



UNIVERSITÉ
**PARIS
DESCARTES**

U^SPC

Université Sorbonne
Paris Cité



**COLLÈGE
DE FRANCE**
—1530—

ECOLE DOCTORALE MEDICAMENT TOXICOLOGIE CHIMIE ENVIRONNEMENT

THESE DE DOCTORAT

Etudes structure-fonction par modélisation moléculaire et mutagénèse dirigée de cibles thérapeutiques potentielles impliquées dans la régulation de l'équilibre hydrique et des fonctions cardiovasculaires.

Soutenue par : **Pierre Couvineau**

Le 29 Juin 2017 au Collège de France, Paris

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Paris Descartes

DIRECTEURS DE THESE :

Dr. Catherine LLORENS-CORTES & Dr. Xavier ITURRIOZ

Composition du Jury :

Pr. Michel VIDAL- Université Paris Descartes Paris V, Paris
Dr. Thierry DURROUX- Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier
Pr. Thierry FOULON- Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Paris
Dr. Vincent DIVE- IBITECS-CEA, Saclay

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Table des matières

Liste des abbréviations	11
Partie 1 : L'aminopeptidase A cérébrale, une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'hypertension.....	15
Chapitre 1 : L'aminopeptidase A, une aminopeptidase monozinc membranaire.....	15
I) Introduction : Les peptidases monozincs	15
II) La famille des zincins	17
1) Les gluzincins	17
a) La sous-famille de la thermolysine	17
b) La sous-famille de l'endopeptidase neutre	17
c) La sous-famille de l'enzyme de conversion de l'angiotensine	18
d) La sous-famille des aminopeptidases	18
e) La sous-famille de la Thimet oligopeptidase	18
2) Les metzincins.....	19
3) Les aspzincins.....	19
4) La peptide déformylase	19
III) La famille des inverzincins	20
IV) La famille des carboxypeptidases.....	20
V) La famille des DD-carboxypeptidase	20
Chapitre 2 : L'aminopeptidase A	21
I) Historique	21
II) Clonage et structure du gène	21
III) Organisation structurale de l'APA	24
1) Structure générale.....	24
a) Propriétés physiques	24
b) Rôle du domaine C-terminal.....	25
2) Spécificité de substrat	26
a) Substrats naturels.....	26
b) Substrats synthétiques	26
3) Les effets des ions métalliques.....	27
4) Inhibiteurs de l'aminopeptidase A	28
a) Les inhibiteurs d'aminopeptidases monozinc	28
b) Les inhibiteurs synthétiques de l'aminopeptidase A.....	33
IV) Expression tissulaire et cellulaire de l'APA.....	36
1) A la périphérie	36

2) Au niveau central.....	37
Chapitre 3 : Le système rénine-angiotensine cérébral.....	40
I) L'angiotensinogène	40
II) L'angiotensine 1-12	41
III) La rénine et l'angiotensine I	42
IV) L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et l'angiotensine II	42
V) L'aminopeptidase A et l'angiotensine III	43
VI) L'aminopeptidase N et l'angiotensine IV.....	43
VII) Les voies angiotensinergiques	44
VIII) Les récepteurs des angiotensines II, III et IV	45
Chapitre 4 : L'aminopeptidase A, cible thérapeutique potentielle	46
I) Recherche du peptide effecteur du SRA cérébral	46
1) Régulation de l'activité aminopeptidase A dans le cerveau de modèles expérimentaux d'hypertension	46
a) Le rat spontanément hypertendu (SHR), un modèle d'origine génétique.....	46
b) Le rat DOCA-Sel, un modèle provoqué.....	46
2) L'angiotensine III : peptide effecteur du système rénine-angiotensine cérébral	47
a) Identification des voies métaboliques de l'Ang II et de l'Ang III cérébrales.....	47
b) Rôles respectifs des Ang II et Ang III cérébrales dans le contrôle cérébral de la pression artérielle	49
II) Développement d'une prodrogue de l'EC33 actif par voie orale.....	52
1) Le RB150	52
2) Mode d'action du RB150	52
3) Normalisation de la pression artérielle chez le rat hypertendu, preuve du concept du RB150	52
III) Etudes cliniques du RB150/QGC001.....	53
Chapitre 5 : Développer de nouveaux inhibiteurs de l'aminopeptidase A par de nouvelles études structure-fonction	55
I) Introduction.....	55
II) Etudes structurales sur des aminopeptidases monozincs.....	56
1) L'aminopeptidase B	56
a) Généralités	56
b) Modélisation de l'APB	57
c) Etudes structure-fonction.....	58
2) L'aminopeptidase N.....	61
a) Généralités	61
b) Structure cristallographique et études structure-fonction	62
3) L'aminopeptidase A.....	65

a)	La structure cristallographique de l'aminopeptidase A humaine	65
b)	Etudes structure-fonction par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée	66
III)	Objectifs de thèse	70
IV)	Etudes structure-fonction sur le site actif de l'APA.....	71
1)	Article 1 : Etude du rôle de l'arginine 878 de l'APA de souris dans la spécificité de substrat de l'enzyme (En révision)	71
a)	Introduction	71
b)	Discussion	73
2)	Article 2 : Etude du rôle potentiel des résidus Arg-360 et Arg-378 dans le sous-site S2' de l'APA de souris (En préparation)	77
a)	Introduction	77
b)	Discussion	79
	Conclusions et perspectives	82
	Partie 2 : Le récepteur de l'apéline, cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et des désordres hydriques	85
	Chapitre 1 : Le récepteur de l'apéline, un récepteur couplé aux protéines G	85
I)	Structure et classification	85
II)	Mode d'action des RCPGs.....	88
1)	Les ligands.....	88
a)	Les ligands orthostériques : Notions d'agonisme et d'antagonisme	89
b)	Les ligands allostériques	90
c)	Les ligands biaisés.....	90
2)	Les protéines G hétérotrimériques	92
a)	La sous-unité G α	93
b)	La sous-unité G $\beta\gamma$	95
3)	La β -arrestine et l'internalisation des RCPGs	96
	Chapitre 2 : l'apéline et son récepteur	99
I)	Découverte et désorphanisation du récepteur de l'apéline	99
1)	Clonage et structure du récepteur de l'apéline	99
2)	L'apéline : ligand endogène du récepteur APJ, découverte et caractéristiques	100
II)	L'apéline et son récepteur : propriétés pharmacologiques	102
1)	Caractérisation de l'interaction apéline/récepteur	102
a)	Affinité de l'apéline pour son récepteur	102
b)	Etudes structure-activité de l'apéline.....	102
2)	Signalisation du récepteur de l'apéline	103
a)	Couplage du récepteur de l'apéline	103
b)	Modulation des concentrations de calcium intracellulaire par l'apéline	104
c)	L'activation de kinases.....	104

d) L'internalisation du récepteur de l'apéline	105
e) Recyclage du récepteur de l'apéline	107
f) L'hétérodimérisation du récepteur	107
Chapitre 3 : le système apélinergique	108
I) Distribution de l'apéline et de son récepteur	108
1) Dans le cerveau.....	108
2) Dans le rein.....	111
3) Dans le cœur et les artères.....	111
II) Rôle dans le maintien de l'équilibre hydrique.....	112
1) Effets centraux de l'apéline sur l'activité des neurones à AVP, sur la sécrétion d'AVP et sur la diurèse	112
2) Effets de l'apéline et de l'AVP sur le maintien de l'équilibre hydrique au niveau du rein	113
3) Régulation opposée de l'apéline et de l'AVP lors de la déshydratation	116
a) Effets de la déshydratation chez le rat	116
b) Effets de la déshydratation chez l'homme	117
4) Effets de l'âge sur la régulation croisée entre l'apéline et l'AVP.....	117
III) Rôle dans la fonction cardiaque	118
1) Effets de l'apéline sur les vaisseaux	118
2) Effets sur la pression artérielle	120
3) Effets sur la contractilité cardiaque.....	121
Chapitre 4 : Le récepteur de l'apéline, cible thérapeutique potentielle	124
I) Implication dans les désordres hydriques	124
II) Implications dans les pathologies cardiovasculaires	126
Chapitre 5 : Caractériser l'interaction apéline/récepteur pour développer une molécule d'intérêt ...	128
I) Molécules non-peptidiques ou pseudopeptidiques.....	128
II) Analogues de l'apéline métaboliquement stables	132
1) Analogues de l'apéline-12	132
2) Analogues de l'apéline-36	132
3) Analogues de l'apéline-13 et de pE13F	133
III) Objectifs de thèse	138
IV) Article 1 : Etude du mode de liaison de pE13F à l'ApélineR.....	139
1) Introduction.....	139
2) Discussion	141
V) Article 2 : Développement d'analogues de l'apéline métaboliquement stables	145
1) Introduction.....	145
2) Discussion	147
Conclusions et perspectives	150

Annexe: Revue "Role of the vasopressin/apelin balance and potential use of metabolically stable apelin analogs in water metabolism disorders" (En revision)	153
Bibliographie.....	155

Liste des abréviations

3D : Tridimensionnel

aaNA : aminoacyl- β -naphthylamide

AC : Adénylate cyclase

ADN : Acide désoxyribonucléique

Aib : Acide aminoisobutyrique

Ala: Alanine

AlaNA: L- α -alanyl- β -naphthylamide

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

Ang : Angiotensine

APA : Aminopeptidase A

ApélineR : Récepteur de l'apéline

APB : Aminopeptidase B

APN : Aminopeptidase N

AQP2 : Aquaporine de type 2

Arg : Arginine

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

Asn : Asparagine

Asp : Aspartate

AspSH : Acide 3-amino-3-mercaptopropanoïque

AT1 : Récepteur des angiotensines II/III de type 1

ATP : Adénosine triphosphate

Akt : Protéine kinase B

AVP : Arginine-Vasopressine, Hormone antidiurétique

BHE : Barrière hémato-encéphalique

Bpa : Benzoïlphényle

BRET : Bioluminescence resonance energy transfer

CCK1R : Récepteur à la cholécystokinine 8 de type 1

CHO : Cellules d'ovaires de hamster chinois

COS : Cellules rénales de singe africain

Cys : Cystéine
DAG : diacyglycérol
DI : Diabète insipide
DIC : Diabète insipide central
DIN : Diabète insipide néphrogénique
DOCA : Acétate de désoycorticostérone
eGFP : Enhanced green fluorescent protein
EC27 : 2-aminopentane-1,5-dithiol
EC33 : (S) 3-amino-4-mercaptobutanesulfonate
EC₅₀ : Concentration efficace 50
ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECA2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
ECL : Boucle extracellulaire
EDTA : Acide édétique
ERK ½ : Kinase de régulation des signaux extracellulaires (ERK 1 et 2)
FRET: Fluorescence resolved energy transfer
FSH: Récepteur de l'hormone folliculostimulante
FSK: Forskoline
GDP: Guanosine diphosphate
Gln: Glutamine
Glu: Glutamate
GluNA: L-α-glutamyl-β-naphthylamide
GluSH : Acide 4-amino-4-mercaptobutanoïque
Gly : Glycine
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GRK: G protein regulated kinase
GTP: Guanosine triphosphate
HDAC : Histones déacétylase de classe II
HEK : Cellules embryonnaires rénales humaines
His : Histidine
i.c.v : intracérébroventriculaire
i.p : intrapéritonéale

i.v : intraveineuse

ICL : Boucle intracellulaire

IP₃ : Inotisol-1,4,5-triphosphate

IP₃R : Récepteur des IP₃

Ile : Isoleucine

IRAP : Enzyme insulin-regulated aminopeptidase

Leu : Leucine

LG : Récepteur de l'hormone luteinizing hormone

LH : Récepteur de l'hormone lutéinisante

LTA4H : Leukotriène A4-hydrolase

Lys : Lysine

LysNA : L- α -lysine- β -naphthylamide

LysSH: 1,5-diaminopentane-1-thiol

mTor: Mammalian Target of rapamycin

MEF2: Myocyte Enhancer Factor 2

Met: Méthionine

MetSH/PC18: 2-amino-4-(methylthio) butane-1-thiol

NCX : Echangeur Na⁺/Ca²⁺

NCX* : Echangeur Na⁺/Ca²⁺ inverse

NEP : Endopeptidase neutre 24.11

NHE : l'échangeur Na⁺/H⁺

NI929 : Acide (3S,4S) -3-amino-4-mercapto-6-phényl-hexane-1-sulfonique

Nle : Norleucine

NO : Oxyde nitrique

NTera2 : Cellules de tératomes carcinomiques humains

NTS : Noyau du tractus solitaire

OVLT : Organe Vasculaire de la *lamina terminalis*

PEG : Polyéthylène glycol

Phe: Phénylalanine

PheSH: 1-amino-2-phenylethane-1-thiol

PI₃K : Phosphoinositide 3 kinase de type 1a

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PP : Polydipsie primaire

Pro : Proline

PVN : Noyau paraventriculaire

RBL-2H3 : Cellules dérivées de basophiles

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RVLM : Médulla rostroventrolatérale

RyR : Récepteur à la ryanodine

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide complémenté en sodiumdodécylsulfate

Ser : Sérine

SFO : Organe subfornical

SHR : rat spontanément hypertendu

SIADH : Syndrome de sécrétion inapproprié d'AVP

SON : Noyau supraoptique

SRA : système rénine-angiotensine

Thr : Thréonine

TLN : thermolysine

TM : Domaine transmembranaire

Trp : Tryptophane

TSH : Récepteur de l'hormone thyroestimuline

Tyr : Tyrosine

Tyr(O)Bn : Tyrosine-O-benzyle

Val: Valine

WKY: Wistar Kyoto

Partie 1 : L'aminopeptidase A cérébrale, une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'hypertension

Chapitre 1 : L'aminopeptidase A, une aminopeptidase monozinc membranaire

Une aminopeptidase est une enzyme qui hydrolyse un ou plusieurs résidus situés en position N-terminale des peptides ou des protéines. Selon le nombre de résidus hydrolysés elle est dénommée aminopeptidase (1 résidu), dipeptidyl- aminopeptidase (2 résidus) ou tripeptidyl- aminopeptidase (3 résidus).

Les peptidases monozincs sont caractérisées par la présence, au sein de leur site actif, d'un motif de résidus contenant un glutamate (Glu) permettant la liaison d'un atome de zinc. Ce Glu et l'atome de zinc jouent un rôle clé dans l'acte catalytique de cette famille d'enzymes (**Figure 1**).

I) Introduction : Les peptidases monozincs

Le clonage de nombreuses métallopeptidases à zinc comme la thermolysine (Titani et al., 1972), l'aminopeptidase N (Bally et al., 1984), la stromélysine (Whitham et al., 1986) ou encore l'endopeptidase neutre (Isobe and Okuyama, 1985; Devault et al., 1987) ont mis en évidence la présence de séquences consensus à ces enzymes permettant d'établir les premières classifications de cette famille de protéines. La découverte de la structure cristallographique de plusieurs peptidases ont montré des homologies structurales entre ces enzymes et permis d'affiner la classification (Matthews et al., 1972, Matthews et al., 1974; Holmes et al., 1981; Jongeneel et al., 1989; Vallee et al., 1990; Rawlings et al., 1993; Bode et al., 1993; Gomis-Rüth et al., 1993; Baumann, 1994; Blundell, 1994; Rawlings et al., 1995).

L'analyse des alignements de séquences protéiques et des structures tridimensionnelles de ces enzymes a permis d'identifier différents motifs de liaison du zinc ainsi que des acides aminés liant également le zinc et situés à une distance spécifique des motifs. Il a été établi une classification des peptidases monozincs (Hooper, 1994) regroupant 4 grandes familles différenciées par leur motif de liaison du zinc, séparées en sous-familles selon la nature de l'acide aminé 3^{ème} ligand du zinc et de sa distance par rapport au motif de liaisons :

- Les « zincins » possédant dans leur séquence en acide aminés le motif de liaison du zinc HEXXH.
- Les « inverzincins » dont le motif de liaison du zinc est HXXEH.
- Les « carboxypeptidases » dont le motif de liaison du zinc est HXXE.
- Les « DD- carboxypeptidases » dont le motif de liaison du zinc est HXH.

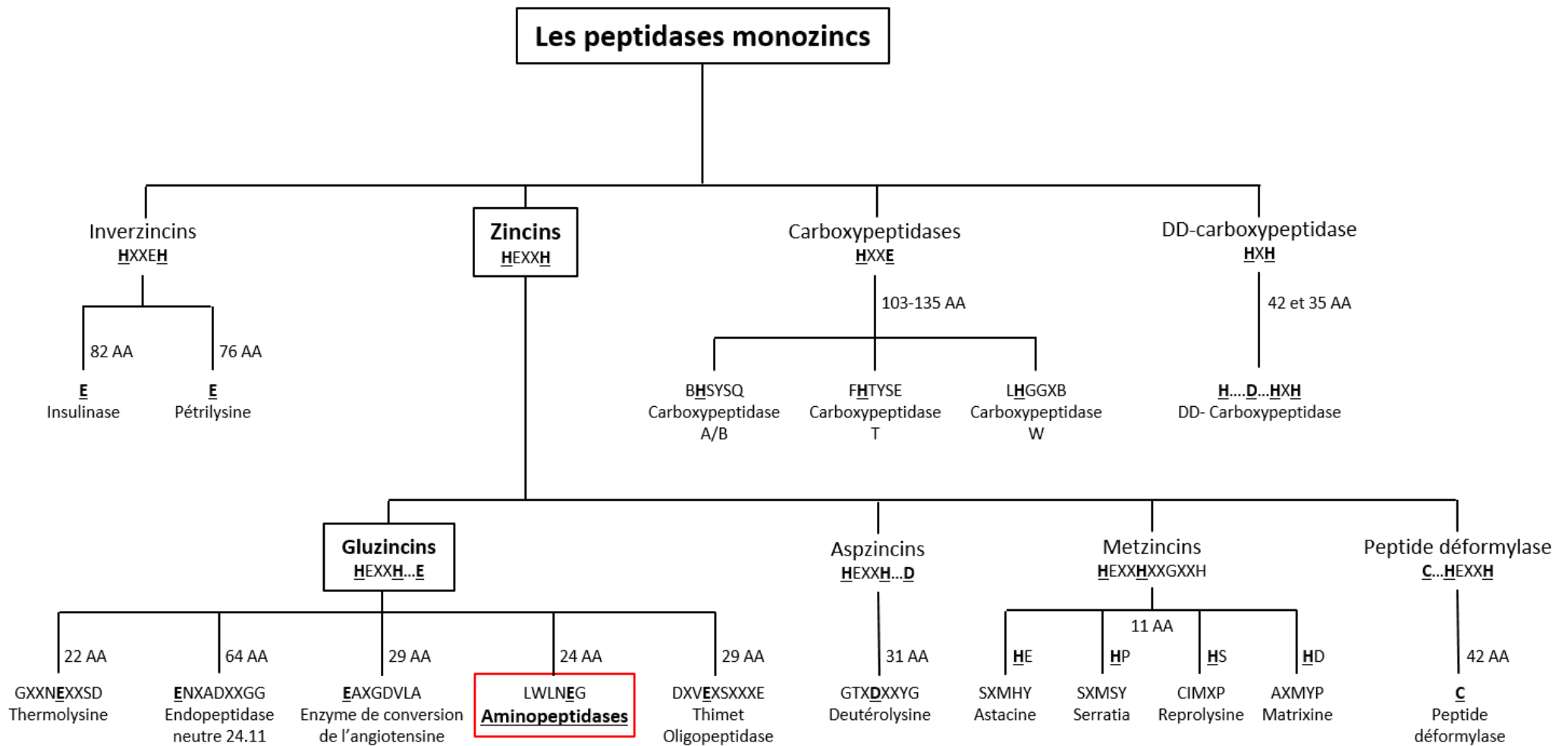


Figure 1 : Classification des peptidases adaptée Hooper et coll. (Hooper, 1994).

Les résidus représentés en caractères gras et soulignés constituent les ligands du zinc. «X aa» représente la distance en acides aminés entre le premier ligand du zinc situé dans un motif consensus et le troisième ligand du zinc.

II) La famille des zincins

Cette famille est caractérisée par le motif de liaison du zinc HEXXH. Elle est divisée en 4 sous-groupes que sont : les gluzincins, les metzincins, les aspzincins et la peptide déformylase.

