(4), 1866-1874.

Matavelli, L. C., & Siragy, H. M. (2015). AT2 RECEPTOR ACTIVITIES AND PATHOPHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS. *Journal of cardiovascular pharmacology, 65*(3), 226-232. https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000208

Mateos, L., Perez-Alvarez, M. J., & Wandosell, F. (2016). Angiotensin II type-2 receptor stimulation induces neuronal VEGF synthesis after cerebral ischemia. *Biochimica Et Biophysica Acta, 1862*(7), 1297-1308. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.03.013

Mathews, W. R., & Kerr, S. W. (1993). Biological activity of S-nitrosothiols : The role of nitric oxide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *267*(3), 1529-1537.

Maujean, T., Marchand, P., Wagner, P., Riché, S., Boisson, F., Girard, N., Karpenko, J., Bonnet, D., & Gulea, M. (2023a). Catalyst-free thia-Diels-Alder click reaction for the labeling of peptides for imaging applications. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, *198*(6), 532-535. https://doi.org/10.1080/10426507.2023.2165659

Maujean, T., Wagner, P., Valencia, C., Riché, S., Iturrioz, X., Villa, P., Girard, N., Karpenko, J., Gulea, M., & Bonnet, D. (2023b). Rapid and Highly Selective Fluorescent Labeling of Peptides via a Thia-Diels-Alder Cycloaddition : Application to Apelin. *Bioconjugate Chemistry*, *34*(1), 162-168. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00500

McCarthy, C. A., Vinh, A., Broughton, B. R. S., Sobey, C. G., Callaway, J. K., & Widdop, R. E. (2012). Angiotensin II type 2 receptor stimulation initiated after stroke causes neuroprotection in conscious rats. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *60*(6), 1531-1537. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.199646

McCarthy, C. A., Vinh, A., Callaway, J. K., & Widdop, R. E. (2009). Angiotensin AT2 receptor stimulation causes neuroprotection in a conscious rat model of stroke. *Stroke*, *40*(4), 1482-1489. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531509

McCarthy, C. A., Vinh, A., Miller, A. A., Hallberg, A., Alterman, M., Callaway, J. K., & Widdop, R. E. (2014). Direct angiotensin AT2 receptor stimulation using a novel AT2 receptor agonist, compound 21, evokes neuroprotection in conscious hypertensive rats. *PloS One*, *9*(4), e95762. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095762

McCrink, K. A., Maning, J., Vu, A., Jafferjee, M., Marrero, C., Brill, A., Bathgate-Siryk, A., Dabul, S., Koch, W. J., & Lymperopoulos, A. (2017). β-Arrestin2 Improves Post–Myocardial Infarction Heart Failure via Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca2+-ATPase–Dependent Positive Inotropy in Cardiomyocytes. *Hypertension*, *70*(5), 972-981. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09817

McDonald, N. A., Henstridge, C. M., Connolly, C. N., & Irving, A. J. (2007). An essential role for constitutive endocytosis, but not activity, in the axonal targeting of the CB1 cannabinoid receptor. *Molecular Pharmacology*, *71*(4), 976-984. https://doi.org/10.1124/mol.106.029348

McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(8), 517-534. https://doi.org/10.1038/nrm3151

Mecca, A. P., O'Connor, T. E., Katovich, M. J., & Sumners, C. (2009). Candesartan pretreatment is cerebroprotective in a rat model of endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion. *Experimental Physiology*, *94*(8), 937-946. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.047936

Mecca, A. P., Regenhardt, R. W., O'Connor, T. E., Joseph, J. P., Raizada, M. K., Katovich, M. J., & Sumners, C. (2011). Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Experimental Physiology*, *96*(10), 1084-1096. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.058578

Mehta, P. K., & Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling : Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *292*(1), C82-C97. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00287.2006

Meyer, B. H., Martinez, K. L., Segura, J.-M., Pascoal, P., Hovius, R., George, N., Johnsson, K., & Vogel, H. (2006a). Covalent labeling of cell-surface proteins for in-vivo FRET studies. *FEBS Letters*, *580*(6), 1654-1658. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.007

Meyer, B. H., Segura, J.-M., Martinez, K. L., Hovius, R., George, N., Johnsson, K., & Vogel, H. (2006b). FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(7), 2138-2143. https://doi.org/10.1073/pnas.0507686103

Meyer, M., Foulquier, S., Dupuis, F., Flament, S., Grimaud, L., Henrion, D., Lartaud, I., Monard, G., Grillier-Vuissoz, I., & Boisbrun, M. (2018). Synthesis and evaluation of new designed multiple ligands directed towards both peroxisome proliferator-activated receptor-γ and angiotensin II type 1 receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *158*, 334-352. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.082

Miller, C. C., Carter, A. T., Brooks, J. I., Lovell-Badge, R. H., & Brammar, W. J. (1989). Differential extra-renal expression of the mouse renin genes. *Nucleic Acids Research*, *17*(8), 3117-3128. https://doi.org/10.1093/nar/17.8.3117

Miller, M. R., Megson, I. L., Roseberry, M. J., Mazzei, F. A., Butler, A. R., & Webb, D. J. (2000). Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryl trinitrate-tolerant rat femoral arteries. *European Journal of Pharmacology*, *403*(1-2), 111-119. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00572-0

Min, L.-J., Mogi, M., Tsukuda, K., Jing, F., Ohshima, K., Nakaoka, H., Kan-No, H., Wang, X.-L., Chisaka, T., Bai, H.-Y., Iwanami, J., & Horiuchi, M. (2014). Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor initiated after stroke ameliorates ischemic brain damage. *American Journal of Hypertension*, *27*(8), 1036-1044. https://doi.org/10.1093/ajh/hpu015

Miura, S., Karnik, S. S., & Saku, K. (2005). Constitutively Active Homo-oligomeric Angiotensin II Type 2 Receptor Induces Cell Signaling Independent of Receptor Conformation and Ligand Stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(18), 18237-18244. https://doi.org/10.1074/jbc.M500639200

Miura, S., Matsuo, Y., Kiya, Y., Karnik, S. S., & Saku, K. (2010). Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT1 and AT2 receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *391*(1), 85-90. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.008

Miura, S., Zhang, J., Boros, J., & Karnik, S. S. (2003). TM2-TM7 Interaction in Coupling Movement of Transmembrane Helices to Activation of the Angiotensin II Type-1 Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(6), 3720-3725. https://doi.org/10.1074/jbc.M211338200

Miyagi, H., Asada, H., Suzuki, M., Takahashi, Y., Yasunaga, M., Suno, C., Iwata, S., & Saito, J. (2020). The discovery of a new antibody for BRIL-fused GPCR structure determination. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68355-x

Mogi, M., Iwai, M., & Horiuchi, M. (2007). Emerging concepts of regulation of angiotensin II receptors : New players and targets for traditional receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(12), 2532-2539. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.144154

Monasky, M. M., Taglieri, D. M., Henze, M., Warren, C. M., Utter, M. S., Soergel, D. G., Violin, J. D., & Solaro, R. J. (2013). The β-arrestin-biased ligand TRV120023 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy while preserving enhanced myofilament response to calcium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *305*(6), H856-H866. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00327.2013

Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E., & Dzau, V. J. (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(33), 24539-24542.

