

Identification du récepteur à l'angiotensine II et détermination de ses sous-types dans les annexes fœtales du lapin et du cobaye

MK Kalenga ^{1*}, M de Gasparo ², S Whitebread ²,
L Vankrieken ¹, K Thomas ¹, R De Hertogh ¹

¹ Université catholique de Louvain, département gynécologie, obstétrique,
unité de recherche en physiologie de la reproduction humaine,
5330 avenue Em Mounier, B-1200 Bruxelles, Belgique;
² CIBA-GEIGY, Département de recherche, Bâle, Suisse

(Reçu le 11 juillet 1991; accepté le 19 décembre 1991)

Résumé — La mesure des récepteurs à l'angiotensine II (All) a été effectuée dans les annexes fœtales du lapin et du cobaye suivant deux procédés. D'abord une mesure relative de la liaison spécifique a été faite à une concentration unique de la ¹²⁵I[Sar¹Ile⁸]All (0,15 nM) afin de déterminer quel tissu a un nombre de sites de liaison suffisant pour permettre l'étude des courbes de compétition. Ensuite celles-ci ont été réalisées dans certains tissus dans le but de mesurer la capacité maximale de liaison (B_{max}) et la constante de dissociation à l'équilibre (K_d) et d'identifier les sous-types de récepteurs. La mesure relative de la liaison révèle un grand nombre de sites occupés dans le placenta fœtal et le chorion du lapin (159 ± 17 et 51 ± 10 fmol/mg protéines) et dans le chorion du cobaye (132 ± 12 fmol/mg protéines). Les autres tissus des annexes fœtales ont, chez le lapin comme chez le cobaye, des valeurs 3 à 10 fois plus basses. Les courbes de compétition réalisées dans les tissus ayant une grande concentration en récepteurs de l'angiotensine II montrent en grande majorité le sous-type AT₂ dans le placenta fœtal du lapin (AT₁/AT₂ = 25/75) et le sous-type AT₁ dans le chorion du lapin (90/10) et du cobaye (97/3). Sur la représentation graphique selon Scatchard, le K_d pour la [Sar¹Ile⁸] All est évalué chez le lapin à $1,2 \pm 0,2$ nM ($n = 5$) dans le placenta fœtal et $1,2$ ($n = 1$) dans le chorion et chez le cobaye à $0,5 \pm 0,1$ nM ($n = 3$) dans le chorion. Le B_{max} respectif est de $1\,281 \pm 115$ ($n = 5$), 263 ($n = 1$) et $1\,188 \pm 134$ fmol/mg protéines ($n = 3$). Ainsi, cette étude suggère que le placenta fœtal et le chorion du lapin de même que le chorion du cobaye sont les sites d'action les plus importants du système rénine-angiotensine des annexes fœtales.

récepteur angiotensine II / placenta / chorion / lapin / cobaye

Summary — Identification of angiotensin II receptor and determination of its subtypes in rabbit and guinea pig placenta, chorion and amnion. Membrane angiotensin II receptors were measured in trophoblastic tissues using a 2-step procedure. The first step consisted of the relative measurement performed at a fixed ¹²⁵I[Sar¹Ile⁸]All concentration of 0.15 nM in order to determine which tissues had a sufficient number of binding sites for studying the competition curves. The second con-

* Correspondance et tirés à part

sisted of determining the maximal binding (B_{max}) and the dissociation constant (K_d) for [Sar^1Ile^8] All and the receptor subtypes in these tissues. The relative binding measurement revealed a significant number of occupied sites in rabbit fetal placenta and chorion (159 ± 17 and 51 ± 10 fmol/mg proteins) and in guinea pig chorion (132 ± 12). The mean values of the other trophoblastic tissues were 3–10-fold lower in the 2 species. The competition curves obtained from tissues with high angiotensin II binding receptors showed the predominance of the AT_2 subtype in rabbit fetal placenta ($AT_1 / AT_2 = 25/75$) and of the AT_1 receptor in guinea pig chorion (97/3) and in rabbit chorion (90/10). The [SAR^1Ile^8] All affinity (K_d) obtained from Scatchard plot analysis was 1.2 ± 0.2 nM ($n = 5$) in fetal placenta and 1.2 ($n = 1$) in rabbit chorion and 0.5 ± 0.1 ($n = 3$) in guinea pig chorion. In these tissues, the respective B_{max} values were $1\ 281 \pm 115$ ($n = 5$), 263 ($n = 1$) and $1\ 188 \pm 134$ fmol/mg proteins ($n = 3$). These findings indicate that rabbit fetal placenta and chorion and guinea pig chorion are the most important sites of action for the renin–angiotensin system present in trophoblastic tissues.