1) Les gluzincins

Le troisième ligand du zinc des gluzincins est un Glu situé en aval du motif HEXXH. La distance variable séparant ce Glu du motif HEXXH a permis de diviser les gluzincins en 4 sous-familles que sont : La sous-famille de la thermolysine, celle de l'endopeptidase neutre, celle de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et celle des aminopeptidases.

a) La sous-famille de la thermolysine

La thermolysine (TLN, EC 3.4.24.27) (Matthews et al., 1972b), la pseudolysine (EC 3.4.24.26, *Pseudomonas Elastate*) (McKay et al., 1992), la bacillolysine (EC 3.4.24.28) (Frigerio et al., 1997) et d'autres métallopeptidases de cette famille possèdent deux régions fortement conservées impliquées dans la liaison de l'atome de zinc. L'atome de zinc de la thermolysine, par exemple, est tétracoordiné par les deux histidines (His) du motif HEXXH (His-142 et His-146), par une molécule d'eau ainsi que par un Glu (Glu-166), situé dans le motif GXXNEXXSD, 20 acides aminés en aval du motif HEXXH. Au sein de ce motif, un aspartate (Asp-170) permet la stabilisation de l'His-142 (Colman et al., 1972; Matthews et al., 1972b, 1972a; Christianson and Alexander, 1990). Ainsi appartiennent à cette famille, toute peptidase monozinc présentant un motif HEXXH et un motif GXXNEXXSD dont le Glu est situé à environ 22 acides aminés en aval du motif HEXXH.

D'un point de vue structural, toutes ces enzymes présentent deux domaines, un N-terminal constitué d'hélices- α et de feuillets- β et un domaine C-terminal composé de 5 hélices- α . Domaines N et C-terminaux forment une interface où se situe le site actif.

b) La sous-famille de l'endopeptidase neutre

Cette sous-famille regroupe des enzymes comme l'endopeptidase neutre (EC 3.4.24.11) (Oefner et al., 2000) ou l'endothéline (EC 3.4.24.71) (Schulz et al., 2009). Le Glu, troisième ligand du zinc, se trouve à environ 64 acides aminés en aval du motif HEXXH au sein de la séquence consensus ENXADXGG. L'Asp de ce motif est également impliqué dans l'acte catalytique via un relais de charge avec une des His du motif HEXXH (Le Moual et al., 1991, 1994; Shimada et al., 1996).

D'un point de vue structural, ces enzymes présentent deux domaines, un N-terminal constitué d'hélices- α , un C-terminal constitué d'hélices- α et d'un feuillet- β . L'interface formée par ces deux domaines contient le site actif.

c) La sous-famille de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA, EC 3.4.15.1) (Kim et al., 2003; Natesh et al., 2003; Watermeyer et al., 2006) comme l'enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 (ECA2, EC 3.4.17.23) (Donoghue et al., 2000; Towler et al., 2004) ainsi que d'autres enzymes de cette famille, présentent un Glu, troisième ligand du zinc, à environ 29 acides aminés en aval du motif HEXXH au sein de la séquence consensus GFHEAXGD où se trouve également l'Asp coordonnant la première His du motif HEXXH (Williams et al., 1994).

D'un point de vue structural, les enzymes de cette famille présentent deux domaines, un N-terminal constitué d'hélices- α et de 3 feuillets- β , un C-terminal constitué d'hélices- α et de 2 feuillets- β . L'interface formée par ces deux domaines contient le site actif.

d) La sous-famille des aminopeptidases

Cette sous-famille regroupe uniquement les aminopeptidases ne possédant qu'un seul atome de zinc par monomère d'enzymes. C'est le cas de la leukotriène A₄-hydrolase (EC 3.3.2.6) (Thunnissen et al., 2001), l'aminopeptidase A (APA, EC 3.4.11.7) (Yang et al., 2013) ou encore l'aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2) (Wong et al., 2012), l'aminopeptidase B (APB, EC 3.4.11.6) (Foulon et al., 1999). Le troisième ligand du zinc se trouve dans la séquence consensus LWLNEG (Medina et al., 1991; Vazeux et al., 1996) à environ 24 acides aminés en aval du motif HEXXH.

L'organisation structurale de cette sous-famille d'enzyme sera détaillée ci-après mais de façon résumée, cette famille de protéines présente deux domaines, un N-terminal constitué d'hélices- α et feuillets- β , un C-terminal constitué principalement d'hélices- α . Là encore, l'interface contient le site actif.

e) La sous-famille de la Thimet oligopeptidase

Cette sous-famille contient des enzymes comme la Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) (Ray et al., 2004) ou la neurolysinase (EC 3.4.24.16) (Brown et al., 2001). Le Glu 3^{ème} ligand du zinc se trouve au centre du motif DXVEXPSXXE et se situe à environ 29 résidus en aval du motif HEXXH.

D'un point de vue structural, les enzymes de cette famille présentent deux domaines avec le site actif à l'interface. Un domaine N-terminal constitué d'hélices- α et d'un petit feuillet- β , un C-terminal constitué d'hélices- α et d'un important feuillet- β .

2) Les metzincins

Les metzincins sont l'une des plus grandes familles de métallopeptidases. Cette famille d'endopeptidases est caractérisée par le motif de liaison du zinc HEXXHXXGXXH comportant également le 3^{ème} ligand du zinc situé à 11 acides aminés en aval du motif HEXXH. La glycine (Gly) de ce motif induit une structure en épingle à cheveux, permettant à la 3^{ème} His de lier le zinc. Cette famille est subdivisée en 4 sous-familles selon le résidu directement en aval du 3^{ème} ligand du zinc et par la présence d'un motif spécifique à chaque sous-famille. Ce motif, en aval de la séquence HEXXH, contient une méthionine induisant la formation d'une boucle appelée « methionine-turn » qui donne son nom à cette famille de zincins. On retrouve ainsi la sous-famille des astacines (motif SBMHY) (Gomis-Rüth et al., 1993), la sous-famille des Serratia (motif SVMSY) (Hamada et al., 1996), la sous-famille de la reprotlysine (motif CIMXP) (Cirilli et al., 1997) comportant les protéines de type « A Disintegrin-like And Metalloproteinase Domains » (ADAMs) et la sous-famille des Matrixin ou « matrix metalloproteases » (MMPs) (motif ABMYP) (McKay et al., 1992).

3) Les aspzincins

La deutérolysine (EC 3.4.29.34, neural proteinase II) (Bogdanović et al., 2016) ou la peptidyl-Lys métalloendopeptidase (EC 3.4.24.20, MEP) (Hori et al., 2001) sont caractérisées par la présence d'un Asp qui joue le rôle de 3^{ème} ligand du zinc et se trouve à environ 31 résidus en aval du motif HEXXH, dans la séquence consensus GTXDXXYG.

4) La peptide déformylase

Cette famille de protéines bactériennes n'appartient pas au groupe des peptidases puisqu'elle hydrolyse la liaison entre le groupement formyle (CH=O) et la méthionine N-terminale des peptides. Néanmoins, la peptide déformylase (EC 3.5.1.88) (Meinzel et al., 1996; Robien et al., 2004) ainsi que les autres protéines de cette famille sont des hydrolases monozincs possédant la séquence spécifique aux zincins HEXXH. C'est pourquoi on les classe au sein de cette famille. Au sein de cette sous-famille, le 3^{ème} ligand du zinc est une cystéine (Cys) et se situe, cette fois-ci, à 42 résidus en amont du motif HEXXH (Meinzel et al., 1995).

III) La famille des inverzincins

Cette famille se caractérise par la séquence consensus de liaison du zinc HXXEH (inverse de HEXXH) et par son 3^{ème} ligand du zinc, un Glu, situé en aval de ce motif. Les inverzincins sont subdivisées en deux sous-familles, celle des insulinasés et celle de la pétrilysine. Les insulinasés contiennent, notamment, l'enzyme de dégradation de l'insuline (EC 3.4.24.56, EDI, insulysine) (Malito et al., 2008) et sont caractérisées par un Glu situé à 82 résidus en aval du motif HXXEH. La sous-famille de la pétrilysine contient, notamment, la « Coenzyme PQQ synthesis protein F » (PqqF, EC 3.4.24.-) (Wei et al., 2016) impliquée dans la voie de biosynthèse de la pyrroquinolone quinone et dont le Glu est situé à 76 résidus en aval du motif HXXEH.

IV) La famille des carboxypeptidases

Les deux premiers ligands du zinc de cette famille sont une His et un Glu situés dans la séquence consensus HXXE. Le troisième ligand du zinc est une His située entre 103 et 135 résidus en aval du motif HXXE au sein de séquences consensus qui ont permis de subdiviser cette famille en 3 sous-familles. La première contient notamment les carboxypeptidases A (EC 3.4.17.1) (Fernández et al., 2010b) et B (EC 3.4.17.2) (Fernández et al., 2010a) et le 3^{ème} ligand du zinc se trouve au sein du motif BHSYSQ. La seconde contient notamment la carboxypeptidase T (EC 3.4.17.18) (Timofeev et al., 2013) et le 3^{ème} ligand du zinc se trouve au sein du motif FHTYSE. La dernière contient notamment la carboxypeptidase M (EC 3.4.17.12) (Reverter et al., 2004) et possède le 3^{ème} ligand du zinc au sein du motif LHGGXB.

V) La famille des DD-carboxypeptidase

Cette famille contient notamment la D-alanyl-D-alanine-cleaving carboxypeptidase (DD-carboxypeptidase, EC 3.4.17.14) (Vallee and Auld, 1990; Silvaggi et al., 2003) qui possède la séquence consensus HXH, où seule une de ces His lie le zinc, une seconde His liant le zinc est située 42 résidus en amont de ce motif et un Asp est le 3^{ème} ligand du zinc, situé 35 acides aminés en amont du motif HXH.

Chapitre 2 : L'aminopeptidase A

I) Historique

L'histoire de l'aminopeptidase A (APA) commence par la découverte en 1961 d'une activité hydrolytique du substrat synthétique L- α -glutamyl- β -naphtylamide (GluNA) dans les îlots de Langerhans et dans l'épithélium interlobulaire pancréatique du cochon d'Inde, stimulée par le calcium et inhibée par l'acide édétique (EDTA) ainsi que les formes ioniques des métaux de transition (Glenner and Folk, 1961). Par la suite, l'enzyme responsable de cette activité a été partiellement purifiée à partir de microsomes de reins de rats (Glenner et al., 1962). Cette enzyme présentait un caractère aminopeptidase avec une spécificité pour les substrats ayant une extrémité N-terminale acide (Asp et Glu). Ce nouveau type d'aminopeptidase a été nommée aminopeptidase A (A pour acide) et classifiée EC 3.4.11.7 dans la nomenclature internationale des enzymes IUBM (EC 3 pour hydrolase, 4 pour liaison peptidique et 11 pour aminopeptidase). Elle est aussi connue sous le nom de glutamyl aminopeptidase (Petrović and Vitale, 1990). L'APA existe sous forme membranaire dans de nombreux organes dont le cerveau (Lojda and Gossrau, 1980; Song et al., 1993) mais aussi sous forme soluble dans le sérum humain (Nagatsu et al., 1970). Il a été montré *in vitro* sur des membranes de cerveau ou de rein que l'APA hydrolyse l'Asp N-terminal de l'angiotensine II (Ang II, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) donnant naissance à l'angiotensine III (Ang III, Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Nagatsu et al., 1970; Kugler, 1982). Par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA ou de l'APN *in vivo*, il a été confirmé le rôle physiologique de l'APA dans la formation de l'Ang III cérébrale à partir de l'Ang II (Zini et al., 1996).

II) Clonage et structure du gène

Le clonage de l'antigène de différenciation des lymphocytes pré-B, BP-163, a révélé, du fait de son homologie de séquence avec l'aminopeptidase N, qu'il s'agissait de l'aminopeptidase A (Wu et al., 1990; Li et al., 1993). L'APA a été clonée chez de nombreux mammifères dont la souris (Wu et al., 1990), l'Homme (antigène de différenciation rénal GP-160) (Li et al., 1993; Nanus et al., 1993), le rat (Trojanovskaya et al., 2000) ou le porc (Hesp and Hooper, 1997).

La structure primaire de l'APA suggère que cette enzyme est une protéine intrinsèque de type II composée d'une partie N-terminale intracellulaire, d'un domaine transmembranaire en hélice α et d'une partie globulaire extracellulaire très large qui contient le motif de liaison au zinc HEXXH, caractéristique de la famille des métalloprotéases à zinc : zincins (Jongeneel et al., 1989; Hooper,

1994). L'APA de souris (945 acides aminés) partage 85 % d'identité de séquence protéique avec l'APA humaine, 93% avec l'APA de rat et 77% avec l'APA de porc. Son domaine cytoplasmique est formé de 17 résidus contenant 2 sites potentiels de phosphorylation ; le domaine transmembranaire se compose de 22 acides aminés et le domaine extracellulaire est formé de 906 résidus comprenant le site actif, incorporant le site de liaison du zinc, 9 sites potentiels de N-glycosylation et 1 site potentiel de sulfatation (Wu et al., 1990) (**Figure 2**).

```

1-MNFAEEEEPSKKYCIKGNHVAIICGVVAVGLIVGLSVGLTRSC EQDTTPA- 50
PSQPPPEASTALPPQDQNVCPDSEDESGEWNFRLPDFINPVHYDLEVKA- 100
LMEEDRYTGIVTISVNL SKPTRDLWLHIRETKITKLPELRRPSGEQVPIR- 150
RCFEYKKQ EYVVIQAAEDLAATSGDSVYRLTMEFKGWLNGSLVGFYKTTY- 200
MEDGQIRSI AATDHEPTDARKSFPCFDEPNKKSTYSISIIHPKEYSALS N- 250
MPEEKSEMVDNWKKTTFVKSVPMSTYLVCFAVHRFTAIERKSRSGKPLK- 300
VYVQPNQKETAEYAANITQAVFDYFEDYFAMEYALPKLDKIAIPDFGTGA- 350
MENWGLV TYRETNLLYDPLLSASSNQQRVASVVAHELVH QWFGNTVTMDW- 400
WDDLWLN EGFASFF EFLGVNHAEKDWQMLSQVLL EDVFPVQEDDSL MSSH- 450
PVVTVSTPAEITSVFDGISYSGASILRMLQDWITPEKFQKGCQIYLKK- 500
FQFANA KTSDFWDSLQEASNLPVKEVMDTWT SQMGYPVTVSGRQNITQK- 550
RFL LSKADPSQPPSELGYTNIPVRWADNDNSRITVYNRLDKGGITLNA- 600
NLSGDAFLKINPDHIGFYRVNYEGGTWDWIAEALSSNHTRFSAADRSSF I- 650
DDAFALARAQLLN YKIALNL TMYLKSEEDFLPW ERVISSVSYIISM FEDD- 700
RELYPMIETYFQGQVKPVADLLGWQDTGSHITKLLRASILGFACKMGDRE- 750
ALGNASQLFDSWLKGSASIPVNLRLLVYRYGMQNSGNEAAWNYTLEQYQK- 800
TSLAQEKEKLLYGLASVKDKLLARYLEMLKDPNI IKTQDVFTVIRYISY- 850
NSYGKTMAWNWIQLNWDYLVSRFTINDRYLGRIVTIAEPFNTELQLWQM Q- 900
SFFAKYPNAGAGAKPREQVLETVKNNIEWLVNVRQSIREWFASLE- 945

```

Figure 2 : Séquence protéique de l'APA de souris.

La partie intracellulaire est surlignée en cyan, le domaine transmembranaire est surligné en rouge. La séquence correspondant au domaine extracellulaire est surlignée en vert. Les sites potentiels de phosphorylation sont surlignés en gris, le site potentiel de sulfatation est surligné en rouge, et les sites potentiels de N-glycosylation sont surlignés en jaune. Le motif consensus de liaison du zinc et son troisième ligand sont surlignés en rose et en gras.

L'APA de souris est codée par un gène appelé ENPEP (quelle que soit l'espèce) situé sur le chromosome 3, région chromosomique homologue à la région 4q25 humaine. Il est long de plus de 110 kb et est divisé en 20 exons séparés par des introns de tailles diverses allant de 100 pb jusqu'à 10 kb. Les exons sont de petites tailles, hormis le premier et le dernier, compris entre 56 et 171 pb. Le premier exon contient la région 5' non codante, la séquence codant le domaine N-terminal, le domaine transmembranaire ainsi qu'une portion du domaine intracellulaire. Les autres exons codent pour le reste du domaine C-terminal de l'APA avec, notamment, les exons 5 et 6 qui possèdent la séquence codant pour le motif de liaison du zinc, caractéristique des zincins (Wang et al., 1996; Li et al., 1997) (**Figure 3**).

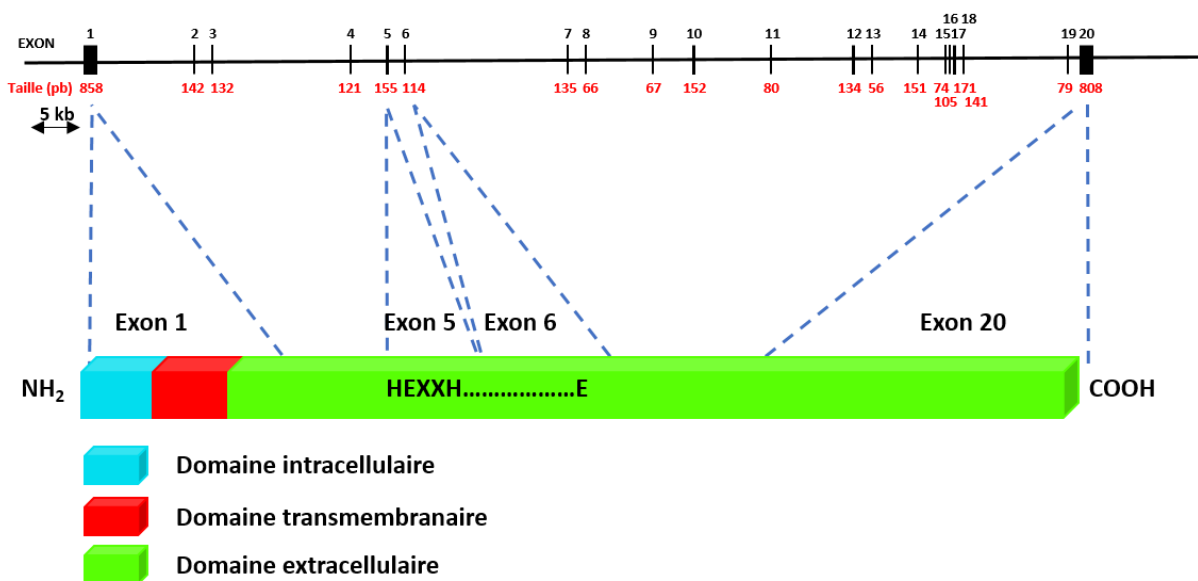


Figure 3 : organisation du gène de l'APA de souris (Wang et al., 1996)

Des études de recherche de polymorphismes ont montré qu'il existait chez des patients atteints de glomérulonéphrite, 4 polymorphismes entraînant des mutations non-conservatives : I32V (96A>G), R159S (477G>T), E172Q (516G>C) et Y544F (1632A>T). A ces polymorphismes spécifiquement retrouvés dans cette pathologie, s'ajoutent les polymorphismes détectés lors du séquençage du gène ENPEP chez l'Homme : Q213R (639A>G), V218A (654A>C), W413C (1239G>T) et S861R(2583C>G). Ils ont également montré l'existence d'allèles hétérozygotes avec sur l'une d'elles, la présence de mutations non-conservatives : Q435E (1305C>G), D622N (1866G>A), A676T (2028G>A), E687D (2061(G>T), E686K (2058G>A), K923I (2769A>T) et R925G (2775A>G). Par mutagenèse dirigée, il a été montré que les variants R159S et A676T présentaient une activité d'hydrolyse de, respectivement, 33% et 27% plus élevée que celle de l'APA sauvage. Les variants E172Q, V218A, W413X, Q435E, E686K, E687D et R925G présentaient une diminution de l'activité d'hydrolyse par rapport à l'APA sauvage de

respectivement 56%, 14%, 69%, 30%, 61%, 71% et 23%. Le variant E687K ne présentait aucune activité alors que les autres mutations n'avaient pas d'effet sur l'activité de l'enzyme comparée à l'APA sauvage (Tonna et al., 2008).

Enfin, il a été montré qu'il existait une mutation non-sens rare du Trp-317 de l'APA humaine induisant la production d'une protéine tronquée et inactive (Surendran et al., 2016).