Mullens, W., Abrahams, Z., Francis, G. S., Skouri, H. N., Starling, R. C., Young, J. B., Taylor, D. O., & Tang, W. H. W. (2008). Sodium nitroprusside for advanced low-output heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, *52*(3), 200-207. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.02.083

Murase, S., Sakitani, N., Maekawa, T., Yoshino, D., Konno, A., Hirai, H., Saito, T., Tanaka, S., Shinohara, K., Kishi, T., Shinohara, M., & Sawada, Y. (2020). Mechanical impact on the head has an antihypertensive effect. *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2020.09.21.305706

Murphy, K. T., Hossain, M. I., Swiderski, K., Chee, A., Naim, T., Trieu, J., Haynes, V., Read, S. J., Stapleton, D. I., Judge, S. M., Trevino, J. G., Judge, A. R., & Lynch, G. S. (2019). Mas Receptor

Activation Slows Tumor Growth and Attenuates Muscle Wasting in Cancer. *Cancer Research*, *79*(4), 706-719. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1207

Nakagawa, M., Orii, H., Yoshida, N., Jojima, E., Horie, T., Yoshida, R., Haga, T., & Tsuda, M. (2002). Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate. *European Journal of Biochemistry*, *269*(21), 5112-5118. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03240.x

Nakamura, T., Tsutsumi, Y., Shimizu, Y., & Uchiyama, S. (2010). Renin-angiotensin system blockade safely reduces blood pressure in patients with minor ischemic stroke during the acute phase. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association*, *19*(6), 435-440. https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2009.08.006

Näveri, L., Strömberg, C., & Saavedra, J. M. (1994). Angiotensin II AT1 receptor mediated contraction of the perfused rat cerebral artery. *Neuroreport*, *5*(17), 2278-2280. https://doi.org/10.1097/00001756-199411000-00018

Nishimura, Y., Ito, T., & Saavedra, J. M. (2000). Angiotensin II AT(1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, *31*(10), 2478-2486. https://doi.org/10.1161/01.str.31.10.2478

Noor, N., Patel, C. B., & Rockman, H. A. (2011). β-arrestin : A signaling molecule and potential therapeutic target for heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *51*(4), 534-541. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.11.005

Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., & Barak, L. S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(22), 17201-17210. https://doi.org/10.1074/jbc.M910348199

Obermeier, F., Gross, V., Schölmerich, J., & Falk, W. (1999). Interleukin-1 production by mouse macrophages is regulated in a feedback fashion by nitric oxide. *Journal of Leukocyte Biology*, *66*(5), 829-836. https://doi.org/10.1002/jlb.66.5.829

Oh, M. S., Yu, K.-H., Hong, K.-S., Kang, D.-W., Park, J.-M., Bae, H.-J., Koo, J., Lee, J., Lee, B.-C., & Valsartan Efficacy oN modesT blood pressUre REduction in acute ischemic stroke (VENTURE) study group. (2015). Modest blood pressure reduction with valsartan in acute ischemic stroke : A prospective, randomized, open-label, blinded-end-point trial. *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, *10*(5), 745-751. https://doi.org/10.1111/ijs.12446

Ohkuma, H., Suzuki, S., Fujita, S., & Nakamura, W. (2003). Role of a Decreased Expression of the Local Renin-Angiotensin System in the Etiology of Cerebral Aneurysms. *Circulation*, *108*(7), 785-787. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000087339.31094.3C

Ohyama, K., Yamano, Y., Sano, T., Nakagomi, Y., Hamakubo, T., Morishima, I., & Inagami, T. (1995). Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA. *Regulatory Peptides*, *57*(2), 141-147. https://doi.org/10.1016/0167-0115(95)00030-f

Ohyama, K., Yamano, Y., Sano, T., Nakagomi, Y., Wada, M., & Inagami, T. (2002). Role of the conserved DRY motif on G protein activation of rat angiotensin II receptor type 1A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *292*(2), 362-367. https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6670

Omura-Matsuoka, E., Yagita, Y., Sasaki, T., Terasaki, Y., Oyama, N., Sugiyama, Y., Okazaki, S., Sakoda, S., & Kitagawa, K. (2009). Postischemic administration of angiotensin II type 1 receptor blocker reduces cerebral infarction size in hypertensive rats. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, *32*(7), 548-553. https://doi.org/10.1038/hr.2009.69

Ostermaier, M. K., Schertler, G. F. X., & Standfuss, J. (2014). Molecular mechanism of phosphorylation-dependent arrestin activation. *Current Opinion in Structural Biology*, *29*, 143-151. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.07.006

Ovchinnikov, Y., Abdulaev, N. G., & Bogachuk, A. S. (1988). Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Letters*, *230*(1-2), 1-5. https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80628-8

Ozawa, K., Whalen, E. J., Nelson, C. D., Mu, Y., Hess, D. T., Lefkowitz, R. J., & Stamler, J. S. (2008). S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Molecular Cell*, *31*(3), 395-405. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.024

Padia, S. H., & Carey, R. M. (2013). AT2 receptors : Beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *465*(1), 99-110. https://doi.org/10.1007/s00424-012-1146-3

Page, I. H. (1939). ON THE NATURE OF THE PRESSOR ACTION OF RENIN. *The Journal of Experimental Medicine*, *70*(5), 521-542.

Page, I. H., & Helmer, O. M. (1940). A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR. *The Journal of Experimental Medicine*, *71*(1), 29-42.

Palanche, T., Ilien, B., Zoffmann, S., Reck, M.-P., Bucher, B., Edelstein, S. J., & Galzi, J.-L. (2001). The Neurokinin A Receptor Activates Calcium and cAMP Responses through Distinct Conformational States *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(37), 34853-34861. https://doi.org/10.1074/jbc.M104363200

Pang, P. S., Butler, J., Collins, S. P., Cotter, G., Davison, B. A., Ezekowitz, J. A., Filippatos, G., Levy, P. D., Metra, M., Ponikowski, P., Teerlink, J. R., Voors, A. A., Bharucha, D., Goin, K., Soergel, D. G., & Felker, G. M. (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). *European Heart Journal*, *38*(30), 2364-2373. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx196

Parent, M., Boudier, A., Perrin, J., Vigneron, C., Maincent, P., Violle, N., Bisson, J.-F., Lartaud, I., & Dupuis, F. (2015). In Situ Microparticles Loaded with S-Nitrosoglutathione Protect from Stroke. *PLOS ONE*, *10*(12), e0144659. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144659

Parent, M., Dahboul, F., Schneider, R., Clarot, I., Maincent, P., Leroy, P., & Boudier, A. (2013). A Complete Physicochemical Identity Card of S-nitrosoglutathione. *Current Pharmaceutical Analysis*, *9*, 31-42. https://doi.org/10.2174/157341213804806098

Parsons, S. J., & Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, *23*(48), 7906-7909. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208160

Patel, S. N., Ali, Q., Samuel, P., Steckelings, U. M., & Hussain, T. (2017). Angiotensin II Type 2 Receptor and Receptor Mas Are Colocalized and Functionally Interdependent in Obese Zucker Rat Kidney. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *70*(4), 831-838. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09679