angiotensin II receptor / placenta / chorion / rabbit / guinea pig

INTRODUCTION

Le lapin et le cobaye ont un placenta de type hémochorial comme celui de l'homme et sont classés parmi les meilleurs modèles expérimentaux pour l'étude de la physiologie de la reproduction (Martenson, 1984). Leurs annexes fœtales, notamment le placenta, l'amnios et le chorion, contiennent de la prorénine, de la rénine active, de l'angiotensine I et de l'angiotensine II (Gross *et al*, 1964; Eskildsen, 1973; Kalenga *et al*, 1991b). La présence des récepteurs de l'angiotensine II est peu documentée dans ces diverses structures tissulaires. Nous pensons que des études orientées dans cette voie pourraient aider à comprendre le fonctionnement du système rénine-angiotensine dans les annexes fœtales.

Le but de ce travail est double. D'abord, évaluer le nombre de sites de liaison spécifique de l'angiotensine II dans le placenta maternel, le placental fœtal, l'amnios et le chorion du lapin et du cobaye. Ensuite, déterminer dans ces différents tissus les sous-types des récepteurs de l'angiotensine II en utilisant des antagonistes de l'angiotensine II ayant une affinité sélective : le CGP 42112A et le PD 123177 pour le sous-type AT_2 et le Dup 753 pour

le sous-type AT_1 (Whitebread *et al*, 1989; de Gasparo *et al*, 1990; Rogg *et al*, 1990; Wong *et al*, 1990; Bumpus *et al*, 1991).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude est réalisée sur des animaux gestants à terme : des lapins de souche néo-zélandaise au 30^e jour post-coïtal et des cobayes tricolores au 70^e jour post-coïtal.

Une anesthésie générale est réalisée à l'aide de kétamine (50 mg/kg IM). Deux minutes après l'injection du produit anesthésique, une laparotomie médiane est pratiquée. Les cornes utérines sont ouvertes longitudinalement et ensuite le chorion, l'amnios, le placenta fœtal et le placenta maternel sont décollés.

Les échantillons des tissus prélevés sur le placenta et les membranes fœtales sont rincés séparément avec la solution physiologique (NaCl 0,9 g% conservé à 4 °C), placés chacun dans un tube en plastique et immédiatement congelés dans l'azote liquide.

La mesure des récepteurs membranaires d'angiotensine II est réalisée selon une technique décrite antérieurement (Whitebread *et al*, 1989; Kalenga *et al*, 1991a). Brièvement, les récepteurs de l'angiotensine II sont mesurés dans une suspension de membranes dont la concentration en protéines est comprise entre 62,5 et 250 µg/ml. La $^{125}I[Sar^1Ile^8]All$ (antagoniste de l'angiotensine II) est utilisée comme traceur en présence d'un agent compétiteur. Sa liaison aux

récepteurs est déterminée en fmol/mg protéines. Le taux de protéines est mesuré selon la technique de Bradford (1976). Une bonne linéarité est observée entre la liaison spécifique de la $^{125}\text{I}[\text{Sar}^1\text{Ile}^8]\text{All}$ et la concentration tissulaire des protéines (gamme de valeurs allant de 62,5 à 250 $\mu\text{g/ml}$) (Kalenga *et al*, 1991a). La liaison non spécifique est évaluée en présence d' $1\ \mu\text{M}$ d'angiotensine II: elle reste inférieure à 25%.

Les sous-types de récepteurs sont déterminés en présence des ligands à affinité sélective: le Dup 753 (inhibiteur spécifique du sous-type AT_1), le CGP 42112A et le PD 123177 (inhibiteurs spécifiques du récepteur AT_2). Toutefois à des concentrations micromolaires, le CGP 42112A inhibe aussi le sous-type AT_1 . Le PD 123177 produit un effet similaire mais son IC_{50} pour le sous-type AT_1 est plus de 10 fois supérieur à celui du CGP 42112A.