III) Organisation structurale de l'APA

1) Structure générale

a) Propriétés physiques

Visible en microscopie électronique (Danielsen et al., 1980), l'APA se présente sous forme dimérique chez l'Homme, le rongeur et le porc (Benajiba and Maroux, 1980; Herzig et al., 1992; L. Song et al., 1994) alors qu'elle est sous forme monomérique chez le lapin (Gorvel et al., 1980). Une fois purifiée, le poids de la forme dimérique de l'APA varie, selon les espèces, de 247 à 300 kDa (Benajiba and Maroux, 1980; Danielsen et al., 1980; Tobe et al., 1980; Lalu et al., 1984; Cooper et al., 1986; Yamada et al., 1988). Après séparation par SDS-PAGE, le poids moléculaire de sa forme monomérique varie, selon les espèces, de 120 à 170 kDa (Benajiba and Maroux, 1980; Gorvel et al., 1980; Cooper et al., 1986; Song et al., 1993). L'APA est sensible aux détergents et à la protéolyse. Chez le porc, elle est hydrolysée par la trypsine entre la Lys-42 et l'Asp-43 (Danielsen et al., 1980). Les Cys-39 de chaque monomères de l'APA porcine permettent l'établissement du dimère d'APA via un pont disulfure (Ofner and Hooper, 2002) (**Figure 4**).

L'APA est une protéine membranaire, néanmoins, des formes solubles ont été retrouvées dans le sérum (Nagatsu et al., 1970; Danielsen et al., 1980; Lalu et al., 1984, 1985; Okuyama et al., 1991) et l'urine (Scherberich et al., 1990). Ces formes d'APAs, une fois purifiées, possèdent les mêmes propriétés physiques et enzymatiques que les formes purifiées d'APA membranaires. Le fait que le gène de l'APA soit sur un seul chromosome et que domaines cytoplasmiques et transmembranaires soient codés par un seul et même exon exclue la possibilité d'un épissage alternatif à ce niveau (Wang et al., 1996). Donc l'origine de la forme soluble de l'APA s'explique par un clivage protéolytique de l'APA membranaire dont les mécanismes restent à découvrir.

2) Spécificité de substrat

a) Substrats naturels

Tout d'abord, il a été démontré *in vitro* que APA hydrolyse spécifiquement les résidus N-terminaux acides de l'Ang I (Bausback et al., 1988), l'Ang II (Nagatsu et al., 1970) et de la cholecystokinine-8 (Migaud et al., 1996). L'affinité de l'APA pour l'Ang I est de 40 μM (Bausback et al., 1988), comprise entre 35 et 198 μM pour l'Ang II (Kugler, 1982; Ahmad and Ward, 1990; Iturrioz et al., 2001) et de 140 μM pour la cholecystokinine-8 (Migaud et al., 1996). Enfin, il a démontré *in vivo* que seules l'Ang II et la cholecystokinine-8 cérébrale sont hydrolysées par l'APA (Migaud et al., 1996; Zini et al., 1996).

b) Substrats synthétiques

L'utilisation de substrats synthétiques aminoacyl- β -naphtylamide (aaNA) a permis d'établir la spécificité d'hydrolyse du résidu P1 par les aminopeptidases. L'APA hydrolyse de façon spécifique et sélective, les substrats synthétiques possédant une chaîne latérale acide (Danielsen et al., 1980; Lalu et al., 1986; Yamada et al., 1988) et que cette préférence est augmentée par le calcium (Danielsen et al., 1980). En effet, en se logeant au niveau du sous-site S1 de l'enzyme, le calcium (à partir de 1 mM) va potentialiser l'hydrolyse des substrats acides AspNA et GluNA et pénaliser celle des substrats neutres et basiques (Glenner et al., 1962; Danielsen et al., 1980; Lalu et al., 1986; Yamada et al., 1988). En présence de calcium, le K_m de l'APA pour le GluNA varie, selon les auteurs, de 62 à 198 μM (Danielsen et al., 1980; Lojda and Gossrau, 1980; Kugler, 1982; Lalu et al., 1984; Claperon et al., 2009) et son activité spécifique (k_{cat}) varie de 22 à 40 μmol de GluNA hydrolysé/min/mg d'enzyme (Benajiba and Maroux, 1980; Gorvel et al., 1980; Tobe et al., 1980; Yamada et al., 1988; Herzig et al., 1992; Iturrioz et al., 2000)(Tableau I).

Taux d'hydrolyse relative de différents substrats par l'APA (% GluNA)				
Substrats	Yamada et al., 1988	Lalu et al., 1986	Danielsen et al., 1980	
	6 mM Ca ²⁺	6 mM Ca ²⁺	Ø Ca ²⁺	1 mM Ca ²⁺
AlaNA	4	4	1,4	0,46
ArgNA	3	4	4,1	0,78
AsnNA		2		
AspNA	47	21	23	
CysNA	1	0		
GlnNA		3		
GluNA	100	100	100	440
γ-GluNA		0	0	
GlyNA		2		
HisNA		0		
HypNA		0		
IleNA		0		
LeuNA	1	0	0,38	0,12
LysNA	2	3	1,8	0,54
MetNA		5		
OrnNA		0		
PheNA	1	0		
ProNA		0		
SerNA		0		
ThrNA		0		
TrpNA		0		
TyrNA	2	0		
ValNA		0		

Tableau I : Comparaison de l'hydrolyse relative de différents substrats synthétiques par l'APA par rapport au substrat synthétique GluNA (Danielsen et al., 1980; Lalu et al., 1986; Yamada et al., 1988).

3) Les effets des ions métalliques

Il a été montré que l'hydrolyse des substrats acides par APA était inhibée par l'EDTA ainsi que par les formes ioniques des métaux de transition comme le Zn²⁺, le Ni²⁺, le Cu²⁺, le Hg²⁺, le Cd²⁺ et le Co²⁺ (Tobe et al., 1980). Comme mentionné ci-dessus, la forme ionique du Calcium, Ca²⁺, potentialise l'hydrolyse des substrats acides par l'APA tout en pénalisant celle des substrats neutres ou basiques (Glennner et al., 1962; Danielsen et al., 1980). Il a été montré que l'EC₅₀ d'activation de l'APA murine par le calcium était comprise entre 25 µM et 49 µM (Iturrioz et al., 2000; Claperon et al., 2008, 2009). Plus en détail, l'effet activateur du calcium est médié par une diminution du Km de l'APA pour le substrat GluNA d'un facteur 6 sans modification du k_{cat}. Les premières études ont suggéré que l'atome de calcium se logerait dans le sous-site S1 du site actif de l'APA où il interagirait avec la chaîne latérale acide des substrats (Danielsen et al., 1980). Cette localisation du calcium fut appuyée par les études démontrant que les résidus Asp-213 et Asp-218 de l'APA de souris, situés dans le sous-site S1, permettaient la liaison du calcium dans le site actif de l'APA (Claperon et al., 2008). La structure cristallographique de l'APA a

permis de confirmer la localisation du calcium et de ses ligands en ajoutant que trois molécules d'eau permettaient également de coordonner l'ion calcium (Yang et al., 2013). Enfin, il a été montré que la mutation de l'His-450 de l'APA de souris empêchait la liaison du calcium à l'enzyme. Or ce résidu est situé sur la surface de l'APA, à 11 Å du sous-site S1 et à l'entrée d'un tunnel conduisant au site actif de l'enzyme (Iturrioz et al., 2000; Yang et al., 2013). Ces effets suggèrent que l'ion calcium pourrait accéder au sous-site S1 de l'APA via ce tunnel (Iturrioz et al., 2000).

4) Inhibiteurs de l'aminopeptidase A

a) Les inhibiteurs d'aminopeptidases monozinc

i) *Les inhibiteurs non spécifiques*

Puisque l'atome de zinc présent dans le site actif des aminopeptidases monozincs joue un rôle à la fois structural et dans l'acte catalytique de ces enzymes, celles-ci sont donc sensibles aux chélatants des métaux comme l'EDTA (Glennier and Folk, 1961) ou l'orthophénantroline (Ronquist, 1988) qui les transforment en apoenzymes inactives. La puromycine est un antibiotique qui peut également inhiber l'activité des aminopeptidases monozincs (Dewey and Kidder, 1964) avec, toutefois, un faible pouvoir inhibiteur (**Figure 5**).

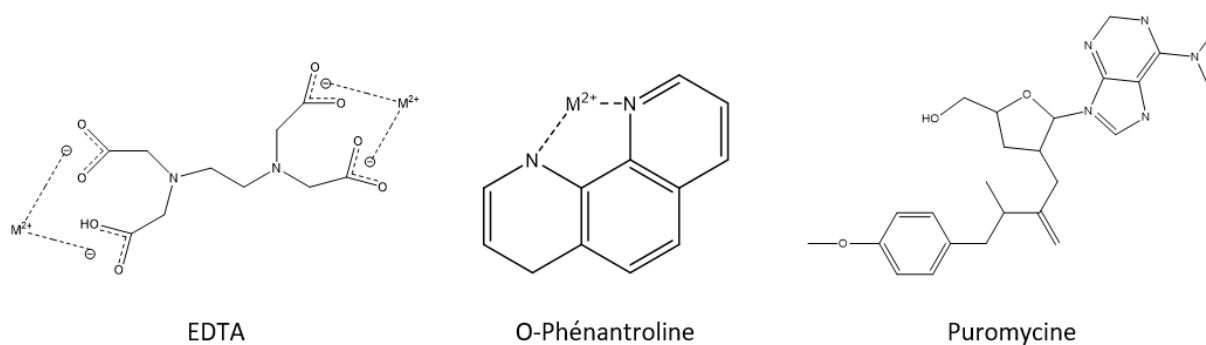


Figure 5 : Inhibiteurs non spécifiques d'aminopeptidases monozincs

ii) *Inhibiteurs spécifiques*

Il existe deux types d'inhibiteurs ciblant exclusivement le site actif d'une enzyme, les inhibiteurs irréversibles et les inhibiteurs réversibles compétitifs. Les inhibiteurs irréversibles se lient de façon covalente au site actif de l'enzyme et l'inhibe de façon permanente. Les inhibiteurs réversibles, s'associent de façon non covalente au site actif de l'enzyme et entrent en compétition avec le substrat.

a. Les inhibiteurs irréversibles ou substrats suicides

L' α -chlorométhyle-aspartate et l' α -bromométhyle-glutamate qui appartiennent à la famille des α -halogénocétones inhibent l'APA de façon irréversible avec une affinité d'environ 300 nM (Chung et al., 1983).

b. Les inhibiteurs réversibles compétitifs

Il existe deux types d'inhibiteurs réversibles compétitifs des aminopeptidases, ceux ciblant l'état de transition, suivant la formation du complexe enzyme-substrat, et ceux possédant un groupement chélatant le zinc.

Pendant l'état de transition, le substrat présente une géométrie tétraédrique qui renforce sa liaison au sein du site actif de l'enzyme. Durant cette étape de la catalyse, il établit des liaisons hydrogènes et électrostatiques avec le site actif de l'enzyme qui n'existaient pas dans le complexe de Michaelis (complexe enzyme/substrat). Ainsi, les inhibiteurs qui miment cet état de transition sont capables d'inhiber de manière spécifique les aminopeptidases en établissant plusieurs liaisons hydrogènes et électrostatiques avec le site actif des enzymes (Lejczak et al., 1993; Dive et al., 2000; Georgiadis et al., 2000).

Les inhibiteurs possédant un groupement chélatant le zinc ciblent un ou plusieurs sous-sites du site actif de l'enzyme et lient le zinc par leur groupement chélatant (Roques and Fournie-Zaluski, 1986; Thorsett and Wyvratt, 1987).

Les inhibiteurs des aminopeptidases sont soit, des composés naturels issus de micro-organismes, soit des composés synthétisés pour inhiber spécifiquement et sélectivement une enzyme donnée. Parce qu'ils ont été conçus d'après le site actif de l'enzyme ciblée, les inhibiteurs synthétiques sont plus spécifiques et surtout plus sélectifs que les inhibiteurs naturels.

i. *Les inhibiteurs naturels*

La majorité des molécules naturelles, inhibitrices d'aminopeptidases, ont été isolées à partir de milieux de culture de différentes variétés de *Streptomyces* (Ollis and East, 1964; Umezawa, 1976; Aoyagi et al., 1978b, 1986, 1990; Yoshida et al., 1990). Ont été notamment isolées la bestatine, l'amastatine, la probestine, l'arphaménine et l'actinonine (**Figure 6**).

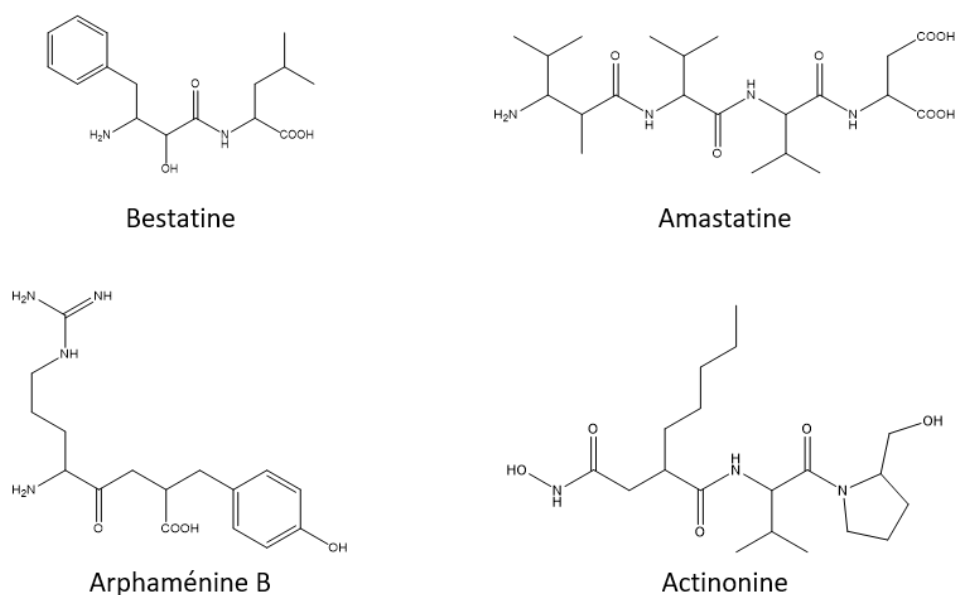


Figure 6 : Inhibiteurs naturels spécifiques d'aminopeptidases monozincs issus de micro-organismes.

La bestatine ((2R,3R) 3-amino-2hydroxy-4-phénylbutanoyl-leucine)) a été la première molécule identifiée (Umezawa, 1976). Cet inhibiteur possède un pouvoir inhibiteur d'environ 200 μM pour l'APA et de 5 μM sur l'APN, ce qui le rend peu affiné et peu sélectif. Il possède des activités antitumorales et immunomodulatrices (Umezawa, 1976) qui seraient dues à son inhibition de l'aminopeptidase W (APW), aminopeptidase spécifique des tryptophanes (Trp) (Tieku and Hooper, 1992).

L'amastatine ((2R, 3R) 3-amino-2hydroxy-méthylhexanoyl-Val-Val-Asp) (Aoyagi et al., 1978b) possède un pouvoir inhibiteur sur l'APA de 8 μM et de 0,2 μM sur l'APN et la LTA4H (Ahmad and Ward, 1990) ce qui en fait également un inhibiteur peu spécifique et peu sélectif des aminopeptidases.

L'actinonine ((R) 3-(N-hydroxy)carboxyamido-pentylpropanoyl-val-prolinol) (Ollis and East, 1964) est un hydroxamate plus actif sur l'APN ($\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{M}$) que sur l'APA ($\text{IC}_{50} = 50\text{-}100 \mu\text{M}$) ou l'APW ($\text{IC}_{50} > 1 \text{ mM}$) (Tieku and Hooper, 1992), ce qui le rend plus sélectif pour l'APN mais tout de même peu spécifique.

La probestine ((2S, 3R) 3-amino-2hydroxy-4-phénylbutanoyl-leucine-proline-proline) correspond à la bestatine-proline-proline (bestatine-Pro-Pro) (Aoyagi et al., 1990; Yoshida et al., 1990). Il possède un pouvoir inhibiteur sur l'APN de 0,05 μM et $> 5 \mu\text{M}$ sur l'APA et l'APW. Il constitue ainsi un inhibiteur relativement spécifique et sélectif de l'APN (Tieku and Hooper, 1992).

L'arphaménine B (arginine-cétométhylène-D-Tyrosine) (Aoyagi et al., 1986) possède un pouvoir inhibiteur de 0,3 μM sur la Leucine-Aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11.1) et > 6 μM sur l'APB ce qui en fait un inhibiteur d'APB plutôt sélectif de la LAP mais peu spécifique (Ahmad and Ward, 1990).

Au sein de l'APN, la bestatine ne se lie pas comme un inhibiteur du complexe de Michaelis. Le groupement phénylbutanoyl vient se placer au fond du sous-site S1. Ses groupements amino, carbonyl oxygène et α -hydroxyle interagissent avec l'APN via le solvant. Le groupement carboxylate C-terminal libre de sa leucine (Leu) coordine le zinc et une molécule d'eau tandis que la chaîne latérale de cette Leu interagit avec le sous-site S1' (Wong et al., 2012).

ii. Les inhibiteurs synthétiques

Les premiers inhibiteurs synthétiques d'aminopeptidases développés furent dérivés d'inhibiteurs naturels, comme ceux dérivés de la bestatine, dans l'objectif d'améliorer ces pharmacophores. Ainsi, le fait d'avoir ajouté un résidu arginine (Arg) en position P3' de la bestatine a permis d'obtenir un composé, bestatine-L-Arg-AcOH, ayant un pouvoir inhibiteur sur l'APN de 2.1 nM, le rendant 100 fois plus affin que la bestatine (Shimamura et al., 1984). D'autres études ont montré que substituer l'hydroxyle de la bestatine soit, par un thiol, n'améliorait pas l'interaction avec le zinc (Gordon et al., 1988; Ocain and Rich, 1988) soit, par une amine, entraînait une chute du pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'APN, l'APB et la LAP (Herranz et al., 1992).

La conception rationnelle d'inhibiteurs synthétiques est issue des connaissances acquises sur la spécificité des sous-sites du site actif de l'enzyme et notamment celle du sous-site S1. En effet, ce sous-site accueille le résidu N-terminal du peptide à hydrolyser, appelé P1. Ainsi, l'inhibiteur conçu sur la base du résidu P1, spécifique de l'enzyme ciblée, doit posséder une amine N-terminale libre pour être reconnu par une aminopeptidase et doit posséder un groupement capable de chélater le zinc. Ce groupement peut se comporter soit comme un monodentate (thiol ou carboxylate, dont un seul atome va interagir avec le zinc), soit comme un bidentate (hydroxamate ou phosphonate, dont deux atomes vont interagir avec le zinc) (Matthews, 1988) (**Figure 7**).

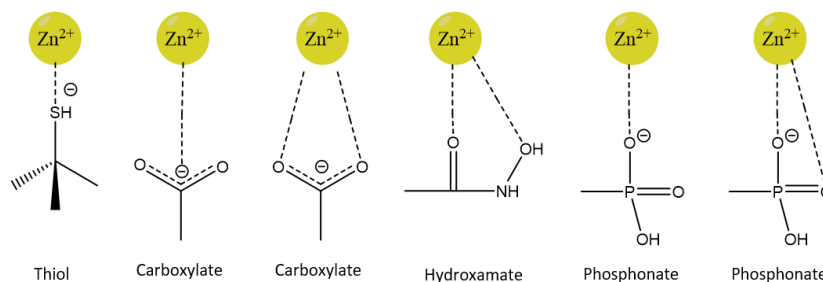


Figure 7 : Représentation des différents chélatants du zinc (monodentate ou bidentate).

Ainsi ont pu être développés des inhibiteurs comme le 1,5-diaminopentane-1-thiol (Lysine-thiol, LysSH) pour l'APB (Ocain and Rich, 1987), le 2-amino-4-(methylthio)butane-1-thiol (Méthionine-thiol, MetSH, PC18) (Réaux et al., 1999) et le 1-amino-2-phenylethane-1-thiol (Phénylalanine-thiol, PheSH) (Gros et al., 1988) pour l'APN ou l'acide 4-amino-4-mercaptoputanoïque (Glutamate-thiol, GluSH) pour l'APA et l'APN (Wilk and Thurston, 1990) (**Tableau II**).

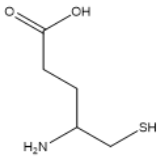
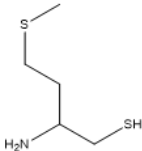
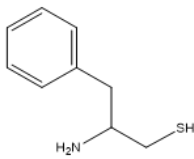
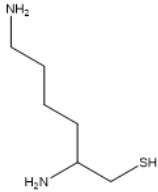
Nom	Formule	Cible	Pouvoir inhibiteur	Publication
GluSH		APA	0,4 μ M	Wilk and Thurston, 1990
MetSH		APN	8 nM	Réaux et al., 1999
PheSH		APN	5 nM	Gros et al., 1988
LysSH		APB	0,9 nM	Ocain et al., 1987

Tableau II : inhibiteurs synthétiques thiolés d'aminopeptidases monozincs.