Peluso, A. A. B., Kempf, S. J., Verano-Braga, T., Rodrigues-Ribeiro, L., Johansen, L. E., Hansen, M. R., Kitlen, G., Haugaard, A. H., Sumners, C., Ditzel, H. J., Santos, R. A., Bader, M., Larsen, M. R., & Steckelings, U. M. (2022). Quantitative Phosphoproteomics of the Angiotensin AT2-Receptor Signaling Network Identifies HDAC1 (Histone-Deacetylase-1) and p53 as Mediators of Antiproliferation and Apoptosis. *Hypertension*, *79*(11), 2530-2541. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.18620

Peterson, Y. K., & Luttrell, L. M. (2017). The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Pharmacological Reviews*, *69*(3), 256-297. https://doi.org/10.1124/pr.116.013367

Pfeiffer, C. T., Wang, J., Paulo, J. A., Jiang, X., Gygi, S. P., & Rockman, H. A. (2021). Mapping Angiotensin II Type 1 Receptor-Biased Signaling Using Proximity Labeling and Proteomics Identifies

Diverse Actions of Biased Agonists. *Journal of Proteome Research*. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00080

Pfleger, K. D. G., & Eidne, K. A. (2006). Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nature Methods*, *3*(3), 165-174. https://doi.org/10.1038/nmeth841

Pierce, K. L., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *3*(9), 639-650. https://doi.org/10.1038/nrm908

Pinheiro, L. C., Oliveira-Paula, G. H., Ferreira, G. C., Dal-Cin de Paula, T., Duarte, D. A., Costa-Neto, C. M., & Tanus-Santos, J. E. (2021). Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II. *Redox Biology*, *38*, 101769. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101769

Pitcher, J. A., Tesmer, J. J., Freeman, J. L., Capel, W. D., Stone, W. C., & Lefkowitz, R. J. (1999). Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(49), 34531-34534. https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34531

Planes, N., Vanderheyden, P. P. M. L., Gratton, E., & Caballero-George, C. (2020). Image mean square displacement to study the lateral mobility of Angiotensin II type 1 and Endothelin 1 type A receptors on living cells. *Microscopy Research and Technique*, *83*(4), 381-392. https://doi.org/10.1002/jemt.23425

Polizio, A. H., Gironacci, M. M., Tomaro, M. L., & Peña, C. (2007). Angiotensin-(1–7) blocks the angiotensin II-stimulated superoxide production. *Pharmacological Research*, *56*(1), 86-90. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.04.004

Porrello, E. R., Pfleger, K. D. G., Seeber, R. M., Qian, H., Oro, C., Abogadie, F., Delbridge, L. M. D., & Thomas, W. G. (2011). Heteromerization of angiotensin receptors changes trafficking and arrestin recruitment profiles. *Cellular Signalling*, *23*(11), 1767-1776. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.06.011

Povsic, T. J., Kohout, T. A., & Lefkowitz, R. J. (2003). β-Arrestin1 Mediates Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Anti-apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(51), 51334-51339. https://doi.org/10.1074/jbc.M309968200

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 (London, England)*, *358*(9287), 1033-1041. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06178-5

Pueyo, M. E., Arnal, J. F., Rami, J., & Michel, J. B. (1998). Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *The American Journal of Physiology*, *274*(1), C214-220. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.1.C214

Qaradakhi, T., Apostolopoulos, V., & Zulli, A. (2016). Angiotensin (1-7) and Alamandine : Similarities and differences. *Pharmacological Research*, *111*, 820-826. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.025

Qu, X., Wang, D., & Wu, B. (2020). Progress in GPCR structure determination. In *GPCRs* (p. 3-22). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816228-6.00001-5

Rajagopal, K., Whalen, E. J., Violin, J. D., Stiber, J. A., Rosenberg, P. B., Premont, R. T., Coffman, T. M., Rockman, H. A., & Lefkowitz, R. J. (2006). β-Arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(44), 16284-16289. https://doi.org/10.1073/pnas.0607583103

Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N. P., Gerard, C., & Lefkowitz, R. J. (2010). Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the « decoy » receptor CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(2), 628-632. https://doi.org/10.1073/pnas.0912852107

Rajagopal, S., & Shenoy, S. K. (2018). GPCR desensitization : Acute and prolonged phases. *Cellular Signalling*, *41*, 9-16. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.024

Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griendling, K. K., & Harrison, D. G. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *Journal of Clinical Investigation*, *97*(8), 1916-1923. https://doi.org/10.1172/JCI118623

Ramachandran, R., Noorbakhsh, F., Defea, K., & Hollenberg, M. D. (2012). Targeting proteinase-activated receptors : Therapeutic potential and challenges. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *11*(1), 69-86. https://doi.org/10.1038/nrd3615

Regenhardt, R. W., Bennion, D. M., & Sumners, C. (2014a). Cerebroprotective action of angiotensin peptides in stroke. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *126*(3), 195-205. https://doi.org/10.1042/CS20130324

Regenhardt, R. W., Desland, F., Mecca, A. P., Pioquinto, D. J., Afzal, A., Mocco, J., & Sumners, C. (2013). Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. *Neuropharmacology*, *71*, 154-163. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.025

Regenhardt, R. W., Mecca, A. P., Desland, F., Ritucci-Chinni, P. F., Ludin, J. A., Greenstein, D., Banuelos, C., Bizon, J. L., Reinhard, M. K., & Sumners, C. (2014b). Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Experimental Physiology*, *99*(2), 442-453. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.075242

René, P., Lanfray, D., Richard, D., & Bouvier, M. (2021). Pharmacological chaperone action in humanized mouse models of MC4R-linked obesity. *JCI Insight*, *6*(4), e132778, 132778. https://doi.org/10.1172/jci.insight.132778

Revankar, C. M., Vines, C. M., Cimino, D. F., & Prossnitz, E. R. (2004). Arrestins Block G Protein-coupled Receptor-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(23), 24578-24584. https://doi.org/10.1074/jbc.M402121200

Rivas-Santisteban, R., Rodriguez-Perez, A. I., Muñoz, A., Reyes-Resina, I., Labandeira-García, J. L., Navarro, G., & Franco, R. (2020). Angiotensin AT1 and AT2 receptor heteromer expression in the hemilesioned rat model of Parkinson's disease that increases with levodopa-induced dyskinesia. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1), 243. https://doi.org/10.1186/s12974-020-01908-z

Roks, A. J. M., Nijholt, J., van Buiten, A., van Gilst, W. H., de Zeeuw, D., & Henning, R. H. (2004). Low sodium diet inhibits the local counter-regulator effect of angiotensin-(1-7) on angiotensin II. *Journal of Hypertension*, *22*(12), 2355-2361. https://doi.org/10.1097/00004872-200412000-00018

Roth, B. L., & Chuang, D. M. (1987). Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction. *Life Sciences*, *41*(9), 1051-1064. https://doi.org/10.1016/0024-3205(87)90621-7

Rovati, G. E., Capra, V., & Neubig, R. R. (2007). The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors : Beyond the ground state. *Molecular Pharmacology*, *71*(4), 959-964. https://doi.org/10.1124/mol.106.029470

Royea, J., & Hamel, E. (2020). Brain angiotensin II and angiotensin IV receptors as potential Alzheimer's disease therapeutic targets. *GeroScience*, *42*(5), 1237-1256. https://doi.org/10.1007/s11357-020-00231-y

Rubanyi, G. M., & Vanhoutte, P. M. (1986). Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *The American Journal of Physiology*, *250*(5 Pt 2), H822-827. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1986.250.5.H822