Le programme LIGAND a été utilisé pour l'analyse des courbes de compétition (Munson et Rodbard, 1980; Whitebread *et al*, 1989) et le test de Student pour l'étude comparative du nombre des sites. La capacité maximale de liaison (B_{max}) et la constante de dissociation à l'équilibre (K_d) sont calculées à partir de la représentation graphique selon Scatchard.

RÉSULTATS

Liaison de la $^{125}\text{I}[\text{Sar}^1\text{Ile}^8]\text{All}$ radioactive mesurée à une concentration unique (0,15 nM)

L'étude comparative du nombre moyen de sites occupés montre chez le lapin une différence hautement significative entre les diverses structures. Il en est de même chez le cobaye, mis à part le petit écart non significatif observé entre les valeurs de l'amnios et du placenta foetal (fig 1). Un grand nombre de sites occupés se trouvent dans le placental foetal et le chorion du lapin (159 ± 17 et 51 ± 10 fmol/mg protéines) ainsi que dans le chorion du cobaye (132 ± 12 fmol/mg protéines). Dans les autres tissus des annexes foetales de 2 espèces, la

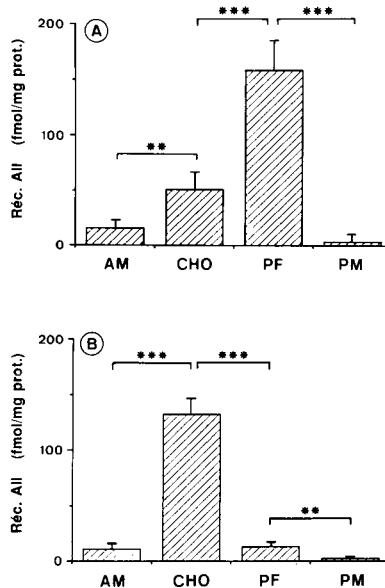


Fig 1. Mesure relative des récepteurs de l'angiotensine II (valeurs moyennes \pm erreur standard de la moyenne) réalisée à une concentration fixe de 0,15 nM de $^{125}\text{I}[\text{Sar}^1\text{Ile}^8]\text{All}$ dans les annexes foetales du lapin (A) à terme (30^e jour post-coïtal) ($n = 11$) et celles du cobaye (B) à terme (70^e jour post-coïtal) ($n = 9$) AM = amnios, CHO = chorion, PF = placenta foetal, PM = placenta maternel. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

liaison de la $^{125}\text{I}[\text{Sar}^1\text{Ile}^8]\text{All}$ est inférieure à 20 fmol/mg protéines.

Courbes de compétition

Dans le placenta foetal et le chorion du lapin et dans le chorion du cobaye, une compétition est mise en jeu entre d'une part la $^{125}\text{I}[\text{Sar}^1\text{Ile}^8]\text{All}$ radioactive et d'autre part la $^{125}\text{I}[\text{Sar}^1\text{Ile}^8]\text{All}$ froide, le Dup 753, le CGP 42112A et le PD 123177 (fig 2A,B,C). La $^{125}\text{I}[\text{Sar}^1\text{Ile}^8]\text{All}$ froide exerce en fonction

de sa concentration un effet inhibiteur sur la liaison de la $[Sar^1Ile^8]All$ radioactive. Elle se lie aussi bien au sous-type AT_1 qu'au sous-type AT_2 : la représentation graphique de cette liaison selon Scatchard montre une seule classe de récepteurs (fig 2D, E, F).