Afin de pouvoir l'utiliser *in vivo*, le groupement thiol peut être protégé de la dégradation par l'ajout d'un groupement carboxamidophényle (Gros et al., 1988). Aussi et afin de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE), le groupement thiol peut être oxydé. Il en résulte une molécule formée de deux monomères d'inhibiteurs reliés par un pont disulfure, capable de rentrer dans le cerveau (Fournié-Zaluski et al., 1992a, 1992b).

Enfin, ces inhibiteurs ciblant le sous-site S1 de l'enzyme et chélatant le zinc peuvent servir de base pour l'étude des résidus P1' et P2' qui ciblent les sous-sites S1' et S2' respectivement. L'ajout de ces résidus permet d'augmenter la spécificité et la sélectivité des inhibiteurs pour l'enzyme cible comme c'est le cas pour l'APA (David et al., 1997, 1999).

b) Les inhibiteurs synthétiques de l'aminopeptidase A

Sachant que l'APA hydrolyse spécifiquement les résidus N-terminaux acides des peptides, les premières études de développement d'inhibiteur se sont focalisées sur l'ajout d'un groupement thiol sur le carboxylate α de l'Asp ou du Glu donnant naissance à l'Asp-thiol (AspSH, Acide 3-amino-3-mercaptopropanoïque) et au glutamate-thiol (GluSH) (Wilk and Thurston, 1990). Leur pouvoir inhibiteur sur l'APA est respectivement de 1,2 μ M et 0,4 μ M mais ils inhibent également l'APN avec une affinité micromolaire (similaire dans le cas du GluSH). Ils sont donc des inhibiteurs peu spécifiques et peu sélectifs de l'APA (Wilk and Thurston, 1990).

Les études suivantes ont cherché à explorer le sous-site S1 en développant des inhibiteurs présentant un résidu P1 et un thiol chélatant le zinc (Chauvel et al., 1994a, 1994b). Elles se sont appuyées sur le fait que l'APA hydrolyse préférentiellement les résidus acides mais aussi au fait que le GluNA est mieux hydrolysé que l'AspNA. Ceci soulève les questions de l'influence de la longueur de la chaîne latérale du résidu P1, de la position de la fonction acide sur cette chaîne latérale et de l'augmentation de la polarité de la chaîne latérale du résidu P1 sur le pouvoir inhibiteur. Ainsi, en faisant varier la nature de la chaîne latérale du résidu P1 (aromatique, alicyclique, aliphatique ramifiée) et la position de la fonction acide sur l'inhibiteur, différentes séries de composés ont été synthétisées. Ils ont ensuite comparé le pouvoir inhibiteur de ces composés avec celui du GluSH et comparé la sélectivité de ces composés pour l'APA vis-à-vis de l'APN. Ces molécules n'ont pas présenté un pouvoir inhibiteur sur l'APA supérieur à celui du GluSH. Néanmoins, le fait de substituer la fonction carboxylate du GluSH par une fonction sulfonate, plus polaire, a permis d'augmenter la sélectivité de ce composé, l'EC33 ((S) 3-amino-4-mercaptobutanesulfonate), d'un facteur 100 pour l'APA (K_i = 290 nM) par rapport à l'APN (K_i = 25000 nM) (Chauvel et al., 1994a, 1994b).

Afin d'améliorer le pouvoir inhibiteur des composés thiolés, analogues du résidu P1, les études ont cherché à augmenter les interactions APA/inhibiteur en développant, par chimie combinatoire, des molécules capables d'interagir avec les sous-sites S1, S1' et S2' de l'enzyme (David et al., 1997, 1999). Ces deux études ont développé des inhibiteurs pseudo-tripeptidiques à partir de dérivés sulfonamides (SO_2NH_2) et carboxylates (COOH) couplés à la chaîne latérale d'une sous-unité α -mercapto- β -aminoacyl. A cette chaîne sont couplés des dipeptides optimisés pour interagir avec les sous-sites S1' et S2' de l'APA. Les meilleurs composés sont ceux possédant un Glu sulfonamidé en position P1, un résidu hydrophobe en position P1' (tyrosine (Tyr) ou isoleucine (Ile)) et un résidu chargé négativement en position P2' (un Asp ou un dérivé d'Asp comme la carboxyproline) dont l'affinité sur l'APA est de l'ordre du subnanomolaire à nanomolaire et sur l'APN de 200 nM à plus de 10 μ M (David et al., 1997, 1999). Ainsi, ces études ont permis de développer des inhibiteurs spécifiques et hautement sélectifs

de l'APA (**Tableau III**). Cependant, leur inefficacité *in vivo* a nécessité de poursuivre la recherche d'un inhibiteur à la fois puissant et sélectif de l'APA actif *in vivo*.

Toujours dans l'objectif d'améliorer la spécificité d'inhibiteurs dérivés de l'EC33, les études ont cherché à développer un inhibiteur possédant un groupement chimique capable d'interagir avec le sous-site S1' de l'APA. Ainsi l'ajout d'un groupe phénylhexane (CH₂CH₂-phényl) en α du thiol a permis de développer un composé, le NI929 (acide (3S,4S)-3-amino-4-mercapto-6-phényl-hexane-1-sulfonique), dont le pouvoir inhibiteur sur l'APA est de 30 nM, ce qui augmente son affinité pour l'enzyme d'un facteur 10 par rapport à l'EC33 (Inguibert et al., 2005) (**Tableau III**). Des études sont aujourd'hui en cours pour évaluer l'efficacité du NI929 *in vivo*.

Une autre stratégie de développement d'inhibiteurs a été de cibler l'état de transition de l'enzyme. En substituant le groupement carboxylate libre en α d'un Asp ou d'un Glu par un groupement phosphonate (PO₃H₂), il a été possible de développer des molécules capables de mimer l'intermédiaire tétraédrique de l'état de transition et ainsi inhiber les aminopeptidases monozincs dont l'aminopeptidase N mais avec une faible affinité (K_i > 10 μM) (Lejczak et al., 1993). Du fait que l'APA ait une spécificité de substrat plus importante pour le Glu que l'Asp, l'inhibiteur glutamate-phosphonate (GluPO₃H₂) a été évalué pour sa capacité à inhiber l'APA. Son pouvoir inhibiteur est de 82 nM ce qui en fait un inhibiteur hautement spécifique et sélectif de l'APA (Vazeux et al., 1997). Une autre étude a cherché à développer le potentiel des inhibiteurs phosphéniques de l'aminopeptidase A en augmentant les interactions entre l'enzyme et l'inhibiteur par l'ajout de résidus en position P1' et P2' de l'inhibiteur capable de lier les sous-sites S1' et S2' de l'APA (Dive et al., 2000; Georgiadis et al., 2000). Ainsi cette étude a permis de mettre évidence un nouvel inhibiteur de l'APA, le Glu-Ψ(PO₂-CH₂)-Leu-Ala, présentant une affinité subnanomolaire pour l'APA (K_i = 0,8 nM) et une grande sélectivité vis-à-vis de l'APN (K_i > 35000 nM) (Georgiadis et al., 2000) (**Tableau III**). Néanmoins, la capacité de ces inhibiteurs à inhiber l'APA *in vivo* n'a pas été démontrée.

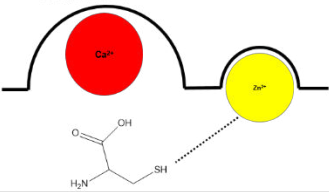
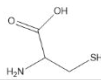
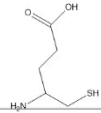
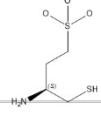
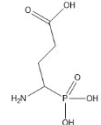
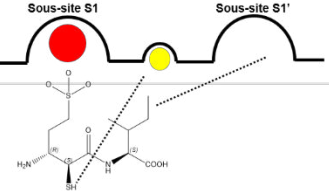
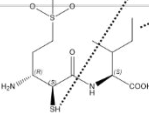
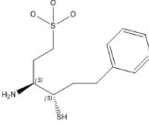
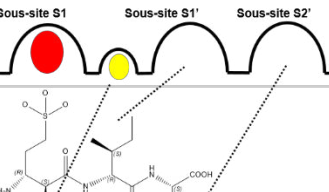
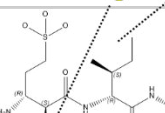
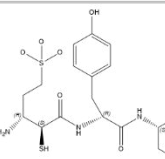
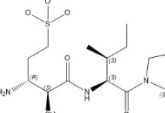
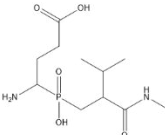
Nom	Sous-site S1 	Pouvoir inhibiteur sur l'APA	Publication
AspSH		1,2 μ M	Wilk et al., 1990
GluSH		0,4 μ M	Wilk et al., 1990
EC33		0,29 μ M	Chauvel et al., 1994
GluPO ₃ H ₂		82nM	Lejczak., 1993 Vazeux ., 1997
	Sous-site S1 Sous-site S1' 		
CD424c		48 nM	David et al., 1999
Ni929		30 nM	Inguibert et al., 2005
	Sous-site S1 Sous-site S1' Sous-site S2' 		
SC1021		3,2 nM	David et al., 1999
CD409b-11		4,3 nM	David et al., 1999
CD497b		0,8 nM	David et al., 1999
Glu Ψ (PO ₂ CH ₂)-Leu-Ala		0,8 nM	Giorgiadis et al., 2000

Tableau III : Inhibiteurs synthétiques de l'APA, analogues du complexe de Michaelis ou de l'état de transition, ciblant soit le sous-site S1, soit les sous-sites S1 et S1', soit les sous-sites S1, S1' et S2' de l'enzyme.

IV) Expression tissulaire et cellulaire de l'APA

1) A la périphérie

L'APA est fortement exprimée à la périphérie, notamment dans le rein et l'intestin grêle qui ont servi de sources pour de nombreuses études de purification de l'enzyme.

En effet, le rein a servi à purifier l'APA dans plusieurs espèces comme le rat, la souris ou le porc (Glenner and Folk, 1961; Danielsen et al., 1980; Assmann et al., 1992; Hesp and Hooper, 1997). Dans le rein, la plus grande quantité d'APA détectée par immunohistochimie ou par détection d'activité se trouve dans les glomérules et les cellules épithéliales de la bordure en brosse du tubule contourné proximal (Glenner and Folk, 1961; Lojda and Gossrau, 1980; Kugler, 1981; Stefanovic et al., 1991; L. Song et al., 1994). L'utilisation d'un anticorps spécifique et sélectif de l'APA (L. Song et al., 1994), ainsi que la mesure de son activité enzymatique en présence ou en absence d'EC33 ont permis de détailler la distribution de l'APA le long du néphron de rat (Hus-Citharel et al., 1999). Ainsi, dans le néphron, l'activité APA est plus importante au niveau cortical que médullaire. Ce gradient cortico-médullaire de la distribution de l'APA est superposable à celui des réponses calciques induites par l'Ang II et l'Ang III et à ceux des distributions rénales de l'ECA (Marchetti et al., 1987) et des récepteurs de l'angiotensine II de type I (AT1) (L. Song et al., 1994).

L'intestin grêle est le second organe présentant une forte expression de l'APA, notamment au niveau de la bordure en brosse des microvillosités de l'intestin où elle représente 4% des protéines totales (Benajiba and Maroux, 1980; Lojda and Gossrau, 1980; Mentzel et al., 1996). Au sein de l'intestin, la plus forte activité APA se trouve au niveau du jéjunum (Lojda and Gossrau, 1980).

L'APA est également exprimée dans l'endothélium de plusieurs organes comme le poumon, où son activité est la plus forte, (Huang et al., 1994), les glandes surrénales (Del Vecchio et al., 1980), le cœur (Li et al., 1993). Au niveau cellulaire, l'APA est exprimée dans les hépatocytes (Lojda and Gossrau, 1980), les cellules réticulaires corticales du thymus (Gossrau et al., 1987), les cellules β des îlots de Langerhans (Härdtner et al., 2013) et dans l'épithélium des canaux interlobulaires pancréatiques (Glenner and Folk, 1961; Lojda and Gossrau, 1980).

2) Au niveau central

Dans le cerveau de rat, il a été possible d'établir la distribution de l'APA en mesurant son activité en présence ou en absence de l'EC33 dans des noyaux cérébraux microdisséqués sur des coupes frontales de cerveau de rat congelées (Zini et al., 1997). Ainsi, les activités APA les plus fortes se trouvent dans l'organe vasculaire de la *lamina terminalis* (OVLT), l'organe subfornical (SFO), l'éminence médiane, l'area postrema, l'hypophyse antérieure et postérieure, le noyau arqué et le noyau supraoptique. Dans le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau paraventriculaire on retrouve une activité APA modérée. L'activité APA se retrouve dans des structures cérébrales impliquées dans le contrôle de la pression artérielle, dans la prise de boisson ou dans la sécrétion d'hormones hypophysaires. De plus il existe une superposition entre la distribution de l'activité APA, la localisation des terminaisons des neurones angiotensinergiques et la distribution des récepteurs AT1 (**Figure 8**). Ceci suggère que l'APA serait un composant du système rénine-angiotensine (SRA) cérébral et serait impliquée dans le contrôle de la pression artérielle, du comportement dipsique et des fonctions neuroendocrines.

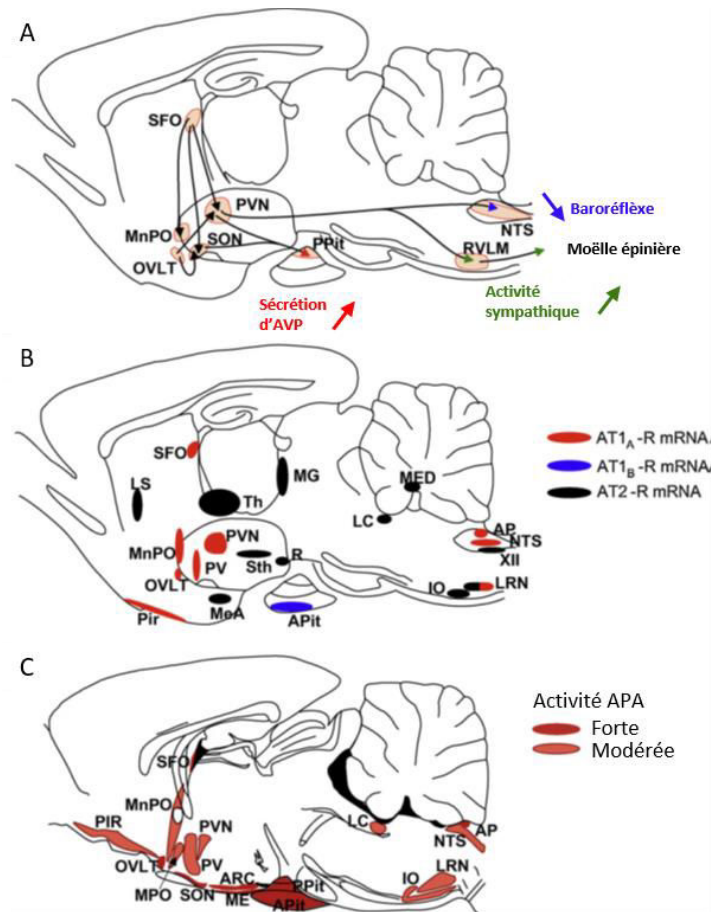


Figure 8 : Distribution de l'APA dans le cerveau de rat (Marc et al., 2011).

- A) Voies angiotensinergiques dans le cerveau de rat, ainsi que les différents sites d'actions des Ang II et Ang III cérébrales et les trois différents mécanismes suivant lesquels les angiotensines cérébrales pourraient augmenter la pression artérielle (Sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine, activation de l'activité des promotoneurons dans la médulla rostroventrolatérale et inhibition du baroréflexe dans le noyau du tractus solitaire).
- B) Distribution des ARNm des récepteurs AT1a, AT1b et AT2 dans le cerveau de rat (Zini et al., 1997).
- C) Distribution de l'activité enzymatique de l'APA dans le cerveau de rat (Lenkei et al., 1997).

Abbréviations : ARC, noyau arqué ; AT1, récepteur des angiotensines de type 1 ; AT2, récepteur des angiotensines de type 2 ; AVP, arginine-vasopressine ; IO, olive inférieure ; LS, septum latéral ; LC, locus coeruleus ; LNR, noyau réticulé latéral ; MeA, noyau amygdaloïde médial ; ME, éminence médiane ; MED, noyau cérébelleux médial ; MG, complexe géniculé médial ; MPO, noyau préoptique médial ; MnPO, noyau préoptique médian ; NTS, noyau du tractus solitaire ; OVLT, organe vasculaire de la *lamina terminalis* ; Pir, cortex piriforme ; PPit, hypophyse postérieure ; PV, noyau périventriculaire ; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; R, noyau rouge ; RVLM, médulla rostroventrolatérale ; SFO, organe subfornical ; SON, noyau supraoptique ; Sth, noyau subthalamique ; Th, thalamus ; XII, noyau hypoglossal.

Chez l'Homme, la distribution cérébrale de l'APA est similaire à celle du rat. On retrouve une forte activité de l'enzyme au niveau des plexus choroïdes et de la glande pinéale. Une activité APA a aussi été détectée dans le NTS, le septum, le bulbe olfactif, le cortex préfrontal, le noyau accumbens et l'hypothalamus, au niveau des noyaux paraventriculaire et supraoptique. Au sein de ces structures on

observe également une expression des récepteurs des angiotensines et des terminaisons des neurones angiotensinergiques. Nombre de ces structures sont impliquées dans la régulation de l'équilibre hydrique et de la pression artérielle par une action de l'Ang II/ Ang III sur le contrôle de la sécrétion de vasopressine (AVP) dans l'hypothalamus, du baroréflexe au niveau du NTS et de l'activité sympathique au niveau de la médulla ventrolatérale (de Mota et al., 2008). En utilisant un anticorps spécifique et sélectif de l'APA (L. Song et al., 1994), il a été possible de démontrer chez l'Homme une localisation neuronale et aussi vasculaire de l'APA dans le NTS, le noyau dorsal vague, l'hypoglosse et le noyau ambigu (de Mota et al., 2008). Ces structures de la médulla oblongata sont impliquées dans le contrôle autonome de la pression artérielle, notamment au niveau du baroréflexe et de l'innervation sympathique. Ces structures expriment aussi l'ARNm des récepteurs AT1, des sites de liaisons de l'Ang II et de l'Ang III ainsi que des terminaisons des neurones angiotensinergiques (Allen et al., 1988; MacGregor et al., 1995). Ces données renforcent l'hypothèse que l'APA pourrait être un des composants du SRA cérébral et être impliquée dans la régulation de la pression artérielle.

Chapitre 3 : Le système rénine-angiotensine cérébral

Comme à la périphérie, le SRA cérébral se compose des mêmes éléments, à savoir une cascade enzymatique d'hydrolyse en quatre étapes de l'angiotensinogène qui donne naissance successivement à l'angiotensine I (Ang I), l'angiotensine II (Ang II), l'angiotensine III (Ang III) et l'angiotensine IV (Ang IV). Chaque étape d'hydrolyse est effectuée par une enzyme spécifique que sont successivement la rénine, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), l'aminopeptidase A (APA) et l'aminopeptidase N (APN). Enfin, les récepteurs de l'angiotensine II/III de type 1 (AT1) et de type 2 (AT2) sont également présents (Phillips, 1987; Allen et al., 1992; Saavedra, 1992; Lenkei et al., 1997; Ferguson, 2009) (**Figure 9**).

Les composants du SRA périphérique n'interagissent pas avec ceux du système cérébral puisque ni la rénine, ni les angiotensines circulantes ne peuvent pénétrer dans le cerveau (Ganten et al., 1976; Fei et al., 1982). Ainsi, nous devons différencier les régions cérébrales séparées de la périphérie par la BHE et les organes circumventriculaires qui se trouvent en dehors de cette barrière. En effet ceux-ci, comme l'organe subfornical, l'organe vasculaire de la *lamina terminalis* et l'area postrema, contiennent des capillaires fenêtrés qui permettent des échanges avec la circulation sanguine (McAllen et al., 1990). Ainsi, dans certaines conditions physiopathologiques telles que la déshydratation, l'augmentation des taux d'Ang II circulante va permettre la pénétration de ce peptide dans les organes circumventriculaires et l'activation des récepteurs AT1 présents dans ces organes. Les voies neuronales, dont les voies angiotensinergiques, reliant les organes circumventriculaires aux noyaux supraoptique et paraventriculaire vont être activées et conduire à une augmentation de l'activité des neurones vasopressinergiques. Ces neurones vont libérer l'arginine-vasopressine (AVP) dans la circulation sanguine qui, au niveau du rein, va induire une diminution de la diurèse. Les organes circumventriculaires sont donc un lieu d'interaction privilégié entre le SRA systémique et le SRA cérébral (Mangiapan et al., 1984; Menani et al., 1998; Fitts et al., 2000).