Ryba, D. M., Li, J., Cowan, C. L., Russell, B., Wolska, B. M., & Solaro, R. J. (2017). Long-Term Biased β-Arrestin Signaling Improves Cardiac Structure and Function in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, *135*(11), 1056-1070. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024482

Saavedra, J. M. (2016). Evidence to Consider Angiotensin II Receptor Blockers for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *36*(2), 259-279. https://doi.org/10.1007/s10571-015-0327-y

Saavedra, J. M., Fernandez-Pardal, J., & Chevillard, C. (1982). Angiotensin-converting enzyme in discrete areas of the rat forebrain and pituitary gland. *Brain Research*, *245*(2), 317-325. https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90814-9

Salomone, S., & Waeber, C. (2011). Selectivity and Specificity of Sphingosine-1-Phosphate Receptor Ligands : Caveats and Critical Thinking in Characterizing Receptor-Mediated Effects. *Frontiers in Pharmacology*, *2*. https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00009

Sampaio, W. O., Souza dos Santos, R. A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L. T., Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. (2007). Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension*, *49*(1), 185-192. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000251865.35728.2f

Sandset, E. C., Bath, P. M. W., Boysen, G., Jatuzis, D., Kõrv, J., Lüders, S., Murray, G. D., Richter, P. S., Roine, R. O., Terént, A., Thijs, V., Berge, E., & SCAST Study Group. (2011). The angiotensin-receptor blocker candesartan for treatment of acute stroke (SCAST) : A randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet (London, England)*, *377*(9767), 741-750. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60104-9

Sanni, S. J., Hansen, J. T., Bonde, M. M., Speerschneider, T., Christensen, G. L., Munk, S., Gammeltoft, S., & Hansen, J. L. (2010). Beta-Arrestin 1 and 2 stabilize the angiotensin II type I receptor in distinct high-affinity conformations. *British Journal of Pharmacology*, *161*(1), 150-161. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00875.x

Santos, R. A. (2014). Angiotensin-(1–7). *Hypertension*, *63*(6), 1138-1147. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01274

Santos, R. A. S., Ferreira, A. J., Nadu, A. P., Braga, A. N. G., de Almeida, A. P., Campagnole-Santos, M. J., Baltatu, O., Iliescu, R., Reudelhuber, T. L., & Bader, M. (2004). Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiological Genomics*, *17*(3), 292-299. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00227.2003

Santos, R. A. S., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M. R., Machado, R. P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V. B., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H.-P., Speth, R., & Walther, T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous

ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(14), 8258-8263. https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100

Savoia, C., Arrabito, E., Parente, R., Nicoletti, C., Madaro, L., Battistoni, A., Filippini, A., Steckelings, U. M., Touyz, R. M., & Volpe, M. (2020). Mas Receptor Activation Contributes to the Improvement of Nitric Oxide Bioavailability and Vascular Remodeling During Chronic AT1R (Angiotensin Type-1 Receptor) Blockade in Experimental Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *76*(6), 1753-1761. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15527

Savoia, C., Tabet, F., Yao, G., Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. (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. *Journal of Hypertension*, *23*(5), 1037. https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000166845.49850.39

Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. (2004). From bedside to bench to bedside : Role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *287*(2), H435-446. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00262.2004

Schinzari, F., Tesauro, M., Veneziani, A., Mores, N., Di Daniele, N., & Cardillo, C. (2018). Favorable Vascular Actions of Angiotensin-(1–7) in Human Obesity. *Hypertension*, *71*(1), 185-191. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10280

Schrader, J., Lüders, S., Kulschewski, A., Berger, J., Zidek, W., Treib, J., Einhäupl, K., Diener, H. C., Dominiak, P., & Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors Study Group. (2003). The ACCESS Study : Evaluation of Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. *Stroke*, *34*(7), 1699-1703. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000075777.18006.89

Schrader, J., Lüders, S., Kulschewski, A., Hammersen, F., Plate, K., Berger, J., Zidek, W., Dominiak, P., Diener, H. C., & MOSES Study Group. (2005). Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared with Nitrendipine for Secondary Prevention : Principal results of a prospective randomized controlled study (MOSES). *Stroke*, *36*(6), 1218-1226. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000166048.35740.a9

Seabra, A. B., Fitzpatrick, A., Paul, J., De Oliveira, M. G., & Weller, R. (2004). Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *The British Journal of Dermatology*, *151*(5), 977-983. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06213.x

Senbonmatsu, T., Saito, T., Landon, E. J., Watanabe, O., Price, E., Roberts, R. L., Imboden, H., Fitzgerald, T. G., Gaffney, F. A., & Inagami, T. (2003). A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway : Possible role in cardiac hypertrophy. *The EMBO Journal*, *22*(24), 6471-6482. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg637

Serebruany, V. L., Malinin, A. I., Lowry, D. R., Sane, D. C., Webb, R. L., Gottlieb, S. O., O'Connor, C. M., & Hennekens, C. H. (2004). Effects of valsartan and valeryl 4-hydroxy valsartan on human platelets : A possible additional mechanism for clinical benefits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *43*(5), 677-684. https://doi.org/10.1097/00005344-200405000-00010

Sernia, C., & Mowchanuk, M. D. (1983). Brain angiotensinogen : In vitro synthesis and chromatographic characterization. *Brain Research*, *259*(2), 275-283. https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91258-1

Seshiah, P., Weber, D., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., & Griendling, K. (2002). Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity : Upstream mediators. *Circulation Research*, *91*(5), 406-413. https://doi.org/10.1161/01.res.0000033523.08033.16

Shonberg, J., Kling, R. C., Gmeiner, P., & Löber, S. (2015). GPCR crystal structures : Medicinal chemistry in the pocket. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*(14), 3880-3906. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.034

Siragy, H. M., & Carey, R. M. (1997). The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *Journal of Clinical Investigation*, *100*(2), 264-269.

Skeggs, L. T., Dorer, F. E., Kahn, J. R., Lentz, K. E., & Levine, M. (1976). The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *The American Journal of Medicine*, *60*(6), 737-748. https://doi.org/10.1016/0002-9343(76)90888-3

Skeggs, L. T., Kahn, J. R., & Shumway, N. P. (1956). THE PREPARATION AND FUNCTION OF THE HYPERTENSIN-CONVERTING ENZYME. *The Journal of Experimental Medicine*, *103*(3), 295-299.

Skeggs, L. T., Lentz, K. E., Gould, A. B., Hochstrasser, H., & Kahn, J. R. (1967). Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system. *Federation Proceedings*, *26*(1), 42-47.

Skeggs, L. T., Marsh, W. H., Kahn, J. R., & Shumway, N. P. (1954). THE EXISTENCE OF TWO FORMS OF HYPERTENSIN. *The Journal of Experimental Medicine*, *99*(3), 275-282.