Le sous-type AT_2 est majoritaire dans le placenta fœtal du lapin ($75 \pm 6\%$, $n = 11$) et le sous-type AT_1 dans le chorion du

lapin (90%) et du cobaye ($97 \pm 3\%$, $n = 4$). Dans les tissus étudiés, l' IC_{50} du Dup 753, du CGP 42112A et du PD 123177 (tableau I) varie avec la proportion des sous-types. Ainsi, l' IC_{50} du Dup 753 est environ 1 000 fois plus faible dans le chorion du cobaye – contenant 97% d' AT_1 – que dans le placenta fœtal du lapin où le sous-type AT_2 est majoritaire. Pour le CGP 42112A et le PD 123177, le rapport est inversé : les va-

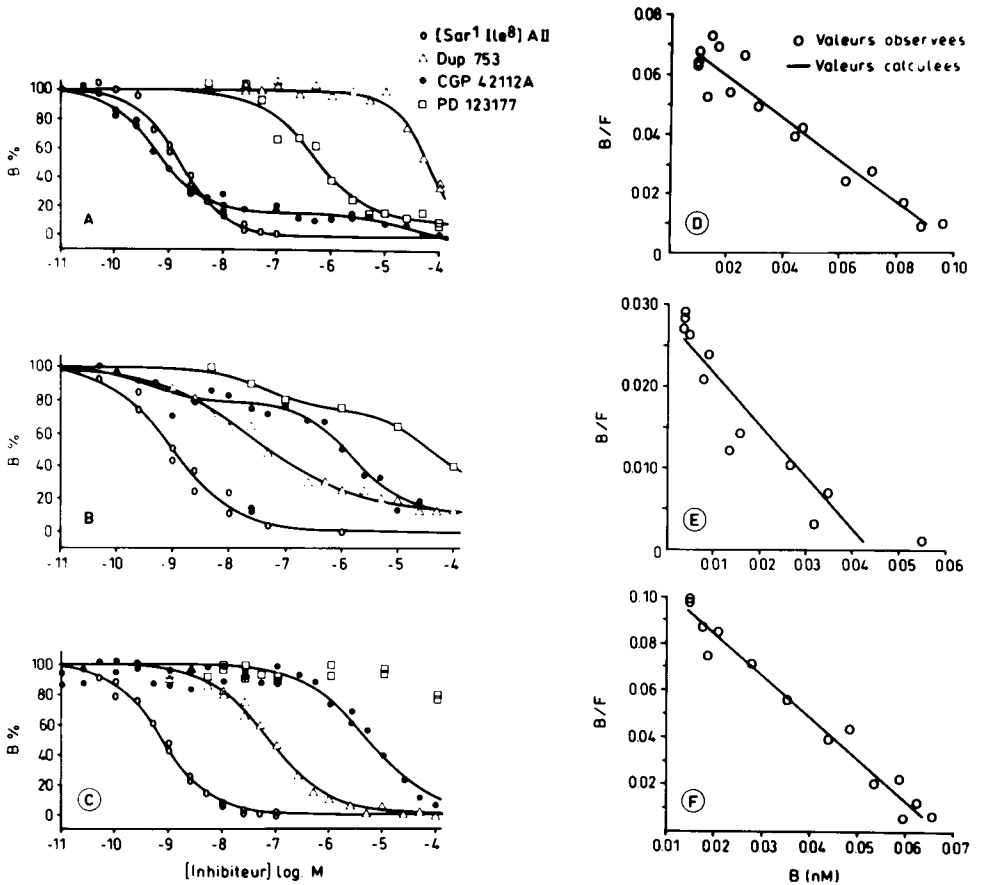


Fig 2A–C. Compétition entre d'une part la $[Sar^1Ile^8]All$ radioactive et d'autre part la $[Sar^1Ile^8]All$ froide (inhibition de deux sous-types), le Dup 753 (affinité plus grande pour le sous-type AT_1), le CGP 42112A (affinité plus grande pour le sous-type AT_2) et le PD 123177 (affinité plus grande pour le sous-type AT_2) dans le placenta fœtal (A) et le chorion (B) du lapin et dans le chorion du cobaye (C) à terme. **D–F.** Représentation graphique selon Scatchard de la liaison de la $^{125}I[Sar^1Ile^8]All$ dans le placenta fœtal (D) et le chorion (E) du lapin et dans le chorion du cobaye (F) à terme.

Tableau I. Valeurs d' IC_{50} (en nM) pour la $[Sar^1Ile^8]All$, le Dup 753, le CGP 42112A et le PD 123177 dans le placenta foetal et le chorion du lapin et dans le chorion du cobaye à terme. (AT_1) = valeur observée en rapport avec le sous-type AT_1 . (AT_2) = valeur observée en rapport avec le sous-type AT_2 .