I) L'angiotensinogène

L'angiotensinogène est présent dans le système nerveux central (Lynch et al., 1987) et synthétisé par les astrocytes (Stornetta et al., 1988; Intebi et al., 1990) mais aussi par les noyaux paraventriculaires, périventriculaires, supraoptiques, suprachiasmatiques (Ryan et al., 1997), l'organe subfornical, les noyaux trigéminaux mésencéphalique et externe latéral parabrachial (Yang et al., 1999), neurones du striatum et de la substance noire (Garrido-Gil et al., 2013, 2017). Il est libéré en grandes quantités dans le milieu extracellulaire (Morris and Reid, 1978) et dans le liquide céphalo-rachidien où il représente

entre 1 et 10% des protéines totales (Hilgenfeldt, 1984). L'angiotensinogène ainsi que son ARNm ont été détectés dans d'autres régions cérébrales comme l'hypothalamus et la medulla oblongata (Bunnemann et al., 1992). Les astrocytes associés aux capillaires, les oligodendrocytes associés aux neurones (cellules satellites astrogliales) (Deschepper et al., 1986; Healy and Printz, 1984), et les cellules épendymaires (Richoux et al., 1988) recapturent l'angiotensinogène présent dans le liquide céphalorachidien.

L'angiotensinogène humain est un peptide de 485 acides aminés constitué d'un peptide signal de 33 acides aminés suivi de 12 acides aminés (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile) (Kageyama et al., 1984) et se terminant par une séquence peptidique de 440 acides aminés. Lors de la sécrétion de l'angiotensinogène, le peptide signal est clivé puis le peptide circulant va être hydrolysé soit en angiotensine 1-12 (Ang 1-12, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile), soit en Ang I (Ang 1-10, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) par la rénine (**Figure 9**). La partie C-terminale de l'angiotensinogène, appelée des(angiotensine I)angiotensinogène (Hackenthal et al., 1976; Ménard et al., 1983) possède une homologie structurale et de séquence avec la famille des sérines (Ser) protéases inhibiteurs (serpin). Toutefois, l'angiotensinogène ne présente pas d'activité d'inhibition (Hackenthal et al., 1976; Bouhnik et al., 1981). Elle jouerait un rôle de chaperonne, protégeant les Ang 1-12 et Ang I, mais aurait aussi un effet antiangiogénique (Célérier et al., 2002).

II) L'angiotensine 1-12

Par une enzyme et un mécanisme encore inconnus, l'angiotensinogène est hydrolysé en Ang 1-12 (Nagata et al., 2006; Ahmad et al., 2014). Sa présence a été démontrée dans le cerveau où sa concentration est cinq fois plus importante que celle de l'Ang II (Nagata et al., 2006). Il a été montré que son injection dans le PVN ainsi que dans le NTS provoquait les mêmes effets sur la pression artérielle que l'injection d'Ang II, suggérant que ce peptide pouvait avoir un rôle dans le contrôle central de la pression artérielle (Chitravanshi and Sapru, 2011; Chitravanshi et al., 2012). Cependant, l'Ang 1-12 est rapidement hydrolysée par l'ECA en Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Arnold et al., 2010) ce qui suggère un rôle de réservoir pour la production d'Ang II, indépendamment de la production d'Ang II via la voie de la rénine (Oparil, 2007; Trask et al., 2008) (**Figure 9**).

III) La rénine et l'angiotensine I

Deux formes de rénine (EC 3.4.23.15) ont été détectées dans le cerveau : la rénine « classique » (rénine A) par dosage radioimmunologique et par immunohistochimie (Ganten et al., 1976; Dzau et al., 1986) et une forme courte (rénine B, exclusivement cérébrale) par RT-PCR (Lee-Kirsch et al., 1999).

La rénine A a été localisée dans les terminaisons nerveuses (Hirose et al., 1978; Husain et al., 1984; Paul et al., 1985) et les cellules gliales (Inagami et al., 1980; Slater et al., 1980). Plus précisément la rénine est présente dans le cervelet, l'hippocampe, le noyau dorsal du nerf vague, le noyau inférieur de l'olive, la formation réticulée, la medulla rostro-ventrolatérale, le noyau central de l'amygdale, le noyau parabrachial latéral, le noyau trigéminal mésencéphalique, les noyaux de la lame terminale et dans l'organe subfornical (Lavoie et al., 2004). La rénine A reconnaît spécifiquement le motif His-Pro-Phe de l'angiotensinogène et hydrolyse la liaison peptidique entre la Phe⁴¹ et l'His⁴² pour donner naissance à l'Ang I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) (Nakagawa et al., 2007) (**Figure 9**).

La rénine B est issue de l'épissage du gène de la rénine A au niveau d'un promoteur alternatif situé dans l'intron 1 (Lee-Kirsch et al., 1999, p.). Son expression est exclusivement neuronale et son ARNm est présent dans l'hypothalamus et le bulbe rachidien, des structures impliquées dans la régulation des fonctions cardiovasculaires et des hormones hypophysaires.

IV) L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et l'angiotensine II

L'ECA (EC 3.4.15.1) cérébrale a été détectée par plusieurs méthodes, soit par dosage de son activité enzymatique, soit par immunohistochimie, soit par autoradiographie (utilisation d'un inhibiteur de haute affinité radiomarqué, le captopril radioiodé) (Mendelsohn, 1984; Mendelsohn et al., 1984). Ainsi, l'ECA est exprimée en grandes quantités dans les plexus choroïdes, les ganglions de la base (noyau caudé, putamen et globus pallidus), la substance noire, l'organe subfornical au niveau des cellules neuronales, les cellules épendymaires de tous les ventricules et sur la surface luminale de l'endothélium. On en retrouve en plus faibles quantités dans l'hypothalamus, le thalamus, l'amygdale, le cervelet et le tronc cérébral (Mendelsohn, 1984; Mendelsohn et al., 1984; Strittmatter et al., 1984; Pickel et al., 1986). Par fractionnement subcellulaire, il a été observé que l'ECA était également présente au sein des synaptosomes (Yang and Neff, 1972; Paul et al., 1985). L'ECA hydrolyse l'Ang I (Ang 1-10) entre la Phe⁸ et l'His⁹ pour donner naissance à l'Ang II (Ang 1-8, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Erdös, 1975) (**Figure 9**). De façon intéressante, il a été montré dans plusieurs régions cérébrales comme la substance noire et les ganglions de la base que l'ECA est co-localisée avec l'Ang II mais aussi avec les récepteurs des angiotensines II/III de type 1 (AT1) confirmant une implication de l'ECA dans la

formation de l'Ang II et suggérant son implication dans la régulation des fonctions effectuées par ce peptide (Chai et al., 1993; Jöhren et al., 1997; Zhuo et al., 1998). Aussi, il a été montré que dans la substance noire au sein du système nigrostriatal, l'ECA était impliquée dans le métabolisme de la substance P (Mauborgne et al., 1987).

V) L'aminopeptidase A et l'angiotensine III

Comme expliqué dans le chapitre précédent, l'APA cérébrale est exprimée dans les structures impliquées dans le contrôle central de la pression artérielle, de la prise de boisson et dans la régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires (Zini et al., 1997; de Mota et al., 2008).

L'APA, hydrolyse l'Asp N-terminal de l'Ang II (Ang 1-8), donnant naissance à l'Ang III (Ang 2-8, Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Bausback et al., 1988) (**Figure 9**).

VI) L'aminopeptidase N et l'angiotensine IV

L'APN (EC 3.4.11.2) a été localisée dans différentes structures cérébrales comme sur les membranes synaptiques de striatum de porc et de rat (Matsas et al., 1985; Solhonne et al., 1987), sur les membranes des microvaisseaux du tissu cérébral (Gros et al., 1986; Schnabel et al., 1992), au niveau des plexus choroïdes, de l'organe subfornical et de la neurohypophyse (Gros et al., 1986; Bourne et al., 1989; Schnabel et al., 1992). L'APN fut tout d'abord localisée, par immunohistochimie, exclusivement sur les vaisseaux sanguins (Hersh et al., 1987). Cependant, des études postérieures ont précisé sa localisation dans les vaisseaux du parenchyme cérébral par immunohistochimie. En effet, l'APN est exprimée dans les cellules périendothéliales et dans les péricytes de la BHE (Kunz et al., 1994; Alliot et al., 1999a, 1999b). Ceci suggère que l'APN hydrolyse préférentiellement les peptides présents dans le parenchyme cérébral plutôt que ceux présents dans la circulation sanguine. Enfin, grâce à un inhibiteur de haute affinité de l'APN radiomarké, la présence de sites de liaison de l'enzyme a été détectée dans de nombreux noyaux cérébraux de l'hypothalamus et de la medulla oblongata (Noble et al., 2001). Or ceux-ci participent au contrôle de la pression artérielle, au contrôle de la prise de boisson ainsi qu'à la régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires. Ainsi, comme l'APA, l'APN pourrait avoir un rôle dans la régulation de ces fonctions.

L'APN hydrolyse l'Arg N-terminal de l'Ang III (2-8), donnant naissance à l'Ang IV (Ang 3-8, Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Zini et al., 1996; Stragier et al., 2007) (**Figure 9**). L'Ang IV (Ang 3-8) est libérée dans la circulation sanguine et se fixe sur « l'enzyme insulín-regulated aminopeptidase » (EC 3.4.11.13, IRAP)

localisée dans les vésicules de transport de glucose (GLUT-4) présentes dans les cellules répondant à l'insuline (Albiston et al., 2001; Mascolo et al., 2017). L'IRAP a été identifiée comme le récepteur de l'Ang IV. L'Ang IV se fixe sur cette enzyme en dehors du site actif et inhibe la dégradation des substrats naturels de l'IRAP avec une affinité de 20 nM (Albiston et al., 2001; Mascolo et al., 2017).

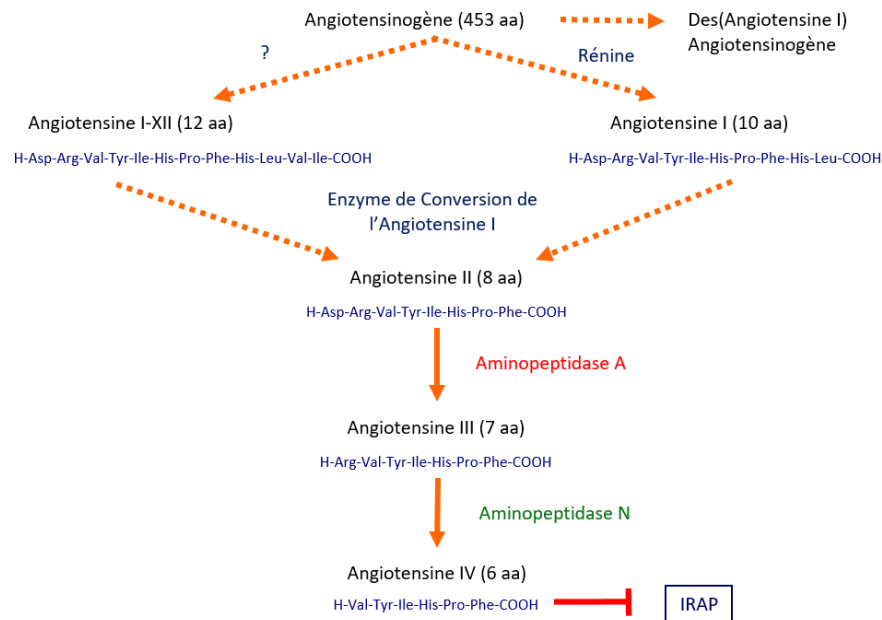


Figure 9 : Représentation du système rénine angiotensine cérébral.

VII) Les voies angiotensinergiques

Les voies angiotensinergiques ont été détectées par immunohistochimie, grâce à des anticorps capables de reconnaître aussi bien l'Ang II que l'Ang III. Il a donc été montré que ces voies naissent dans les organes circumventriculaires, au niveau du SFO et de l'OVLT, et se projettent dans l'aire préoptique au niveau du noyau préoptique médian (MnPO) et dans l'hypothalamus au niveau du noyau supraoptique (SON) et du noyau paraventriculaire (PVN). Au niveau du PVN démarre une voie angiotensinergique plus longue qui emprunte le faisceau médian du télencéphale, innerve le bulbe rachidien (notamment le NTS) et se termine dans la moelle épinière où elle innerve les neurones préganglionnaires orthosympathiques (Lind and Ganten, 1990).

Lorsque les voies angiotensinergiques sont stimulées ou si l'on injecte par voie centrale l'Ang II ou l'Ang III, on observe une augmentation du comportement dipsique, une libération d'AVP de la neurohypophyse dans la circulation sanguine et une augmentation de la pression artérielle (Phillips, 1987). Cette augmentation de pression artérielle est la résultante de trois mécanismes différents qui sont : l'augmentation de la libération d'AVP dans la circulation sanguine, l'augmentation de l'activité

des neurones sympathiques et une inhibition du baroréflexe au niveau du NTS (Phillips, 1987). Or une hyperactivité sympathique a été observée à un stade précoce de l'hypertension artérielle (Julius et al., 1988). Cette hyperactivité pourrait participer soit à l'origine, soit au maintien de cette pathologie.

VIII) Les récepteurs des angiotensines II, III et IV

Il a été montré par des techniques d'hybridation *in situ* et d'autoradiographie que, chez les mammifères, les récepteurs des angiotensines II/III de type 1a (AT1a) étaient localisés dans plusieurs structures cérébrales contenant les corps cellulaires ou les terminaisons des neurones angiotensinergiques. Les récepteurs AT1a sont fortement exprimés dans différents noyaux comme le l'organe subfornical (SFO), l'organe vasculaire de la *lamina terminalis* (OVLT), le PVN, le SON, le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau parabrachial (Lenkei et al., 1997; Allen et al., 2000). Du fait de leur localisation, les récepteurs AT1a exercent un contrôle sur la prise de sel, l'équilibre hydrique, la pression artérielle et la sécrétion des hormones hypophysaires.

Les récepteurs des angiotensines II/III de type 1b (AT1b) ont été exclusivement détectés dans l'antéhypophyse, au niveau des cellules corticotropes et lactotropes, où ils régulent l'action stimulatrice de l'Ang II ou de l'Ang III sur la sécrétion de l'hormone corticotrope (ACTH) et de la prolactine (Lenkei et al., 1997; Allen et al., 2000).

Les récepteurs des angiotensines II/III de type 2 (AT2) ont été détectées dans des structures cérébrales distinctes de celles exprimant les récepteurs AT1a. Les récepteurs AT2 sont notamment exprimés dans le thalamus, le noyau subthalamique, le noyau de l'olive inférieure ou le locus coeruleus et sont impliqués dans le contrôle des fonctions sensorielles et motrices (Millan et al., 1991; Lenkei et al., 1997).

Chapitre 4 : L'aminopeptidase A, cible thérapeutique potentielle

I) Recherche du peptide effecteur du SRA cérébral

1) Régulation de l'activité aminopeptidase A dans le cerveau de modèles expérimentaux d'hypertension

a) Le rat spontanément hypertendu (SHR), un modèle d'origine génétique

Le rat spontanément hypertendu est un modèle proche de l'hypertension essentielle humaine. Cette souche de rat a été établie suite à l'observation dans une portée de rat Wistar kyoto (WKY) d'un mâle spontanément hypertendu et d'une femelle avec une pression artérielle élevée (supérieure à 130 mmHg). Ces deux rats ont été accouplés et leur descendance sélectionnée sur l'expression de l'hypertension spontanée, donnant naissance à la souche de rat spontanément hypertendu (SHR) (Okamoto and Aoki, 1963). Le SHR présente une hyperactivité de son SRA cérébral. En effet, comparé aux rats normotendus (un rat présentant une pression artérielle moyenne comprise entre 90 et 110 mmHg) génétiquement apparentés, le SHR a des taux cérébraux d'angiotensinogène d'Ang II et d'Ang III plus élevés (Schelling et al., 1982; Phillips and Kimura, 1988; Meyer et al., 1989; Yongue et al., 1991). De plus, la cinétique de formation de l'Ang II cérébrale et son métabolisme sont plus rapides chez le SHR que chez le rat normotendu (Ganten et al., 1983; Cook et al., 1990). Aussi, le cerveau du SHR possède une plus grande densité de sites de liaison des récepteurs AT1 (Raizada et al., 1993; K. Song et al., 1994). Enfin, l'activité APA cérébrale chez le SHR est significativement plus élevée que chez le rat normotendu, notamment dans les structures cérébrales impliquées dans le contrôle de la pression artérielle, de la prise de boisson et de la sécrétion des hormones hypophysaires. Les plus grandes augmentations d'activité APA sont observées dans les organes circumventriculaires, le SON, le noyau arqué et le noyau latéral réticulé (Zini et al., 1997).

b) Le rat DOCA-Sel, un modèle provoqué

Le rat DOCA-sel est un modèle d'hypertension artérielle secondaire, c'est-à-dire que l'hypertension se met en place suite à une pathologie. Ce modèle s'apparente chez l'Homme à l'hypertension dépendante du sel qui touche particulièrement la population afro-américaine résistante aux traitements classiques, que ce soit par les inhibiteurs d'ECA (enalapril, captopril...) ou par les antagonistes des récepteurs AT1 (sartans).

L'hypertension du rat DOCA-sel est induite par une surcharge en acétate de déoxycorticostérone (DOCA) associée à un régime enrichi en sel et à une ablation d'un de ses deux reins.

La mise en place de la rétention sodée nécessite l'association :

- D'une réduction de l'excrétion urinaire de sodium obtenue par la néphrectomie et la surcharge en minéralocorticoïdes.
- D'une augmentation importante des apports en sodium (0,9 % de sel dans l'eau de boisson).

Ainsi dans ces conditions, l'homéostasie sodée ne peut être maintenue qu'en augmentant la pression de perfusion rénale, entraînant donc une hypertension artérielle systémique.

Le rat DOCA-sel présente une hyperactivité du SRA cérébral et une réduction de l'activité du SRA systémique (Basso et al., 1981). Il présente une augmentation de l'effet presseur de l'Ang III et une plus grande densité de site de liaison des récepteurs AT1 par rapport aux rats normotendus génétiquement apparentés (Wilson et al., 1986; Kubo et al., 2000). Le rat DOCA-sel présente la même hyperactivité de l'APA cérébrale que le SHR et ce dans les mêmes structures (Fournie-Zaluski et al., 2004). Ainsi dans ces deux modèles animaux d'hypertension, l'APA semble participer à l'hyperactivité du SRA cérébral.

2) L'angiotensine III : peptide effecteur du système rénine-angiotensine cérébral

a) Identification des voies métaboliques de l'Ang II et de l'Ang III cérébrales

Comme décrit précédemment, l'APA purifiée est capable *in vitro* d'hydrolyser l'Asp N-terminal de l'Ang II pour former l'Ang III (Khairallah et al., 1963; Nagatsu et al., 1970; Kugler, 1982; Bausback et al., 1988; Ahmad and Ward, 1990; Healy and Wilk, 1993; Iturrioz et al., 2001) et l'APN hydrolyse l'Arg N-terminale de l'Ang III pour donner naissance à l'Ang IV (Palmieri et al., 1989; Ward et al., 1990).