Soave, M., Briddon, S. J., Hill, S. J., & Stoddart, L. A. (2019). Fluorescent ligands : Bringing light to emerging GPCR paradigms. *British Journal of Pharmacology, 177*(5), 978-991. https://doi.org/10.1111/bph.14953

Soave, M., Stoddart, L. A., White, C. W., Kilpatrick, L. E., Goulding, J., Briddon, S. J., & Hill, S. J. (2021). Detection of genome-edited and endogenously expressed G protein-coupled receptors. *The FEBS Journal, 288*(8), 2585-2601. https://doi.org/10.1111/febs.15729

Soergel, D. G., Subach, R. A., Cowan, C. L., Violin, J. D., & Lark, M. W. (2013). First clinical experience with TRV027 : Pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology, 53*(9), 892-899. https://doi.org/10.1002/jcph.111

Sriram, K., & Insel, P. A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs : How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular Pharmacology, 93*(4), 251-258. https://doi.org/10.1124/mol.117.111062

Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J., & Loscalzo, J. (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide : Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 89*(1), 444-448. https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.444

Steckelings, U. M., Widdop, R. E., Sturrock, E. D., Lubbe, L., Hussain, T., Kaschina, E., Unger, T., Hallberg, A., Carey, R. M., & Sumners, C. (2022). The Angiotensin AT2 Receptor : From a Binding Site to a Novel Therapeutic Target. *Pharmacological Reviews, 74*(4), 1051-1135. https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000281

Stenman, E., & Edvinsson, L. (2004). Cerebral ischemia enhances vascular angiotensin AT1 receptor-mediated contraction in rats. *Stroke, 35*(4), 970-974. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000121642.53822.58

Stoddart, L. A., Johnstone, E. K. M., Wheal, A. J., Goulding, J., Robers, M. B., Machleidt, T., Wood, K. V., Hill, S. J., & Pfleger, K. D. G. (2015). Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs. *Nature methods, 12*(7), 661-663. https://doi.org/10.1038/nmeth.3398

Stoddart, L. A., Vernall, A. J., Bouzo-Lorenzo, M., Bosma, R., Kooistra, A. J., de Graaf, C., Vischer, H. F., Leurs, R., Briddon, S. J., Kellam, B., & Hill, S. J. (2018). Development of novel fluorescent histamine H1-receptor antagonists to study ligand-binding kinetics in living cells. *Scientific Reports, 8*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19714-2

Stoddart, L. A., White, C. W., Nguyen, K., Hill, S. J., & Pfleger, K. D. G. (2016). Fluorescence- and bioluminescence-based approaches to study GPCR ligand binding. *British Journal of Pharmacology*, *173*(20), 3028-3037. https://doi.org/10.1111/bph.13316

Stoy, H., & Gurevich, V. V. (2015). How genetic errors in GPCRs affect their function : Possible therapeutic strategies. *Genes & Diseases*, *2*(2), 108-132. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.02.005

Stryer, L., & Bourne, H. R. (1986). G Proteins : A Family of Signal Transducers. *Annual Review of Cell Biology*, *2*(1), 391-419. https://doi.org/10.1146/annurev.cb.02.110186.002135

Sumners, C., de Kloet, A. D., Krause, E. G., Unger, T., & Steckelings, U. M. (2015). Angiotensin type 2 receptors : Blood pressure regulation and end organ damage. *Current Opinion in Pharmacology*, *21*, 115-121. https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.01.004

Sumners, C., Horiuchi, M., Widdop, R. E., McCarthy, C., Unger, T., & Steckelings, U. M. (2013). Protective arms of the renin-angiotensin-system in neurological disease. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, *40*(8), 580-588. https://doi.org/10.1111/1440-1681.12137

Suomivuori, C.-M., Latorraca, N. R., Wingler, L. M., Eismann, S., King, M. C., Kleinhenz, A. L. W., Skiba, M. A., Staus, D. P., Kruse, A. C., Lefkowitz, R. J., & Dror, R. O. (2020). Molecular mechanism of biased signaling in a prototypical G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, *367*(6480), 881-887. https://doi.org/10.1126/science.aaz0326

Svensson, P., de Faire, U., Sleight, P., Yusuf, S., & Ostergren, J. (2001). Comparative effects of ramipril on ambulatory and office blood pressures : A HOPE Substudy. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *38*(6), E28-32. https://doi.org/10.1161/hy1101.099502

Swanson, G. N., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., Coleman, J. K., Wright, J. W., Hall, K. L., Miller-Wing, A. V., Stobb, J. W., Cook, V. I., & Harding, E. C. (1992). Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regulatory Peptides*, *40*(3), 409-419. https://doi.org/10.1016/0167-0115(92)90527-2

Sykes, D. A., Stoddart, L. A., Kilpatrick, L. E., & Hill, S. J. (2019). Binding kinetics of ligands acting at GPCRs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *485*, 9-19. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.018

Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X.-Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of Molecular Biology*, *428*(19), 3850-3868. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002

Tadevosyan, A., Létourneau, M., Folch, B., Doucet, N., Villeneuve, L. R., Mamarbachi, A. M., Pétrin, D., Hébert, T. E., Fournier, A., Chatenet, D., Allen, B. G., & Nattel, S. (2015). Photoreleasable ligands to study intracrine angiotensin II signalling. *The Journal of Physiology*, *593*(Pt 3), 521-539. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.279109

Takezako, T., Unal, H., Karnik, S. S., & Node, K. (2017). Current Topics in Angiotensin II Type 1 Receptor Research : Focus on Inverse Agonism, Receptor Dimerization and Biased Agonism. *Pharmacological research*, *123*, 40-50. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.013

Tanaka, Y., Tamura, K., Koide, Y., Sakai, M., Tsurumi, Y., Noda, Y., Umemura, M., Ishigami, T., Uchino, K., Kimura, K., Horiuchi, M., & Umemura, S. (2005). The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. *FEBS Letters*, *579*(7), 1579-1586. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.068

Taniyama, Y., Ushio-Fukai, M., Hitomi, H., Rocic, P., Kingsley, M. J., Pfahnl, C., Weber, D. S., Alexander, R. W., & Griendling, K. K. (2004). Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *287*(2), C494-499. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00439.2003

Tao, M.-X., Xue, X., Gao, L., Lu, J.-L., Zhou, J.-S., Jiang, T., & Zhang, Y.-D. (2018). Involvement of angiotensin-(1-7) in the neuroprotection of captopril against focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*, *687*, 16-21. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.09.024

Tarigopula, M., Davis, R. T., Mungai, P. T., Ryba, D. M., Wieczorek, D. F., Cowan, C. L., Violin, J. D., Wolska, B. M., & Solaro, R. J. (2015). Cardiac myosin light chain phosphorylation and inotropic effects of a biased ligand, TRV120023, in a dilated cardiomyopathy model. *Cardiovascular Research*, *107*(2), 226-234. https://doi.org/10.1093/cvr/cvv162

Te Riet, L., van Esch, J. H. M., Roks, A. J. M., van den Meiracker, A. H., & Danser, A. H. J. (2015). Hypertension : Renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circulation Research*, *116*(6), 960-975. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303587

Teixeira, L. B., Parreiras-e-Silva, L. T., Bruder-Nascimento, T., Duarte, D. A., Simões, S. C., Costa, R. M., Rodríguez, D. Y., Ferreira, P. A. B., Silva, C. A. A., Abrao, E. P., Oliveira, E. B., Bouvier, M., Tostes, R. C., & Costa-Neto, C. M. (2017). Ang-(1-7) is an endogenous β-arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy. *Scientific Reports*, *7*. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12074-3