Localisation	$[Sar^1Ile^8]All$	Dup753	CGP42112A	PD123177
Placenta foetal (lapin)	1,60	62 890	18 900(AT_1) 0,58(AT_2)	480
Chorion (lapin)	1,05	29	1 600(AT_1) 0,33(AT_2)	35 000(AT_1) 38(AT_2)
Chorion (cobaye)	0,76	70	5 100	$>10^{-4}$ M

leurs du placenta foetal du lapin sont nettement inférieures à celles du chorion du cobaye. Cependant vis-à-vis du même sous-type, l' IC_{50} de chaque ligand utilisé varie aussi d'un tissu à l'autre mais ces variations sont relativement faibles (2 à 10 fois).

Le B_{max} des récepteurs ($x \pm SEM$) est évalué chez le lapin à $1\,281 \pm 115$ fmol/mg protéines ($n = 5$) dans le placenta foetal et 263 ($n = 1$) dans le chorion et chez le cobaye à $1\,188 \pm 134$ ($n = 3$) dans le chorion. Dans ces tissus, le K_d atteint respectivement $1,2 \pm 0,2$ ($n = 5$), $1,2$ ($n = 1$) et $0,5 \pm 0,1$ nM ($n = 3$). Dans les autres structures des annexes foetales du lapin et du cobaye, le B_{max} et le K_d n'ont pas été déterminés car la liaison spécifique y est trop faible.

DISCUSSION

L'étude de la liaison $^{125}I[Sar^1Ile^8]All$ à une concentration unique de $0,15$ nM révèle un grand nombre de sites occupés dans le placenta foetal et le chorion du lapin et dans le chorion du cobaye. Les autres tissus analysés lient très faiblement le ligand. Une telle mesure faite à une concen-

tration non saturante mais proche des taux physiologiques de l'angiotensine II (Kalenga *et al*, 1991b) ne donne qu'une évaluation relative du nombre de sites de liaison; elle ne permet pas en effet de déterminer l'affinité de divers tissus pour le ligand utilisé. Néanmoins, la différence du nombre de sites d'un tissu à l'autre est telle qu'elle suggère une expression des récepteurs d'angiotensine II quantitativement plus grande dans le placenta foetal et le chorion du lapin et dans le chorion du cobaye.

La distribution du nombre relatif de sites récepteurs dans les annexes foetales de 2 espèces animales est très différente. Nous observons chez le lapin un nombre de sites de liaison nettement plus élevé dans le placenta foetal que dans les membranes foetales, comme démontré également dans l'espèce humaine par Cooke *et al* (1981) et par nos propres expériences (résultats non encore publiés). Par contre, le cobaye présente une situation inverse : sa membrane chorionique contient 10 fois plus de sites de liaison que le placenta.

L'analyse des valeurs du K_d obtenues dans les expériences de compétition montre que l'affinité de la $[Sar^1Ile^8]All$ est

environ 2 fois plus élevée dans le chorion du cobaye ($K_d = 0,5$ nM) que dans le placenta fœtal et le chorion du lapin ($K_d = 1,2$ nM). Ce dernier tissu a un B_{max} 5 fois inférieur à celui du chorion du cobaye (263 *versus* 1 188 fmol/mg protéines). Dans le placenta, la concentration en récepteurs varie aussi avec l'espèce. En effet, la valeur du B_{max} observée dans le placenta fœtal du lapin (de l'ordre de 1 200 fmol/mg protéines) est plus de 100 fois supérieure à celle du placenta du rat (Kurauchi *et al*, 1989) mais elle est environ 2 fois inférieure à celle des villosités choriales humaines (Kalenga *et al*, 1991a).

Deux sous-types de récepteurs de l'angiotensine II ont été identifiés en présence de ligands spécifiques et sélectifs (le Dup 753, le CGP 42112A et le PD 123177). Nous trouvons en majorité le récepteur AT_2 dans le placenta fœtal du lapin et le récepteur AT_1 dans le chorion du cobaye et du lapin.