L'injection par voie intracérébroventriculaire (i.c.v) d'Ang II et d'Ang III a montré que la demi-vie de ces peptides était respectivement de 23 et 8 secondes, indiquant que l'Ang III est métabolisée plus rapidement que l'Ang II (Harding et al., 1986). Par la suite, plusieurs études ont utilisé des inhibiteurs non sélectifs d'aminopeptidases (la bestatine et l'amastatine) pour bloquer le métabolisme de l'Ang II et de l'Ang III et observer leurs conséquences *in vivo* sur le métabolisme des Ang cérébrales. Ainsi, l'injection i.c.v d'amastatine ou de bestatine entraîne l'augmentation de la demi-vie de l'Ang II et de l'Ang III radiomarquées (Abhold et al., 1987; Harding and Felix, 1987a; Dewey et al., 1988). Bien que ces molécules soient des inhibiteurs efficaces du métabolisme des angiotensines, elles ne constituent

pas des bloqueurs sélectifs du métabolisme de l'Ang II ou de l'Ang III. En effet, l'amastatine, qui fut d'abord considérée comme un inhibiteur d'APA, inhibe 40 fois mieux l'APN que l'APA. D'autre part, la bestatine présente un trop large spectre d'inhibition d'aminopeptidases pour être qualifiée de spécifique et sélective de l'une d'elles (Tieku and Hooper, 1992). Ces expériences, bien qu'encourageantes, ne permettent pas de conclure sur la nature des enzymes impliquées dans le métabolisme des angiotensines cérébrales *in vivo*. Pour ce faire, les études suivantes ont permis de développer des inhibiteurs spécifiques et sélectifs, soit de l'APA avec l'EC33 (Chauvel et al., 1994a), soit de l'APN avec le PC18 (2-amino-4-(methylthio)butane-1-thiol) et l'EC27 (2-aminopentane-1,5-dithiol) (Fournié-Zaluski et al., 1992a; Chauvel et al., 1994b) et les ont utilisé *in vivo* (Zini et al., 1997; Réaux et al., 1999). Ainsi, les expériences suivantes ont consisté à l'injection par voie i.c.v chez la souris de l'Ang II tritiée en présence ou en absence des inhibiteurs de l'APA (EC33) ou de l'APN (EC27 et PC18), et la mesure des taux d'Ang II et d'Ang III tritiés dans l'hypothalamus de ces souris à différents temps après l'injection après séparation par HPLC ont été effectuées. Ces études ont montré que l'EC33 entraînait une augmentation de la demi-vie de l'Ang II tritiée d'un facteur 2,6 et un blocage total de la formation d'Ang III (Zini et al., 1996). D'autre part, elles ont montré que les inhibiteurs d'APN entraînaient l'augmentation de la demi-vie de l'Ang III tritiée d'un facteur 3 à 4 (Zini et al., 1996; Réaux et al., 1999). Ces études ont, pour la première fois, montré qu'*in vivo*, l'APA est responsable de la formation de l'Ang III cérébrale à partir de l'Ang II alors que l'APN métabolise l'Ang III en Ang IV (**Figure 10**).

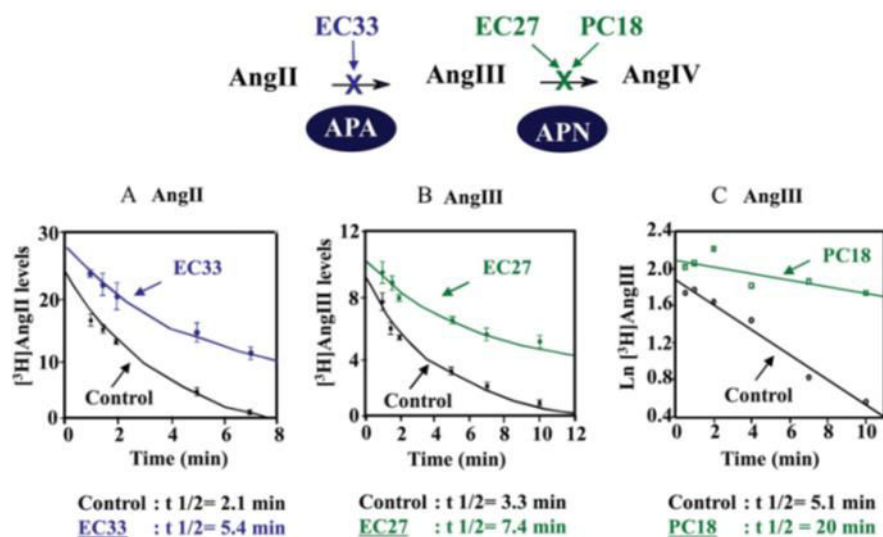


Figure 10 : Voies métaboliques de l'Ang II et de l'Ang III cérébrales (Gao et al., 2014).

b) Rôles respectifs des Ang II et Ang III cérébrales dans le contrôle cérébral de la pression artérielle

De nombreuses études ont cherché à déterminer le rôle de l'Ang II et de l'Ang III cérébrale dans le contrôle de la pression artérielle. Tout d'abord, il a été montré que l'injection par voie i.c.v, chez le rat normotendu ou le SHR, d'Ang II et d'Ang III entraînait une augmentation dose-dépendante de la pression artérielle (Wright et al., 1985; Abhold et al., 1987; Wright et al., 1989). Ensuite, il a été montré que l'injection par microiontophorèse (microinjection de molécule par un faible courant électrique) d'Ang III entraînait une augmentation, supérieure à celle induite par l'Ang II, de la fréquence des potentiels d'actions de neurones présents dans le SFO (Felix and Schlegel, 1978) et le PVN (Harding and Felix, 1987b) situés dans des structures cérébrales impliquées dans la régulation de la pression artérielle. Puis, il a été montré que suite à une stimulation par la veratridine ou à une déprivation en eau, 93% des angiotensines libérées correspondent à l'Ang III (Harding et al., 1992).

La demi-vie des Ang II et III cérébrales sont de 23 et 8 secondes, respectivement (Harding et al., 1986). Afin d'étudier leurs rôles sur le contrôle central de la pression artérielle, des analogues d'Ang II et III résistants à la dégradation par les aminopeptidases ont été développés. Ces analogues, la [D-Asp]Ang II et la [D-Arg]Ang III, ont été évalués et comparés aux peptides natifs (Wright et al., 1990b). Il a été montré que l'Ang II, l'Ang III et la [D-Arg]Ang III induisent une réponse pressive supérieure à celle de la [D-Asp] Ang II. Le fait que la [D-Asp]Ang II entraîne un effet presseur moins important que les trois autres peptides pourrait être expliqué par le fait qu'il est faiblement converti en Ang III (Wright et al., 1990b).

Il a été montré que l'inhibition des aminopeptidases cérébrales par l'injection i.c.v de l'amastatine ou de la bestatine induisait une augmentation de la pression artérielle chez trois souches de rats vigils, le SHR et deux souches de rat normotendu (Jensen et al., 1989). Cependant, le prétraitement des rats avec un antagoniste non sélectif des récepteurs des angiotensines II/III, le [Sar¹, Thr⁸]Ang II (sarthan) empêchait la réponse pressive induite par l'injection i.c.v de l'amastatine et de la bestatine (Batt et al., 1988). Ainsi ces études montrent que l'augmentation de pression artérielle induite par ces inhibiteurs d'aminopeptidases est médiée par le SRA cérébral. Toutefois, ces molécules sont des inhibiteurs non sélectifs. Ils ne permettent donc pas de discriminer, entre l'Ang II et l'Ang III cérébrale, quel est le peptide effecteur du SRA cérébral responsable de cet effet presseur.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA (l'EC33) et de l'APN (le PC18) a permis de démontrer *in vivo* quel était le peptide effecteur du SRA cérébral (Reaux et al., 1999). En effet, il a été montré que la pré-injection i.c.v d'EC33 chez le SHR bloque l'effet presseur induit par l'injection i.c.v d'Ang II, suggérant que la conversion d'Ang II en Ang III est nécessaire à l'augmentation de pression

artérielle (Reaux et al., 1999). De plus, il a été montré chez le rat DOCA-sel et le SHR que l'injection i.c.v d'EC33 entraînait une forte diminution dose-dépendante de la pression artérielle (Reaux et al., 1999; Fournie-Zaluski et al., 2004). A l'inverse, le PC18 injecté par voie i.c.v chez le SHR entraîne une augmentation de la pression artérielle. Cet effet hypertenseur est bloqué par un antagoniste du récepteur AT1a, le losartan, alors qu'il n'est pas affecté par un antagoniste du récepteur AT2, le PD 123319. Donc le blocage central de l'hydrolyse de l'Ang III par l'APN entraîne une accumulation des taux d'Ang III cérébrale, induisant une augmentation de la pression artérielle via une stimulation des récepteurs AT1a cérébraux mais pas des récepteurs AT2 (Réaux et al., 1999). Enfin l'injection i.c.v d'EC33 bloque totalement l'augmentation de pression artérielle induite par l'injection i.c.v de PC18 (Réaux et al., 1999). Cette étude démontre l'existence dans le cerveau de la cascade enzymatique du SRA et suggère que, contrairement à la périphérie, l'Ang III et non l'Ang II est le peptide effecteur de ce système.

Cette hypothèse est confirmée par plusieurs études. Tout d'abord, il a été montré chez le SHR et le rat normotendu que l'infusion i.c.v d'APA entraînait une forte augmentation de la pression artérielle, alors que l'infusion i.c.v d'APN induisait une diminution de la pression artérielle. L'augmentation de pression artérielle serait due à une augmentation de la production d'Ang III et la baisse de pression artérielle serait due à une augmentation du métabolisme de l'Ang III, hydrolysée par l'APN en Ang IV (Wright et al., 1990a). Plus récemment, il a été montré que l'injection i.c.v d'APA chez le rat normotendu entraînait une augmentation de la pression artérielle et que celle-ci impliquait l'activation du récepteur des angiotensines II/III de type 1 AT1 et du récepteur de la bradykinine sans impliquer d'effet dipsogénique (Nakamura et al., 2017).

Aussi, il a été montré chez le rat normotendu que l'injection i.c.v d'un antisérum capable d'inhiber l'APA réduisait de 59 % l'augmentation de la pression artérielle induite par l'injection i.c.v d'Ang II alors que cette injection était inefficace pour empêcher l'augmentation de la pression artérielle induite par l'injection i.c.v d'Ang III (Song et al., 1997).

Enfin, les études sur les analogues d'Ang II et III partiellement résistants à l'hydrolyse par les aminopeptidases ont montré, chez le rat normotendu, que l'injection i.c.v d'EC33 bloquait l'effet presseur induit par l'injection i.c.v de d'[D-Asp] Ang II alors que l'injection i.c.v de PC18 augmentait la durée de l'augmentation de pression artérielle induite par l'injection i.c.v de d'[D-Arg]Ang III (Wright et al., 2003). De plus, il a été montré que le blocage préalable du récepteur AT1a par le losartan empêchait les effets presseurs induits l'injection i.c.v de [D-Asp]Ang II ou de [D-Arg]Ang III (Wright et al., 2003).

Ainsi, au niveau cérébral, l'hydrolyse d'Ang II en Ang III est nécessaire pour augmenter la pression artérielle. De plus, contrairement à ce qui est établi à la périphérie, c'est l'Ang III cérébrale et non l'Ang

Il qui exerce un effet stimulateur tonique sur le contrôle central de la pression artérielle chez les animaux vigils hypertendus. De plus, l'injection dans le cerveau d'un inhibiteur spécifique et sélectif de l'APA, l'EC33, permet de normaliser la pression artérielle dans deux modèles animaux d'hypertension. L'APA constituerait donc une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de certaines formes d'hypertension artérielle et justifierait le développement d'inhibiteurs de l'APA puissants et sélectifs, administrables *per os* et pénétrant dans le cerveau, comme antihypertenseurs à action centrale (**Figure 11**).

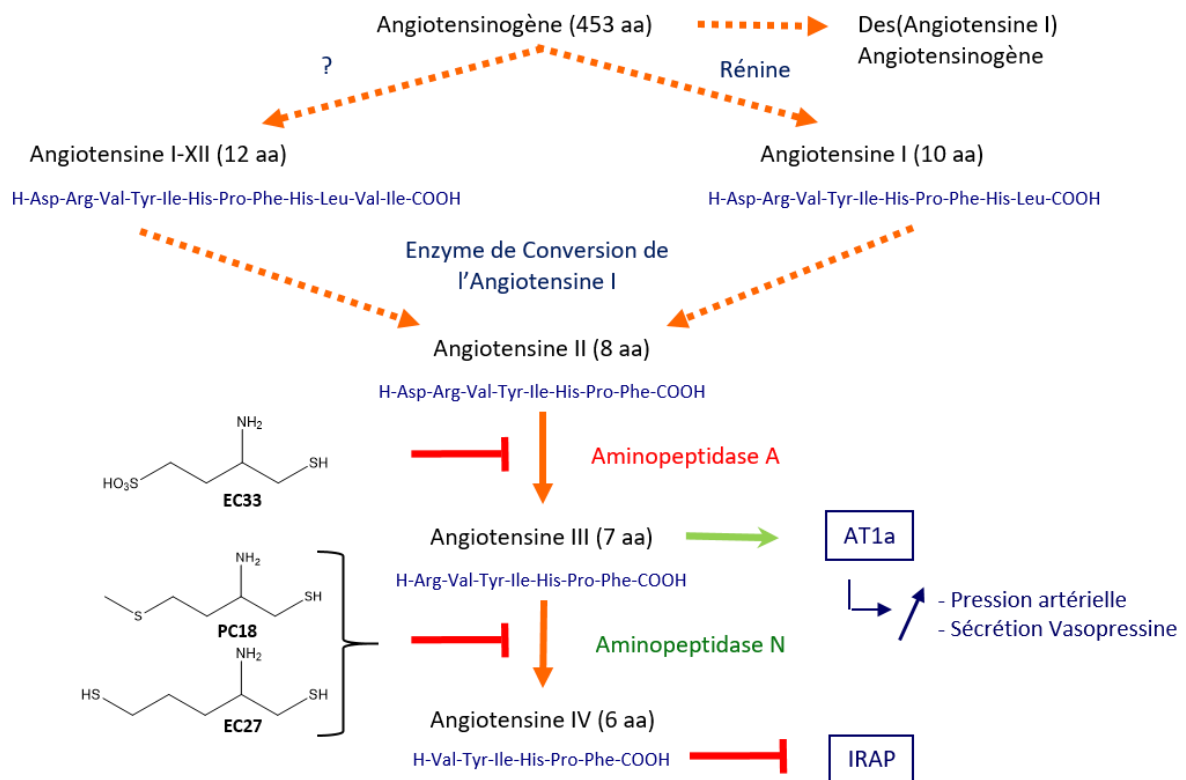


Figure 11 : Représentation du système rénine-angiotensine cérébral chez le rongeur (Llorens-Cortès, 2014).

II) Développement d'une prodrogue de l'EC33 actif par voie orale

1) Le RB150

Comme décrit précédemment, l'EC33 constituait le premier inhibiteur de l'APA à la fois spécifique et sélectif, capable de normaliser la pression artérielle chez le rat hypertendu après injection par voie i.c.v. Cependant, l'injection par voie intraveineuse (i.v) de l'EC33 chez le rat DOCA-sel ou le SHR même à une forte dose de 45 mg/kg, n'a pas d'effet sur la pression artérielle, suggérant que l'inhibiteur était incapable de traverser la BHE (Reaux et al., 1999; Fournie-Zaluski et al., 2004). Néanmoins, des études précédentes avaient montré que des inhibiteurs thiolés de peptidases monozinc, comme la NEP ou l'APN, administrés sous forme de prodrogue issues de la dimérisation de ces inhibiteurs via un pont disulfure étaient capables de traverser la BHE (Fournié-Zaluski et al., 1992a, 1992b). Ainsi, une prodrogue de l'EC33, le RB150, a été développée. Le RB150 est formé de deux molécules d'EC33 reliées par un pont disulfure (Fournie-Zaluski et al., 2004).

2) Mode d'action du RB150

Le mécanisme permettant la pénétration du RB150 dans le cerveau est à ce jour inconnu et nécessite d'être élucidé. Il pourrait impliquer un mécanisme utilisé par de nombreux composés mimant des acides aminés, appelé « cerebrovascular large neutral amino acid transporter » (LAT1) permettant de faire pénétrer les petites molécules couplées par un pont disulfure à une L-Cys (Uchino et al., 2002). Néanmoins, le canal LAT1 permet le transport d'acides aminés aliphatiques (valine (Val), Leu et Ile) et aromatiques (Trp et Tyr) or le RB150 est un composé acide. Il pourrait donc utiliser un transporteur de la même famille que LAT1, les transporteurs de solutés, capable d'effectuer le passage de petites molécules acides. Du fait de son caractère acide, le RB150 pourrait traverser la BHE au moyen des transporteurs d'acides aminés acides comme les canaux de la famille des « Excitatory Amino Acid Transporter » (EAAT) (Pardridge, 2007; Fahlke et al., 2016). Une fois dans le cerveau, le pont disulfure est directement réduit par les réductases cérébrales et donne deux molécules actives d'EC33 permettant d'inhiber efficacement l'APA.

3) Normalisation de la pression artérielle chez le rat hypertendu, preuve du concept du RB150

Il a été montré que l'administration par voie i.v ou orale du RB150 chez le rat DOCA-sel vigile (15 mg/kg) entraînait une inhibition durable de 62 % de l'activité de l'APA cérébrale, attestant de son passage

dans le cerveau et de sa réduction en deux molécules actives d'EC33. L'inhibition de l'activité APA empêche la formation d'Ang III cérébrale et entraîne une diminution de la pression artérielle des rats DOCA-sel de 30 mmHg pendant plusieurs heures (Fournie-Zaluski et al., 2004; Bodineau et al., 2008). Ces effets ont également été retrouvés chez le SHR vigil où l'administration *per os* de RB150 (100 mg/kg) entraîne une diminution de 40 % de l'activité APA cérébrale et une diminution de la pression artérielle des SHR d'environ 20 mmHg pendant plusieurs heures (Marc et al., 2012). Ainsi, ces études démontrent que le RB150, administré par voie orale chez deux modèles expérimentaux d'hypertension, est capable de traverser les barrières intestinale, hépatique, hémato-encéphalique et pénétrer dans le cerveau où il réduit par les réductases cérébrales et donne naissance à deux molécules d'EC33 capables d'inhiber l'APA cérébrale. Ainsi le RB150 est capable de bloquer l'activité du SRA cérébral et de normaliser la pression artérielle chez le rat hypertendu vigil pendant plusieurs heures.

De plus, les rats DOCA-sel et SHRs présentent une hyperactivité de leur SRA cérébral qui entraîne une augmentation de la sécrétion d'AVP (Nishimura et al., 1998) et une augmentation de l'activité des neurones sympathiques (Masuyama et al., 1986). L'administration orale de RB150 chez le rat DOCA-sel diminue la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine, ce qui augmente la diurèse et, par la diminution du volume sanguin, contribue à la normalisation de la pression artérielle (Bodineau et al., 2008) (**Figure 12**). Le RB150 représente donc le prototype d'une nouvelle classe d'agents antihypertenseurs à action centrale. Cette molécule, ainsi que ses dérivés, pourraient être utiles pour le traitement de patients hypertendus présentant de faibles taux de rénine plasmatique et des taux d'AVP plasmatique élevés et qui sont résistants aux traitements antihypertenseurs actuellement utilisés.

III) Etudes cliniques du RB150/QGC001

Afin de démontrer le potentiel thérapeutique du RB150 (renommé QGC001 par la société Quantum Genomics), une étude préalable d'évaluation de la tolérance et de la toxicité du produit a été effectuée (essai clinique phase Ia) (Balavoine et al., 2014). Il a été montré chez le volontaire sain que l'administration aiguë de QGC001, jusqu'à 2000 mg, était cliniquement et biologiquement bien tolérée. De plus, comme dans les modèles animaux normotendus, les volontaires sains ne présentaient aucune baisse de pression artérielle, aucune modification de leur SRA systémique ni d'augmentation de leur sécrétion d'AVP (Balavoine et al., 2014). Ceci confirmant que le QGC001 est un antihypertenseur et non un hypotenseur. Par la suite, une étude clinique phase Ib portant sur les effets d'une administration chronique de QGC001 chez le volontaire sain a montré que la prise de produit pendant 7 jours par voie orale, jusqu'à 750 mg deux fois par jour, était cliniquement et biologiquement

bien tolérée. Ces résultats ont conforté ceux obtenus lors de la phase Ia et ont permis de commencer une étude de la preuve de concept de l'efficacité du QGC001 chez des patients hypertendus (phase IIa) qui est actuellement achevée et en cours d'analyse.