Thomas, W. G., & Qian, H. (2003). Arresting angiotensin type 1 receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *14*(3), 130-136. https://doi.org/10.1016/s1043-2760(03)00023-7

Thomas, W. G., 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*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(4), 2893-2900. https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2893

Tigerstedt, R., & Bergman, P. Q. (1898). Niere und Kreislauf1. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie*, *8*(1), 223-271. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1898.tb00272.x

Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., & Turner, A. J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(43), 33238-33243. https://doi.org/10.1074/jbc.M002615200

Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J., & Luttrell, L. M. (2002). Beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(11), 9429-9436. https://doi.org/10.1074/jbc.M106457200

Tóth, A. D., Garger, D., Prokop, S., Soltész-Katona, E., Várnai, P., Balla, A., Turu, G., & Hunyady, L. (2021). A general method for quantifying ligand binding to unmodified receptors using Gaussia luciferase. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100366. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100366

Tóth, A. D., Szalai, B., Kovács, O. T., Garger, D., Prokop, S., Balla, A., Inoue, A., Várnai, P., Turu, G., & Hunyady, L. (2023). *Receptor endocytosis orchestrates the spatiotemporal bias of β-arrestin signaling* [Preprint]. Cell Biology. https://doi.org/10.1101/2023.04.27.538587

Touyz, R. M., & Berry, C. (2002). Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, *35*(9), 1001-1015. https://doi.org/10.1590/s0100-879x2002000900001

Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews*, *52*(4), 639-672.

Tsai, E., & Kass, D. (2009). Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, *122*(3). https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.02.009

Tsutsumi, K., & Saavedra, J. M. (1991). Characterization of AT2 angiotensin II receptors in rat anterior cerebral arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *261*(3), H667-H670. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.3.H667

Turko, I. V., & Murad, F. (2002). Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacological Reviews*, *54*(4), 619-634. https://doi.org/10.1124/pr.54.4.619

Ushio-Fukai, M., Zafari, A. M., Fukui, T., Ishizaka, N., & Griendling, K. K. (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. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(38), 23317-23321. https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23317

Vallega, G. A., Canessa, M. L., Berk, B. C., Brock, T. A., & Alexander, R. W. (1988). Vascular smooth muscle Na+-H+ exchanger kinetics and its activation by angiotensin II. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *254*(6), C751-C758. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1988.254.6.C751

Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Babu, M. M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *494*(7436), Article 7436. https://doi.org/10.1038/nature11896

Vikman, P., & Edvinsson, L. (2006). Gene expression profiling in the human middle cerebral artery after cerebral ischemia. *European Journal of Neurology*, *13*(12), 1324-1332. https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01496.x

Vilardaga, J.-P., Bünemann, M., Krasel, C., Castro, M., & Lohse, M. J. (2003). Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nature Biotechnology*, *21*(7), 807-812. https://doi.org/10.1038/nbt838

Villapol, S., & Saavedra, J. M. (2015). Neuroprotective Effects of Angiotensin Receptor Blockers. *American Journal of Hypertension*, *28*(3), 289-299. https://doi.org/10.1093/ajh/hpu197

Vincent, J.-M., Kwan, Y. W., Chan, S. L., Perrin-Sarrado, C., Atkinson, J., & Chillon, J.-M. (2005). Constrictor and dilator effects of angiotensin II on cerebral arterioles. *Stroke*, *36*(12), 2691-2695. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000190002.79052.bf

Violin, J. D., DeWire, S. M., Yamashita, D., Rominger, D. H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E. J., Gowen, M., & Lark, M. W. (2010). Selectively Engaging β-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *335*(3), 572-579. https://doi.org/10.1124/jpet.110.173005

Violin, J. D., & Lefkowitz, R. J. (2007). Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *28*(8), 416-422. https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.06.006

Vollmer, J.-Y., Alix, P., Chollet, A., Takeda, K., & Galzi, J.-L. (1999). Subcellular Compartmentalization of Activation and Desensitization of Responses Mediated by NK2 Neurokinin Receptors *. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(53), 37915-37922. https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.37915

Walters, P. E., Gaspari, T. A., & Widdop, R. E. (2005). Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *45*(5), 960-966. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000160325.59323.b8

Wan, Q., Okashah, N., Inoue, A., Nehmé, R., Carpenter, B., Tate, C. G., & Lambert, N. A. (2018). Mini G protein probes for active G protein-coupled receptors (GPCRs) in live cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(19), 7466-7473. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001975

Wanderer, S., Grüter, B. E., Strange, F., Sivanrupan, S., Di Santo, S., Widmer, H. R., Fandino, J., Marbacher, S., & Andereggen, L. (2020). The Role of Sartans in the Treatment of Stroke and Subarachnoid Hemorrhage : A Narrative Review of Preclinical and Clinical Studies. *Brain Sciences*, *10*(3). https://doi.org/10.3390/brainsci10030153

Wang, B., Li, C., Huai, R., & Qu, Z. (2015). Overexpression of ANO1/TMEM16A, an arterial Ca2+-activated Cl- channel, contributes to spontaneous hypertension. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *82*, 22-32. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.020

Wang, H., Deng, Q.-W., Peng, A.-N., Xing, F.-L., Zuo, L., Li, S., Gu, Z.-T., & Yan, F.-L. (2018). β-arrestin2 functions as a key regulator in the sympathetic-triggered immunodepression after stroke. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 102. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1142-4

Wang, P., Xu, T.-Y., Wei, K., Guan, Y.-F., Wang, X., Xu, H., Su, D.-F., Pei, G., & Miao, C.-Y. (2014). ARRB1/β-arrestin-1 mediates neuroprotection through coordination of BECN1-dependent autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy*, *10*(9), 1535-1548. https://doi.org/10.4161/auto.29203

Watari, K., Nakaya, M., Nishida, M., Kim, K.-M., & Kurose, H. (2013). β-arrestin2 in Infiltrated Macrophages Inhibits Excessive Inflammation after Myocardial Infarction. *PLOS ONE*, *8*(7), e68351. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068351

Weber, R., Weimar, C., Blatchford, J., Hermansson, K., Wanke, I., Möller-Hartmann, C., Gizewski, E. R., Forsting, M., Demchuk, A. M., Sacco, R. L., Saver, J. L., Warach, S., Diener, H.-C., Diehl, A., & PRoFESS Imaging Substudy Group. (2012). Telmisartan on top of antihypertensive treatment does not prevent progression of cerebral white matter lesions in the prevention regimen for effectively avoiding second strokes (PRoFESS) MRI substudy. *Stroke*, *43*(9), 2336-2342. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.648576

Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S. K., Karnik, S. S., Hunyady, L., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(19), 10782-10787. https://doi.org/10.1073/pnas.1834556100

Weir, M. R., & Dzau, V. J. (1999). The renin-angiotensin-aldosterone system : A specific target for hypertension management. *American Journal of Hypertension*, *12*(12 Pt 3), 205S-213S. https://doi.org/10.1016/s0895-7061(99)00103-x

Whalen, E. J., Rajagopal, S., & Lefkowitz, R. J. (2011). Therapeutic potential of β-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends in Molecular Medicine*, *17*(3), 126-139. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.11.004

White, C. W., Johnstone, E. K. M., See, H. B., & Pfleger, K. D. G. (2019). NanoBRET ligand binding at a GPCR under endogenous promotion facilitated by CRISPR/Cas9 genome editing. *Cellular Signalling*, *54*, 27-34. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.018