Comme le montrent les résultats de notre étude, l' IC_{50} du Dup 753, du CGP 42112A et du PD 123177 est, vis-à-vis du même sous-type, variable suivant la nature du tissu. Ceci suggère que l'affinité des ligands utilisés peut être différente d'un tissu à l'autre. Cette observation corrobore les résultats d'autres études qui signalent des valeurs d' IC_{50} variables de tissu à tissu et d'espèce à espèce, cela aussi bien pour le Dup 753 (Chiu *et al*, 1990, 1991; Ozawa *et al*, 1991) que pour le CGP 42112A et le PD 123177 (Herblin *et al*, 1991; Tsutsumi *et al*, 1991). En outre, nous constatons que le PD 123177 a, vis-à-vis du sous-type AT_2 , un IC_{50} plus de 100 fois supérieur à celui du CGP 42112A. Ceci est en accord avec les observations de Balla *et al* (1991) et de Tsutsumi *et al* (1991) montrant que le CGP 42112A se lie au récepteur AT_2 avec une affinité nettement plus grande que celle du PD 123177.

Les proportions de sous-types de récepteurs à l'angiotensine II sont aussi variables d'une espèce à l'autre et d'un organe à l'autre. Chez le rat, la proportion d' AT_1 / AT_2 est de 40/60 dans le tissu cérébral (Chang *et al*, 1990), 30/70 dans la médullosurrénale, 60/40 dans la zone glomérulaire de la surrénale, 70/30 dans la séreuse et le muscle utérins et 100/0 dans le glomérule rénal, le foie et les cellules musculaires de l'aorte en culture (de Gasparo *et al*, 1990).

Chez le lapin, cette proportion est de 67/33 dans le myocarde ventriculaire (Rogg *et al*, 1990) alors que chez l'homme, elle est de 0/100 dans le muscle utérin (Whitebread *et al*, 1989) et 100/0 dans le tissu placentaire (Kalenga *et al*, 1991a) et les cellules musculaires de l'artère rénale en culture. Les deux sous-types ont cependant été retrouvés dans les membranes d'artère rénale fraîchement préparées (50/50) (Whitebread *et al*, 1989).

Dans la plupart des tissus étudiés, le récepteur AT_1 prédomine largement. À ce jour, il est le médiateur de plusieurs effets biologiques qu'exerce l'angiotensine II (Wong *et al*, 1990). Tout particulièrement, il permet à l'angiotensine II d'induire la vasoconstriction (Criscione *et al*, 1990; de Gasparo *et al*, 1990) et il pourrait donc jouer un rôle déterminant dans la régulation du flux sanguin au niveau de divers organes. Quant au sous-type AT_2 , on sait simplement qu'il n'est pas couplé à une G-protéine (Bottari *et al*, 1991) et que son affinité augmente en présence du dithiothreitol (Whitebread *et al*, 1989) mais on ne lui reconnaît pas encore de rôle physiologique précis.

En conclusion, les résultats observés chez le lapin et le cobaye indiquent qu'il existe un nombre variable de sites de liaison spécifique de l'angiotensine II dans les tissus des annexes fœtales. Le placenta fœtal et le chorion du lapin ainsi que le

chorion du cobaye ont un grand nombre de récepteurs. De ce fait, ils peuvent être considérés comme une cible principale de l'angiotensine II dans les annexes fœtales de ces 2 espèces.

REMERCIEMENTS

Nous remercions sincèrement Mlle Yvonne Bogdale, Mme Eva Halmo, M Oliver Peter et M Pascal Oehninger (Laboratoire Ciba-Geigy, Bâle, Suisse) pour leur contribution à la réalisation de ce travail. Nos remerciements s'adressent également à Mme A Kalenga pour sa participation à la préparation du manuscrit.