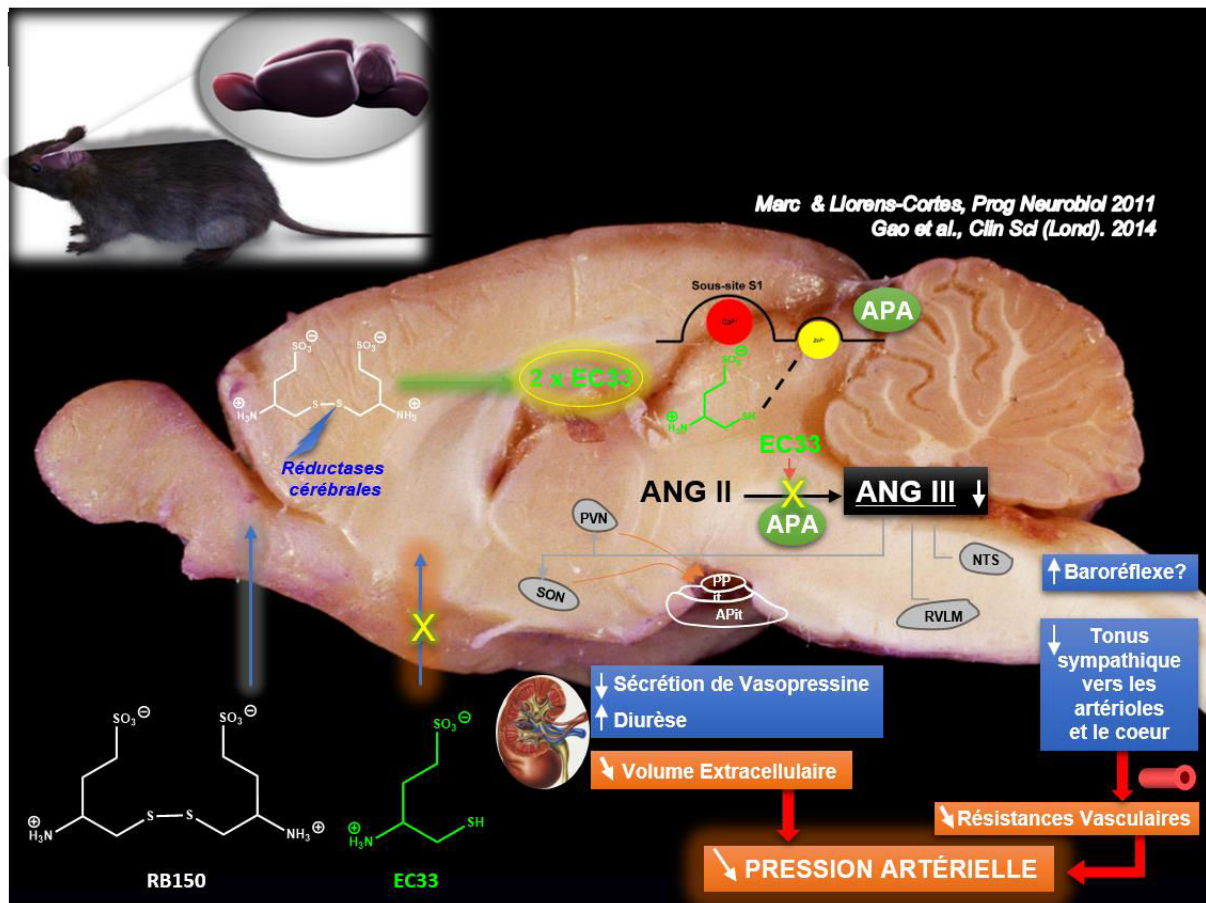


Figure 12 : Mode d'action du RB150

Le système rénine-angiotensine cérébral, via l'Ang III, contrôle la pression artérielle par trois mécanismes différents : 1) une augmentation de la libération d'AVP dans la circulation sanguine au niveau de l'hypophyse postérieure (PPit). 2) une activation des pré-motoneurones sympathiques au niveau de la médulla rostro-ventro-latérale (RVLM). 3) une inhibition du baroréflexe au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS). Le RB150, prodigue de l'EC33, suite à l'administration par voie orale, traverse la barrière hématoencéphalique et pénètre dans le cerveau. Là, son pont disulfure est réduit par les réductases cérébrales permettant la libération de deux molécules actives d'EC33 qui vont inhiber l'APA et ainsi empêcher l'hydrolyse de l'Ang II en Ang III. Il en résulte une diminution de la pression artérielle via une réduction de la libération d'AVP et de l'activité des neurones sympathiques.

Chapitre 5 : Développer de nouveaux inhibiteurs de l'aminopeptidase A par de nouvelles études structure-fonction

I) Introduction

Comme décrit dans le chapitre précédent, l'APA cérébrale constitue une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'hypertension artérielle. De ce fait, les inhibiteurs de l'APA capables de traverser les barrières biologiques jusqu'à pénétrer dans le cerveau pour bloquer l'APA constitueraient de nouvelles classes d'agents antihypertenseurs à action centrale et pourraient permettre de traiter des formes d'hypertension artérielle résistantes aux traitements existants.

Afin de développer de telles molécules, notre laboratoire a entrepris de nombreuses études structure-fonction du site actif de l'APA. Ces études ont eu pour but de définir les éléments structuraux et fonctionnels constituant le site actif de l'enzyme permettant d'apporter les connaissances nécessaires à la conception d'un pharmacophore d'inhibiteur de l'APA.

Jusqu'à l'identification de la première structure cristallographique d'une aminopeptidase monozinc en 2001, la Leukotriène-A4-hydrolase (LTA4H), puis de la résolution de la structure cristallographique de l'APA humaine en 2013, les études structure-fonction du site actif de l'enzyme étaient fondées sur la base des alignements de séquence entre aminopeptidases monozincs et sur les informations structurales et enzymatiques obtenues d'après les structures cristallographiques d'enzymes de la famille des zincins comme la thermolysine (TLN).

La TLN a été la première peptidase de la famille des zincins à être cristallisée (Colman et al., 1972; Matthews et al., 1972b, 1972a). Il s'agit d'une métalloprotéase à zinc bactérienne composée d'un lobe N-terminal majoritairement constitué de brins β en feuillets et d'un lobe C-terminal constitué d'hélices α . L'interface entre ces deux lobes accueille le site actif de la TLN et est articulé autour d'un atome de zinc coordonné par les résidus du motif HEXXH se trouvant au sein d'une hélice α liant les deux lobes. Par la suite, de nouvelles études de co-cristallisation de la TLN avec différents inhibiteurs correspondant aux différentes étapes de la catalyse ont permis de proposer un modèle du mécanisme de la catalyse de la TLN (Monzingo and Matthews, 1984; Tronrud et al., 1986, 1987; Bartlett and Marlowe, 1987; Holden et al., 1987). Puis, des études structures-fonctions par mutagénèse dirigée effectuées sur la TLN ont permis de valider ce mécanisme catalytique transposable à toutes les peptidases monozincs de la famille des zincins (Beaumont et al., 1995; Marie-Claire et al., 1997, 1998).

Ensuite, la découverte de la structure cristallographique de la LTA4H a permis d'obtenir des informations structurales communes à toutes les aminopeptidases monozincs (Thunnissen et al.,

2001). La LTA4H est une enzyme bifonctionnelle de la famille des aminopeptidase monozinc. En effet, elle possède une activité aminopeptidase mais aussi une activité époxyde hydrolase qui lui permet de convertir, au sein de la cascade de l'acide arachidonique, le LTA4 en LTB4, un composé pro-inflammatoire (Shimizu et al., 1984). La LTA4H présente une structure en trois domaines arrangés en triangle avec : un domaine N-terminal composé de brins β organisés en deux feuillets, un domaine catalytique accessible depuis l'extérieur de l'enzyme composé d'hélices α et d'un domaine C-terminal composé d'hélices α . Le domaine catalytique possède une structure similaire à celui de la TLN malgré seulement 7 % d'homologie de séquence entre les deux enzymes. Le cristal de la TLN a permis de valider les études structure-fonction par mutagenèse dirigée dont celle déterminant les résidus liant le zinc (Medina et al., 1991), celle identifiant le Glu catalytique (Wetterholm et al., 1992), celle identifiant un Tyr impliquée dans l'état de transition (Vazeux et al., 1997) et celle identifiant un Glu impliqué dans l'activité exopeptidase de l'enzyme et appartenant au motif GXMEN consensus des aminopeptidases monozincs (Rudberg et al., 2002). Ainsi, la structure cristallographique de la LTA4H a servi de patron pour le développement de modèles tridimensionnels d'aminopeptidases monozincs jusqu'à la résolution de la structure cristallographique de ces enzymes.

II) Etudes structurales sur des aminopeptidases monozincs

1) L'aminopeptidase B

a) Généralités

L'aminopeptidase B (APB, EC 3.4.11.6, aramylase II) est une enzyme qui hydrolyse exclusivement les résidus N-terminaux basiques des peptides comme cela a été mis en évidence dans plusieurs tissus de rats (Hopsu et al., 1964). Il a été montré que le chlore augmentait l'activité enzymatique de l'APB (Hopsu et al., 1966). Suite à la purification de l'APB à partir de testicules de rat (Cadel et al., 1995) et le clonage de son ADNc (Cadel et al., 1997), il a été établi que l'APB est constituée de 648 acides aminés pour un poids moléculaire de 72 kDa. Le séquençage de la protéine a révélé la présence du motif de liaison du zinc HEXXH et d'un Glu, troisième ligand du zinc, à 18 acides aminés en aval de la séquence consensus permettant de classer cette enzyme dans les gluzincins aminopeptidases (Hooper, 1994). Comme la LTA4H, avec laquelle elle partage environ 37 % d'identité de séquence chez les mammifères (Luan et al., 2012), l'APB possède également une activité époxyde hydrolase. Cette activité lui permet de convertir le LTA4 en LTB4 mais avec une activité 10 fois inférieure à celle de la LTA4H (Cadel et al., 1997). L'APB humaine est localisée sur le chromosome 1q32.2 (Piesse et al., 2002).

Chez le rat, l'APB est exprimée dans le cortex cérébral, l'épididyme, le cœur, le rein, l'intestin, les poumons, les muscles et la rate (Foulon et al., 1996). L'APB est exprimée dans les testicules, au niveau des cellules de Sertoli et des cellules somatiques pérutubulaires (Foulon et al., 1997). Aussi, l'APB est exprimée dans les cellules germinales au niveau réseau trans-Golgien et dans les granules proacrosomiques des spermatides (Cadel et al., 1997). Il a également été montré que l'APB est présente dans des vésicules de sécrétion de cellules hypophysaires et dans les milieux de sécrétion de cellules germinales (Gainer et al., 1984; Castro et al., 1989; Belhacene et al., 1993). Par ailleurs la présence de l'APB a été observée dans des vésicules de sécrétion au niveaux des glandes surrénales et des tissus neuroendocrines (Hwang et al., 2007). Enfin, il a été montré dans les cellules PC 12, une lignée de phéochromocytome tumoraux, que l'APB était sécrétée par la voie constitutive et la voie régulée (Balogh et al., 1998).

Il a été montré que l'APB pourrait avoir un rôle régulateur de la production de collagène dans les fibroblastes cardiaques (Lijnen et al., 2005). L'APB est également impliquée dans la production de neuropeptides puisqu'elle est capable de générer de l'enképhaline mature à partir d'intermédiaires peptidiques (l'Arg-enképhaline et la Lys-enképhaline) (Cohen, 1987; Cadel et al., 1995; Yasothornsrikul et al., 1998; Hwang and Hook, 2008). Enfin, l'APB pourrait avoir un rôle dans la survie et le développement tumoral (Luan et al., 2012).

b) Modélisation de l'APB

Du fait que l'APB de rat partage 33% d'identité de séquence et 48 % d'homologie avec la LTA4H de rat, il a été possible de construire un modèle tridimensionnel de l'APB par homologie fondée sur la structure cristallographique de la LTA4H (Thunnissen et al., 2001; Pham et al., 2007). D'après le modèle tridimensionnel, l'APB présente une structure triangulaire en 3 domaines composés d'un domaine N-terminal composé de brins β organisés en deux feuillets, un domaine catalytique en hélices α comportant un atome de zinc et un domaine C-terminal en hélices α . Dans ce modèle, le site actif s'articule autour de l'atome de zinc. Celui-ci participe à la réaction enzymatique d'hydrolyse en établissant des liaisons avec ses trois ligands (His-325, His-329 et Glu-348). Ces liaisons rendent le zinc électrophile ce qui lui permet de polariser une molécule d'eau responsable de l'attaque nucléophile sur le groupement carbonyle de la liaison peptidique à hydrolyser (Pham et al., 2007) (**Figure 13**).

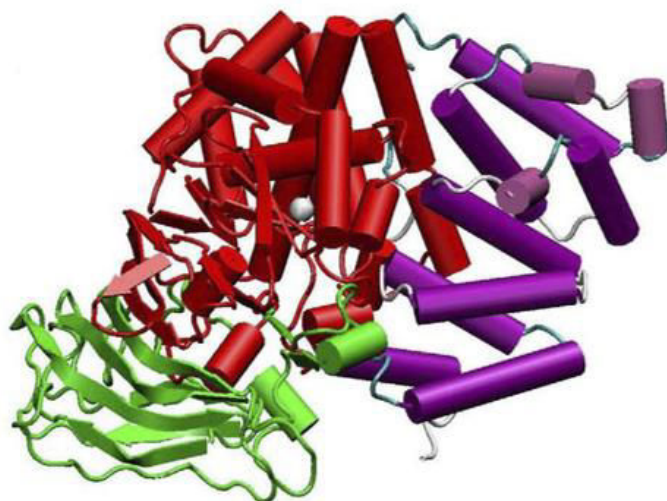


Figure 13 : Modèle tridimensionnel de l'APB de rat (Pham et al., 2007).

Le domaine N-terminal est représenté en vert, le domaine catalytique en rouge et le domaine C-terminal est représenté en violet.

c) Etudes structure-fonction

Les résidus de l'APB de rat liant l'atome de zinc ont été étudiés par des études structure-fonction par mutagenèse dirigée. Ainsi, les résidus His-325 et His-329 du motif HEXXH et le Glu-348 situé à 23 résidus en aval du motif ont été substitués par différents codons. Il a été montré que chaque mutation n'impactait pas l'expression de l'APB mais que seules les mutations silencieuses entraînaient une conservation de l'activité de l'enzyme, confirmant donc l'implication de ces résidus dans la liaison du zinc (Pham et al., 2007). Il a également été montré que les mutations faux-sens du résidu Glu-326 du motif HEXXH entraînaient une abolition de l'activité de l'enzyme sans toutefois modifier son profil d'expression. Ce résidu correspond au Glu-143 de la TLN et au Glu-386 de l'APA de souris démontrés comme étant la base catalytique de la réaction enzymatique de chacune de ces protéines. Il a donc été proposé que le Glu-326 jouerait le même rôle catalytique au sein de l'APB (Pham et al., 2007).

L'APB présente également la séquence consensus des aminopeptidases GXMEN. Ainsi, par mutagenèse dirigée, il a été démontré que les substitutions faux-sens des résidus Met-300, Glu-301 et Asn-302 de l'APB de rat entraînaient une perte de l'activité de l'enzyme sans modifier son expression (Pham, 2007). Grâce aux études structure-fonction précédentes menées sur la LTA4H, l'APN et l'APA, un rôle pour chacun de ces trois résidus a été proposé. Ainsi la Met-300 pourrait être impliquée dans le mécanisme catalytique de l'APB, du fait de ses propriétés nucléophiles, et dans la reconnaissance

du substrat comme la Met-263 de l'APN d'*E.Coli* (Ito et al., 2006) ou la Met-354 de l'APN humaine (Wong et al., 2012). Les résidus Glu-301 et Asn-302 pourraient être impliqués dans la stabilisation de l'état de transition ainsi que dans le caractère aminopeptidase/exopeptidase de l'APB en interagissant avec l'amine N-terminale des substrats comme cela a été montré pour la LTA4H (Thunnissen et al., 2001) et l'APA (Vazeux et al., 1998; Iturrioz et al., 2001; Yang et al., 2013). De façon intéressante, la substitution du résidu Gly-298 de l'APB de rat par une alanine (Ala), une Leu, une phénylalanine (Phe), une Val ou une thréonine (Thr) entraîne la production d'enzymes recombinantes inactives. La substitution de cette Gly en Ser n'entraîne pas de modification du profil enzymatique de l'enzyme recombinante comparée à l'APB sauvage. Enfin, la substitution du résidu Gly-298 en Pro induit une modification du profil de l'enzyme (Pham, 2007). En effet, l'APB mutée présente une spécificité de substrat modifiée, l'enzyme mutée devient spécifique des résidus Pro et Ala en plus des résidus Lys et Arg. Elle n'est plus aussi sensible à l'ion chlore puisque son absence n'entraîne pas d'inactivité de l'enzyme et enfin le profil d'inhibition de cette APB mutée est différent de l'APB sauvage. Ainsi, il a été proposé que la substitution de la Gly-298 en Pro stabilise le site actif de l'APB dans une conformation optimisée pour l'hydrolyse de la liaison peptidique en absence d'ion chlore au détriment de la spécificité de substrat (Pham, 2007). Ainsi, le résidu Gly-298 de l'APB de rat est impliqué dans la spécificité de substrat de l'enzyme (Pham et al., 2011).

Il a également été montré que le résidu Asp-405 de l'APB de rat était impliqué dans la spécificité de substrat basique de l'enzyme en interagissant avec le groupement amine de la chaîne latérale du résidu P1 des substrats (Fukasawa et al., 2006).

Dans l'APB humaine, il a été montré que le résidu glutamine (Gln)-169 était impliqué dans la spécificité de substrat basique de l'enzyme en maintenant une architecture correcte du sous-site S1 et en chélatant l'atome de chlore présent au sein du site actif (Ogawa et al., 2014). Il a également été montré que le résidu Phe-297 de l'APB humaine était impliqué dans l'organisation structurale du sous-site S1 en coordonnant l'atome de chlore (Ohnishi et al., 2015).

Enfin cinq résidus Tyr hautement conservés parmi les aminopeptidases ont été étudiés par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée. Tout d'abord, il a été montré que le résidu Tyr-229 de l'APB de rat était impliqué dans l'acte catalytique en stabilisant le résidu Glu-301 par une liaison hydrogène entre son groupement hydroxyle et le carboxylate du Glu (Cadel et al., 2015). Ensuite il a été montré que le résidu Tyr-281 de l'APB de rat permettait une architecture optimale du site actif de l'enzyme en interagissant avec le groupement carbonyle du résidu Arg-285. Ces deux résidus, situés dans une boucle, permettraient une structuration correcte du brin β contenant le résidu Glu-301 du motif GXMEN (Cadel et al., 2015). Puis il a été montré que les mutations du résidu Tyr-414 de l'APB

provoquaient une inhibition de l'activité enzymatique de l'APB. L'analyse du modèle tridimensionnel de l'APB a révélé que ce résidu se trouve à 4.11 Å de l'atome de zinc et pourrait maintenir une conformation adéquate de l'enzyme, permettant un positionnement correct du zinc. Il a également été montré que les mutations du résidu Tyr-409 inactivaient l'APB. Les analyses structurales ont montré que la Tyr-409 se trouvait très proche de la Tyr-414 (1,84 Å) concluant que ces résidus pourraient établir une liaison hydrogène via leur fonction hydroxyle (Cadel et al., 2015). Enfin, il a été montré que le résidu Tyr-441 pourrait effectuer une liaison hydrogène entre son groupement hydroxyle et le groupement carbonyle de l'Asp-363 situé à 3,63 Å. Cette Tyr serait impliquée dans le maintien de l'intégrité structurale du site actif de l'APB (Cadel et al., 2015) (**Figure 14**).

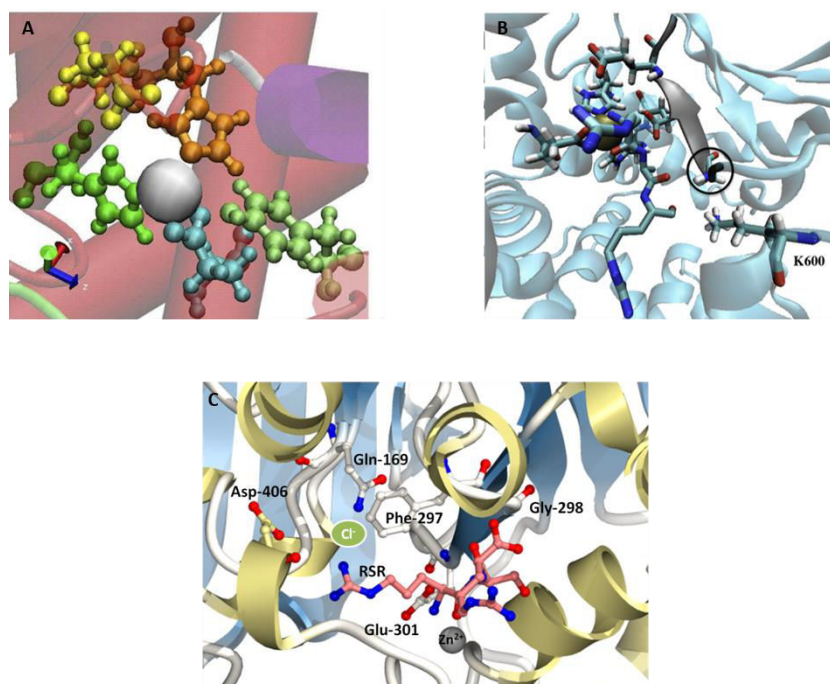


Figure 14 : Sites actifs de l'APB de rat et l'APB humaine (Pham et al., 2011, 2007; Ohnishi et al., 2015).