Wilson, W. L., Munn, C., Ross, R. C., Harding, J. W., & Wright, J. W. (2009). The role of the AT4 and cholinergic systems in the Nucleus Basalis Magnocellularis (NBM) : Effects on spatial memory. *Brain Research*, *1272*, 25-31. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.025

Wingler, L. M., Elgeti, M., Hilger, D., Latorraca, N. R., Lerch, M. T., Staus, D. P., Dror, R. O., Kobilka, B. K., Hubbell, W. L., & Lefkowitz, R. J. (2019a). Angiotensin Analogs with Divergent Bias Stabilize Distinct Receptor Conformations. *Cell*, *176*(3), 468-478.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.005

Wingler, L. M., McMahon, C., Staus, D. P., Lefkowitz, R. J., & Kruse, A. C. (2019b). Distinctive Activation Mechanism for Angiotensin Receptor Revealed by a Synthetic Nanobody. *Cell*, *176*(3), 479-490.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.006

Wingler, L. M., Skiba, M. A., McMahon, C., Staus, D. P., Kleinhenz, A. L. W., Suomivuori, C.-M., Latorraca, N. R., Dror, R. O., Lefkowitz, R. J., & Kruse, A. C. (2020). Angiotensin and biased analogs induce structurally distinct active conformations within a GPCR. *Science*, *367*(6480), 888-892. https://doi.org/10.1126/science.aay9813

Wink, D. A., Miranda, K. M., Espey, M. G., Pluta, R. M., Hewett, S. J., Colton, C., Vitek, M., Feelisch, M., & Grisham, M. B. (2001). Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxidants & Redox Signaling*, *3*(2), 203-213. https://doi.org/10.1089/152308601300185179

Wirth, A., Benyó, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horváth, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., Lemmer, B., Schütz, G., Gutkind, J. S., & Offermanns, S. (2008). G12-

G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nature Medicine*, *14*(1), 64-68. https://doi.org/10.1038/nm1666

Witherow, D. S., Garrison, T. R., Miller, W. E., & Lefkowitz, R. J. (2004). Beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(23), 8603-8607. https://doi.org/10.1073/pnas.0402851101

Wruck, C. J., Funke-Kaiser, H., Pufe, T., Kusserow, H., Menk, M., Schefe, J. H., Kruse, M. L., Stoll, M., & Unger, T. (2005). Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(1), 57-64. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000150662.51436.14

Yamamoto, K., Masuyama, T., Sakata, Y., Mano, T., Nishikawa, N., Kondo, H., Akehi, N., Kuzuya, T., Miwa, T., & Hori, M. (2000). Roles of renin-angiotensin and endothelin systems in development of diastolic heart failure in hypertensive hearts. *Cardiovascular Research*, *47*(2), 274-283. https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00101-2

Yang, C., Wu, X., Shen, Y., Liu, C., Kong, X., & Li, P. (2020). Alamandine attenuates angiotensin II-induced vascular fibrosis via inhibiting p38 MAPK pathway. *European Journal of Pharmacology*, *883*, 173384. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173384

Yang, R., Smolders, I., Vanderheyden, P., Demaegdt, H., Van Eeckhaut, A., Vauquelin, G., Lukaszuk, A., Tourwé, D., Chai, S. Y., Albiston, A. L., Nahmias, C., Walther, T., & Dupont, A. G. (2011). Pressor and Renal Hemodynamic Effects of the Novel Angiotensin A Peptide Are Angiotensin II Type 1A Receptor Dependent. *Hypertension*, *57*(5), 956-964. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.161836

Yasuda, N., Miura, S., Akazawa, H., Tanaka, T., Qin, Y., Kiya, Y., Imaizumi, S., Fujino, M., Ito, K., Zou, Y., Fukuhara, S., Kunimoto, S., Fukuzaki, K., Sato, T., Ge, J., Mochizuki, N., Nakaya, H., Saku, K., & Komuro, I. (2008). Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Reports*, *9*(2), 179-186. https://doi.org/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. *Hypertension*, *48*(5), 958-964. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000244108.30909.27

Yusuf, S., Diener, H.-C., Sacco, R. L., Cotton, D., Ôunpuu, S., Lawton, W. A., Palesch, Y., Martin, R. H., Albers, G. W., Bath, P., Bornstein, N., Chan, B. P. L., Chen, S.-T., Cunha, L., Dahlöf, B., De Keyser, J., Donnan, G. A., Estol, C., Gorelick, P., … Yoon, B.-W. (2008a). Telmisartan to Prevent Recurrent

Stroke and Cardiovascular Events. *New England Journal of Medicine*, *359*(12), 1225-1237. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804593

Yusuf, S., Teo, K., Anderson, C., Pogue, J., Dyal, L., Copland, I., Schumacher, H., Dagenais, G., & Sleight, P. (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 (London, England)*, *372*(9644), 1174-1183. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61242-8

Zafari, A. M., Ushio-Fukai, M., Minieri, C. A., Akers, M., Lassègue, B., & Griendling, K. K. (1999). Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, *1*(2), 167-179. https://doi.org/10.1089/ars.1999.1.2-167

Zhang, D., Zhao, Q., & Wu, B. (2015). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Molecules and Cells*, *38*(10), 836-842. https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0263

Zhang, H., Han, G. W., Batyuk, A., Ishchenko, A., White, K. L., Patel, N., Sadybekov, A., Zamlynny, B., Rudd, M. T., Hollenstein, K., Tolstikova, A., White, T. A., Hunter, M. S., Weierstall, U., Liu, W., Babaoglu, K., Moore, E. L., Katz, R. D., Shipman, J. M., … Cherezov, V. (2017). Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature*, *544*(7650), 327-332. https://doi.org/10.1038/nature22035

Zhang, H., Unal, H., Desnoyer, R., Han, G. W., Patel, N., Katritch, V., Karnik, S. S., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2015b). Structural Basis for Ligand Recognition and Functional Selectivity at Angiotensin Receptor♦. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(49), 29127-29139. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689000

Zhang, H., Unal, H., Gati, C., Han, G. W., Liu, W., Zatsepin, N. A., James, D., Wang, D., Nelson, G., Weierstall, U., Sawaya, M. R., Xu, Q., Messerschmidt, M., Williams, G. J., Boutet, S., Yefanov, O. M., White, T. A., Wang, C., Ishchenko, A., … Cherezov, V. (2015a). Structure of the Angiotensin receptor revealed by serial femtosecond crystallography. *Cell*, *161*(4), 833-844. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.011

Zhang, Y., Lu, J., Shi, J., Lin, X., Dong, J., Zhang, S., Liu, Y., & Tong, Q. (2008). Central administration of angiotensin-(1-7) stimulates nitric oxide release and upregulates the endothelial nitric oxide synthase expression following focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neuropeptides*, *42*(5-6), 593-600. https://doi.org/10.1016/j.npep.2008.09.005

Zhao, Q., Ishibashi, M., Hiasa, K., Tan, C., Takeshita, A., & Egashira, K. (2004). Essential role of vascular endothelial growth factor in angiotensin II-induced vascular inflammation and remodeling.