RÉFÉRENCES

- Balla T, Baukal AJ, Eng S, Catt KJ (1991) Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol Pharmacol* 40, 401-406
- Bottari SP, Taylor V, King IN, Bodgale Y, Whitebread S, de Gasparo M (1991) AT₂ angiotensin II receptors do not interact with guanine nucleotide binding proteins. *Eur J Pharmacol* 207, 157-163
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, de Gasparo M, Goodfriend A, Husain A, Peach MJ, Taylor V, Timmermans PBMWM (1991) Nomenclature for angiotensin receptors. *Hypertension* 17, 720-721
- Chang SL, Lotti VJ, Chen TB, Faust KA (1990) Two angiotensin II binding sites in rat brain revealed using ¹²⁵I(Sar¹Ile⁸) angiotensin II and selective non-peptide antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 813-817
- Chiu AT, McCall DE, Price WA, Wong PC, Carini DJ, Duncia JV, Wexler RR, Yoo SE, Johnson AL, Timmermans PBMWM (1990) Non peptide angiotensin II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of Dup 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 252, 711-718
- Chiu AT, McCall DE, Price WA, Wong PC, Carini DJ, Duncia JV, Wexler RR, Yoo SE, Johnson AL, Timmermans PBMWM (1991) *In vitro* pharmacology of Dup 753. *Am J Hypertens* 4, 282s-287s
- Cooke SF, Graven DJ, Symonds EM (1981) A study of angiotensin II binding sites in human placenta, chorion and amnion. *Am J Obstet Gynecol* 140, 689-692
- Criscione L, Thomann H, Whitebread S, de Gasparo M, Buehlmayer P, Herold P, Ostermayer F, Kamber B (1990) Binding characteristics and vascular effects of various angiotensin II antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol* 16, 56-59
- De Gasparo M, Whitebread S, Mele M, Motani AS, Whitcombe PJ, Ramjoui HP, Kamber B (1990) Biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 16, 31-35
- Eskildsen PC (1973) Renin in different tissues, amniotic fluid and plasma of pregnant and non-pregnant rabbits. *Acta Pathol Microbiol Scand* 81, 263-268
- Herblin WF, Chiu AT, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wexler RR, Yoo SE, Johnson AL, Timmermans PBMWM (1991) Angiotensin II receptor heterogeneity. *Am J Hypertens* 4, 299s-302s
- Gross F, Schaechtelin G, Ziegler M, Berger M (1964) A rennin-like substance in the placenta and uterus of the rabbit. *Lancet* 25, 914-915
- Kalenga MK, De Gasparo M, De Hertogh R, Whitebread S, Vankrieken L, Thomas K (1991a) Les récepteurs de l'angiotensine II dans le placenta humain sont de type AT₁. *Reprod Nutr Dev* 31, 257-267
- Kalenga MK, De Hertogh R, Whitebread S, Vankrieken L, Thomas K, De Gasparo M (1991b) Étude du système rénine-angiotensine et des stéroïdes chorio-placentaires, fœtaux et maternels chez le cobaye. *J Physiol* 85 (sous presse)
- Kurauchi O, Mizutani S, Nomura S, Furuhashi M, Kasugai M, Tomoda Y (1989) Changes in the binding of angiotensin II to rat placental receptor by estrogen and progesterone. *Horm Metab Res* 21, 558-560
- Martensson L (1984) The pregnant rabbit, guinea pig, sheep and rhesus monkey as models in reproductive physiology Europ. *J Obstet Gynecol Reprod Biol* 18, 169-182

- Munson PJ, Rodbard D (1980) Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107, 220-239
- Ozawa K, Nomura S, Hashimoto M, Kushida H (1991) Angiotensin II receptor in dog adrenal cortex characterized by nonpeptide antagonist, Dup 753. *Jpn J Pharmacol* 55, suppl 1, P287
- Rogg H, Schmid A, De Gasparo M (1990) Identification and characterization of angiotensin II receptor subtypes in rabbit ventricular myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 416-422
- Tsutsumi K, Strömberg C, Viswanathan M, Saavedra JM (1991) Angiotensin II receptor subtypes in fetal tissues of the rat : autoradiography, guanine nucleotide sensitivity and association with phosphoinositide hydrolysis. *Endocrinology* 129, 1075-1082
- Whitebread S, Mele M, Kamber B, De Gasparo M (1989) Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 284-291
- Wong PC, Hart SD, Zaspel AM, Chiu AT, Ardecy RJ, Smith RD, Timmermans PBMWM (1990) Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: Dup 753 (AII-1) and PD 123177 (AII-2). *J Pharmacol Exp Ther* 255, 584-592