Hypertension (Dallas, Tex.: 1979), *44*(3), 264-270. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000138688.78906.6b

Zhou, J., Pavel, J., Macova, M., Yu, Z.-X., Imboden, H., Ge, L., Nishioku, T., Dou, J., Delgiacco, E., & Saavedra, J. M. (2006). AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, *37*(5), 1271-1276. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000217404.64352.d7

Zhou, X. E., He, Y., de Waal, P. W., Gao, X., Kang, Y., Van Eps, N., Yin, Y., Pal, K., Goswami, D., White, T. A., Barty, A., Latorraca, N. R., Chapman, H. N., Hubbell, W. L., Dror, R. O., Stevens, R. C., Cherezov, V., Gurevich, V. V., Griffin, P. R., … Xu, H. E. (2017). Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell*, *170*(3), 457-469.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.002

Zhuang, T., Vishnivetskiy, S. A., Gurevich, V. V., & Sanders, C. R. (2010). Elucidation of inositol hexaphosphate and heparin interaction sites and conformational changes in arrestin-1 by solution nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, *49*(49), 10473-10485. https://doi.org/10.1021/bi101596g

Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., Toko, H., Tamura, K., Kihara, M., Nagai, T., Fukamizu, A., Umemura, S., Iiri, T., Fujita, T., & Komuro, I. (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nature Cell Biology*, *6*(6), 499-506. https://doi.org/10.1038/ncb1137

Caractérisation pharmacologique et fonctionnelle de ligands traceurs du récepteur AT_1 de l'angiotensine II pour l'étude de nouvelles approches thérapeutiques

Le système rénine-angiotensine (SRA) est un système hormonal impliqué dans de nombreux processus physiologiques, tels que le contrôle de la pression artérielle et l'homéostasie vasculaire. L'Angiotensine II (Ang II) est le principal effecteur du SRA et se lie avec une affinité similaire à deux récepteurs : les récepteurs à l'Ang II de type 1 (AT_1) et de type 2 (AT_2), tous deux appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Dans la plupart des situations physiopathologiques, l'activation d'AT_1, qui stimule la voie de signalisation G_q, est prédominante et délétère. Elle s'oppose aux effets bénéfiques induits par AT_2. Le développement d'agonistes AT_1 biaisés, comme le TRV027, capables d'activer sélectivement la voie de signalisation β-arrestine plutôt que la voie G_q, apparait prometteur et pourrait conduire à de nouvelles stratégies thérapeutiques par rapport aux thérapies actuelles basées sur des antagonistes de AT_1 tel que le losartan.

L'objectif de l'équipe de recherche est d'explorer cette voie potentiellement bénéfique de la β-arrestine dans un contexte physiologique et physiopathologique cérébrovasculaire, comme lors d'un Accident Vasculaire Cérébral. L'activation de la β-arrestine peut être surveillée en suivant l'internalisation du récepteur AT_1 consécutive à son activation, mais les outils nécessaires pour suivre et tracer AT_1 exprimé de manière endogène, en particulier au niveau tissulaire, manquent notoirement de spécificité.

Les travaux expérimentaux présentés dans cette thèse se concentrent sur la caractérisation pharmacologique de nouveaux ligands fluorescents développés dans l'optique d'étudier les voies de signalisation AT_1 dans des modèles cérébrovasculaires. En utilisant des modèles cellulaires HEK 293 surexprimant les récepteurs AT_1 ou AT_2 fusionnés à des protéines fluorescentes ou luminescentes, nous avons caractérisé la pharmacologie et la sélectivité de ces nouveaux ligands. L'activité agoniste sur les récepteurs AT_1 est déterminée en détectant la mobilisation du calcium intracellulaire induite par l'activation de la voie de signalisation G_q. Le recrutement des protéines G hétérotrimériques et des β-arrestines est évalué à l'aide de tests de transfert d'énergie par résonance bioluminescente (NanoBRET). Les cinétiques d'internalisation sont suivies par NanoBRET et par imagerie afin de visualiser la distribution subcellulaire des ligands fluorescents et leur colocalisation avec les récepteurs cibles. Les ligands fluorescents sont également caractérisés *ex vivo* sur des artères cérébrales moyennes isolées de rat.

Des dérivés fluorescents de l'Ang II, de TRV027 et du losartan ont été étudiés. Pour la première fois, un ligand fluorescent sélectif des récepteurs AT_1 et un ligand fluorescent sélectif des récepteurs AT_2 ont été caractérisés. Les ligands fluorescents caractérisés pourront être utilisés pour suivre les récepteurs AT_1 et/ou AT_2 et pour déterminer, par exemple, les mécanismes impliqués dans l'abolition de l'activité vasoconstrictrice de AT_1 suite aux traitements par des donneurs de monoxyde d'azote.

Mots clés : Angiotensine II – agoniste biaisé – ligands fluorescents – récepteur AT_1 – *S*-nitrosation

Pharmacological and functional characterization of angiotensin II AT_1 receptor tracer ligands for the study of new therapeutic approaches

The renin-angiotensin system (RAS) is a hormonal system involved in many physiological processes, such as the control of arterial pressure and vascular homeostasis. Angiotensin II (Ang II) is the main effector of the RAS and binds with a similar affinity to two receptors: the Ang II type 1 (AT_1) and type 2 (AT_2) receptors, both belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) family. In most pathophysiological situations, AT_1 activation, which stimulates the G_q signaling pathway, is predominant and deleterious. It opposes the beneficial effects induced by AT_2. The development of biased AT_1 agonists, such as TRV027, able to selectively activate the β-arrestin transduction pathway rather than the G_q pathway, appears promising and could lead to new therapeutic strategies compared to current therapies based on AT_1 antagonists such as losartan.

The objective of the research team is to explore this potentially beneficial β-arrestin pathway in a cerebrovascular physiological and physiopathological context, such as in stroke. β-arrestin activation can be monitored by following AT_1 receptor internalization consecutive to its activation, however the tools needed to track and trace endogenously expressed AT_1, in particular at the tissue level, notoriously lack specificity.

The experimental work presented in this thesis focuses on the pharmacological characterization of new AT_1-specific fluorescent ligands developed with the aim of studying AT_1 signaling pathways in cerebrovascular models. Using HEK 293 cellular models overexpressing either AT_1 or AT_2 fused to fluorescent or luminescent proteins, we have characterized the pharmacology and selectivity of these new ligands. Agonist activity on AT_1 receptors is determined by detecting intracellular calcium mobilization induced by the activation of the G_q signaling pathway. Recruitment of heterotrimeric G proteins and β-arrestins is assessed using bioluminescence resonance energy transfer (NanoBRET) assays. Internalization kinetics are followed by NanoBRET and imaging to visualize the subcellular distribution of the fluorescent ligands and their colocalization with target receptors. The fluorescent ligands have also been characterized *ex vivo* on isolated rat middle cerebral arteries.

Fluorescent derivatives of Ang II, TRV027 and losartan were studied. For the first time, an AT_1 receptor-selective fluorescent ligand and an AT_2 receptor-selective fluorescent ligand have been characterized. The characterized fluorescent ligands could be used to track AT_1 and/or AT_2 receptors and to determine, for example, the mechanisms involved in the abolition of the vasoconstrictor activity of AT_1 following treatments with nitric oxide donor.

Key words: Angiotensin II – biased agonist – fluorescent ligands – AT_1 receptor – *S*-nitrosation