A) Représentation des ligands du zinc, du glutamate catalytique et du résidu donneur de proton de l'APB de rat. L'ion Zn^{2+} est représenté en gris. Les trois ligands du zinc, His-324, His-329 et Glu-348 sont représentés, respectivement, en orange, vert et bleu. Le résidu catalytique, Glu-325, est représenté en jaune. Le résidu Tyr-413, donneur de proton, est représenté en vert clair. (Pham et al., 2007).

B) Représentation du site actif de l'APB de rat dans lequel a été introduit le substrat tripeptidique Arg-Ala-Arg (Pham, 2007; Pham et al., 2011).

C) Représentation du site actif de l'APB humaine dans lequel a été introduit le substrat tripeptidique Arg-Ser-Arg (Ohnishi et al., 2015).

2) L'aminopeptidase N

a) Généralités

L'aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2) a tout d'abord été définie comme une Cys-Gly dipeptidase (Olson and Binkley, 1950; Binkley et al., 1957) présente dans la bordure en brosse des cellules rénales (Hughey et al., 1978; Grau et al., 1979).

L'APN est exprimée de façon ubiquitaire à la périphérie, notamment dans le rein et l'intestin où elle représente plus de 5 % des protéines membranaires (George and Kenny, 1973). Elle est également présente dans le foie (Aoyagi et al., 1978a; Hersh et al., 1987), dans la bile où elle est libérée à partir de la membrane des canaux biliaires (Roman and Hubbard, 1984a, 1984b), le plasma (Tokioka-Terao et al., 1984), le placenta (Kurauchi et al., 1986), le cerveau (Gros et al., 1985) et dans le striatum (Matsas et al., 1985).

L'APN eucaryote a tout d'abord été clonée à partir de d'intestin humain (Olsen et al., 1988). Elle est localisée sur le chromosome 15q25-26 et se compose de 967 acides aminés divisés en un court segment N-terminal intracytoplasmique de 9 à 10 résidus, un domaine transmembranaire de 23 à 24 résidus et d'un domaine C-terminal extracellulaire composé de 933 à 935 résidus contenant le site actif et le motif de liaison du zinc HEXXH (Olsen et al., 1988). Selon sa localisation tissulaire, le poids moléculaire de l'APN varie de 100 à 160 kDa et se présente sous forme homodimérique chez tous les mammifères, sauf chez le lapin où elle est monomérique (Feracci and Maroux, 1980; Tokioka-Terao et al., 1984). L'APN est activée par le cobalt (Lalu et al., 1986). En utilisant des substrats synthétiques β -naphtylamides, il a été montré que l'APN présente une large spécificité de substrat. En effet, elle est capable d'hydrolyser les acides N-terminaux neutres, basiques et aromatique à l'exception de la Pro. Toutefois, elle présente une plus forte spécificité pour le résidu N-terminal Ala (Lalu et al., 1986; Ward et al., 1990).

In vitro, l'APN hydrolyse des substrats naturels comme la substance P (Bausback and Ward, 1986), la neurotensine (Churchill et al., 1987), la bradykinine (Bathon et al., 1992), la neurokinine A (Wang et al., 1991), l'Ang III (Bausback and Ward, 1986; Palmieri et al., 1989; Ward et al., 1990) et la des-Asp¹-Ang I (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) (Palmieri et al., 1989).

In vivo, l'APN hydrolyse la Met⁵ et la Leu⁵ enképhaline (Gros et al., 1985; Bausback and Ward, 1986; Palmieri et al., 1989; Ward et al., 1990). Dans le système nerveux central, l'APN hydrolyse également l'Arg¹ de l'Ang III (Zini et al., 1996) avec une affinité allant de 2 μ M à 112 μ M (Palmieri et al., 1989; Wright et al., 1991) pour donner naissance à l'Ang IV qui est elle-même hydrolysée par l'APN (Chansel et al., 1998).

Outre son implication dans le SRA cérébral et systémique, l'APN est également impliquée dans les processus cancéreux. Tout d'abord, il a été montré que l'APN est exprimée dans de nombreux types de tumeurs comme le mélanome, les tumeurs hépatiques, rénales, pancréatiques, gastriques, thyroïdiennes, les tumeurs du colon et de la prostate (Bogenrieder et al., 1997; Ikeda et al., 2003; Kehlen et al., 2003; Tokuhara et al., 2006; Kawamura et al., 2007; Máté et al., 2015; Inagaki et al., 2010; Q. Zhang et al., 2015; Sanz et al., 2015; Nohara et al., 2016). Ensuite, il a été montré que l'APN agit comme un régulateur de la morphogenèse de l'endothélium durant l'angiogenèse (Bhagwat et al., 2001). Les expériences de knock-out de l'APN par des ARNs interférants en cellules HUVEC ont montré une forte baisse de l'induction de l'angiogenèse (Kehlen et al., 2003). L'APN pourrait être régulée par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF). Il a également été montré que l'APN est le récepteur d'un peptide se liant exclusivement à l'endothélium des vaisseaux angiogéniques où elle est surexprimée, le peptide asparagine-glycine-arginine (NGR) (Pasqualini et al., 1995). L'APN est ainsi devenue une cible thérapeutique potentielle dans le développement de traitements anticancéreux comme le cancer de la plèvre, le cancer colorectal, etc. (Santoro et al., 2010; Gregorc et al., 2010, 2011). Néanmoins, les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlés par l'APN restent à ce jour méconnus.

b) Structure cristallographique et études structure-fonction

Les structures cristallographiques de l'APN porcine (Chen et al., 2012) et de l'APN humaine ont été récemment publiées (Wong et al., 2012). La structure cristallographique de la partie extracellulaire de l'APN humaine montre que l'enzyme présente une structure en trois domaines : un domaine N-terminal composé de brins β organisés en deux feuillets, un domaine catalytique formé d'hélices α comprenant le site actif et l'atome de zinc lié aux résidus du motif HEXXH et un domaine C-terminal organisé majoritairement en hélices α et avec un petit feuillet de brins β . Le domaine C-terminal de l'APN dimérise avec le domaine C-terminal d'un autre monomère d'APN via des interactions hydrophobes, hydrogènes et salines, formant une interface de contact d'environ 840 Å². Le site actif est enfoui à l'intérieur de l'enzyme et projette sur une large cavité interne (environ 2800 Å³), ce qui le rend inaccessible au milieu extracellulaire (Wong et al., 2012) (**Figure 15**).

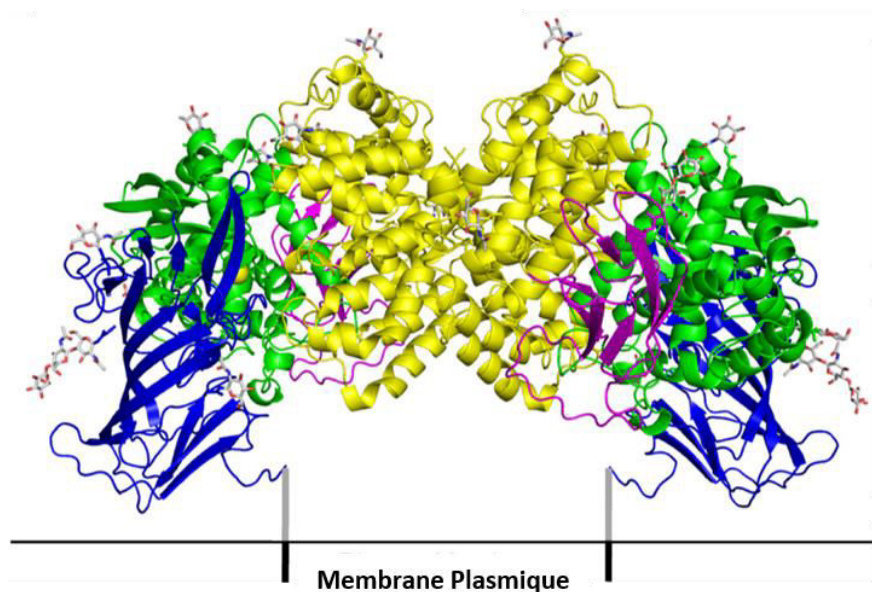


Figure 15 : Structure Cristallographique de l'APN humaine (Wong et al., 2012).

Le domaine N-terminal est coloré en bleu, le domaine catalytique en vert et le domaine C-terminal est coloré en jaune avec son feuillet β en magenta.

La structure cristallographique de l'APN humaine native a permis également de mettre en évidence les ligands du zinc que sont les résidus His-388, His-393 du motif HEXXH et Glu-411. Co-cristallisée avec l'Ang IV, il a été montré que l'amine libre de la Val N-terminale du peptide interagissait avec le Glu-355 du motif GXMEN et avec le Glu-411 et la Gln-213 (Wong et al., 2012). Il a également été montré que le Glu-389 était le Glu catalytique, responsable de la polarisation d'une molécule d'eau permettant l'attaque nucléophile sur la liaison peptidique à hydrolyser. Ces observations confirment les résultats des études portées sur l'APN de porc montrant que le Glu-350 était impliqué dans l'acte catalytique (Luciani et al., 1998; Chen et al., 2012). Ensuite, il a été montré que le résidu Tyr-477 stabilise l'oxyanion généré pendant l'état de transition (Wong et al., 2012). La chaîne latérale de la Val N-terminale de l'Ang IV se loge dans une poche neutre formée des résidus Gln-211, Gln-213, Ala-351, Met-354, Phe-472 et de la chaîne latérale de la Phe-896 venant recouvrir cette cavité formant le sous-site S1. La Phe-896 est située au sein d'une boucle dont les résidus établissent des interactions avec d'autres résidus de l'APN. En effet, la Phe-896 établit une liaison de type stacking avec la Phe-472, la Ser-895 et la Gly-894 établissent une liaison hydrogène avec l'Asn-350 et la Ser-469, respectivement. Dans cette configuration, du fait de l'organisation et de la charge du sous-site S1, il a été conclu que l'Arg N-terminale de l'Ang III ne pouvait pas interagir au niveau de ce sous-site. Le résidu P1' de l'Ang IV, une Tyr, établit avec l'APN des interactions de type stacking avec les chaînes latérales des résidus Val-385 et His-388 et une interaction de type liaison hydrogène médiée par une molécule d'eau entre son

groupement hydroxyle et le groupement carboxylate du résidu Glu-418 de l'APN. Les autres résidus de l'Ang IV n'établissent quant à eux aucune interaction avec les résidus du site actif de l'APN (Wong et al., 2012).

La co-cristallisation de l'APN humaine avec l'amastatine (Leu β N[α OH]-Val-Val-Asp) a permis de montrer que : l'extrémité Leu β N[α OH] effectuait les mêmes interactions avec l'APN que la Val N-terminale de l'Ang IV ; que le groupement α -hydroxyle chélate le zinc ; que la Val P1' établit les mêmes interactions avec l'APN que la Tyr en position P1' de l'Ang IV et que les résidus P2' et P3' de l'amastatine occupaient les même positions que les résidus P2' et P3' de l'Ang IV (Wong et al., 2012).

La co-cristallisation de l'APN humaine avec la bestatine (Phe β N[α OH]-Leu) a montré que l'inhibiteur ne se liait pas à l'enzyme comme pourrait le faire un substrat. En effet, l'extrémité du résidu Phe β N[α OH] est enfoui très profondément dans le sous-site S1 et n'interagit avec l'APN que par des liaisons hydrogènes médiées par des molécules d'eau. De plus, c'est le groupement carboxylate C-terminal de la Leu qui chélate le zinc et non son groupement hydroxyle comme cela est généralement établi pour les inhibiteurs de ce type. Cependant, la chaîne latérale de la Leu occupe et interagit avec le sous-site S1' de l'APN de la même façon que la Tyr P1' de l'Ang IV et que la Val P1' de l'amastatine. Ainsi, la bestatine reste un inhibiteur compétitif de l'APN (Wong et al., 2012).

De façon intéressante, il a été montré dans le cristal de l'APN complexé à la bestatine que la boucle flexible comportant la Gly-894, la Ser-895 et la Phe-896 se repositionne et remodèle le sous-site S1 afin de permettre l'ancrage du résidu Phe β N[α OH] (Wong et al., 2012). Ceci suggérant que cette boucle peut, selon le substrat ou l'inhibiteur, s'adapter et permettre une organisation adéquate du sous-site. Ainsi, cela suggère qu'en présence d'Ang III, l'architecture du sous-site doit être différente afin d'accueillir un résidu beaucoup plus large comme l'Arg N-terminale du peptide (**Figure 16**).

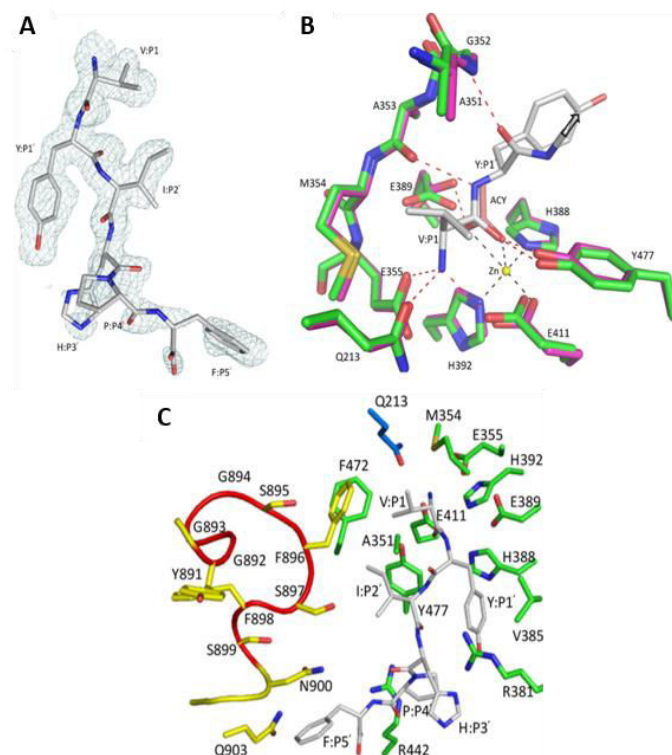


Figure 16 : Site actif de l'APN humaine complexé avec l'Ang IV (Wong et al., 2012).

- A) Densité électronique de l'Ang IV, les atomes de carbones, azote et oxygène sont colorés respectivement en gris, bleu et rouge.
- B) Superposition des sites actifs de l'APN complexés (en vert) ou non (en magenta) avec l'Ang IV. L'atome de zinc est représenté en jaune.
- C) Vue du site actif de l'APN humaine complexée avec l'Ang IV. Les résidus colorés en vert sont situés dans le domaine catalytique, les résidus colorés en jaune sont situés dans le domaine C-terminal.

3) L'aminopeptidase A

a) La structure cristallographique de l'aminopeptidase A humaine

Récemment, la structure cristallographique de la partie extracellulaire de l'APA humaine a été résolue (Yang et al., 2013). Elle montre que l'enzyme présente une structure similaire à celle des aminopeptidases monozincs soit : un domaine N-terminal composé de brins β organisés en deux feuillets, un domaine catalytique composé d'hélices α contenant le site actif où se situe l'atome de zinc et un domaine C-terminal composé d'un feuillet de brins β et d'hélices α . La structure cristallographique montre que l'APA forme un homodimère par l'interaction des domaines C-terminaux de deux monomères. L'interface formée par ces deux domaines possède une aire d'environ $1600 \text{ \AA}^2$ soit presque deux fois plus que l'interface de dimérisation de l'APN (Yang et al., 2013). Néanmoins, il a été montré que l'APA s'homodimérise grâce à un pont disulfure situé à l'extrémité extracellulaire N-terminale de chaque monomère (Ofner and Hooper, 2002). Or cette partie de l'APA n'est pas visible dans la structure cristallographique et l'interface d'homodimérisation observée

pourrait être un artéfact dû aux conditions de cristallisation. La résolution de la totalité de la structure de l'APA (partie intracellulaire, transmembranaire et extracellulaire) pourrait permettre de conclure sur la nature de cette homodimérisation.

A l'instar de l'APN, le site actif de l'APA se trouve enfoui à l'intérieur de l'enzyme et projette sur une large cavité accessible au solvant (Yang et al., 2013). Néanmoins, le site actif de l'APA est plus étroit que celui de l'APN excluant ainsi l'accès aux substrats volumineux (Wong et al., 2012; Yang et al., 2013). Cette contrainte conformationnelle serait un des éléments permettant à l'APA d'être plus sélective que l'APN dans la nature de ses substrats (**Figure 17**).

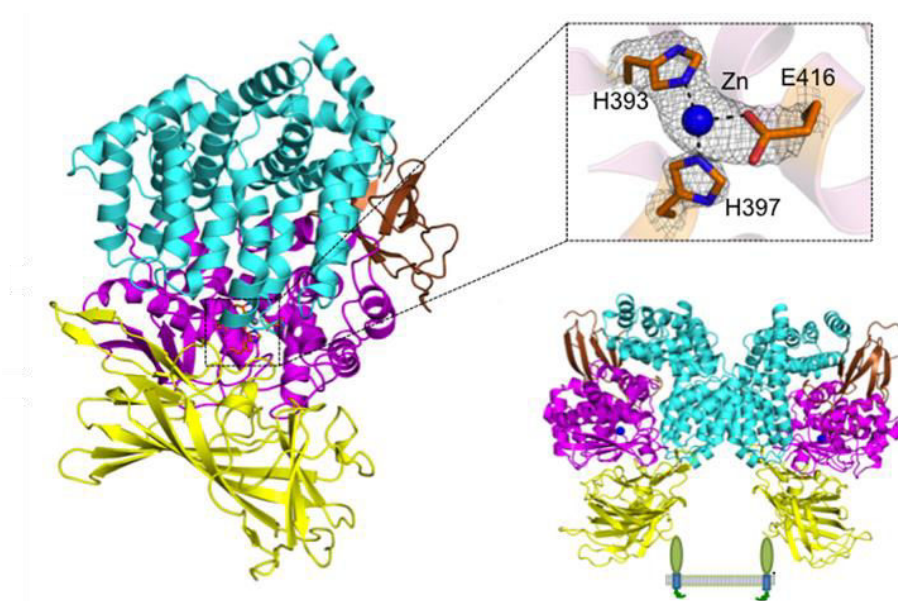


Figure 17 : Structure cristallographique de l'APA humaine (Yang et al., 2013).

Représentation des structures cristallographiques du dimère et du monomère d'APA. Le domaine N-terminal est représenté en jaune, le domaine catalytique en magenta, le domaine C-terminal est représenté en cyan et comprend le feuillet β représenté en orange.

b) Etudes structure-fonction par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée

En l'absence de données structurales sur l'APA, les premières études structure-fonction se sont appuyées sur les alignements de séquences d'aminopeptidases monozinc. Ainsi, il a d'abord été démontré que l'His-389 du motif HEXXH de l'APA de souris était cruciale pour l'activité de l'enzyme (Wang and Cooper, 1993). Ensuite, le Glu-408 a été démontré comme étant le troisième ligand du zinc avec l'His-389 et l'His-385 (Wang and Cooper, 1993; Vazeux et al., 1996). Le Glu-386 a été caractérisé comme étant le Glu catalytique permettant la polarisation de la molécule d'eau qui effectue l'attaque nucléophile sur la liaison peptidique à hydrolyser (Vazeux et al., 1996). Le rôle de ces deux Glu est

appuyé par les études de co-cristallisation de la thermolysine avec différents inhibiteurs et qui ont permis d'établir le modèle de mécanisme catalytique commun aux peptidases monozincs (Matthews, 1988).

Par la suite, les alignements de séquence d'aminopeptidases monozincs ont montré qu'une Tyr située à 63 résidus en aval du motif HEXXH pourrait correspondre à l'His-231 de la thermolysine, résidu impliqué dans la stabilisation de l'état de transition durant la catalyse enzymatique (Matthews, 1988). Ainsi, les études structure-fonction par mutagenèse dirigée sur la Tyr-471 de l'APA de souris ont permis de confirmer son rôle de stabilisateur de l'état de transition, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs mimant ou non l'état de transition (Vazeux et al., 1997).

L'étude des alignements de séquences d'aminopeptidases monozincs a permis la découverte d'un motif strictement conservé dans cette famille, situé à une trentaine d'acides aminés en amont du motif HEXXH, le motif GXMEN. Par mutagenèse dirigée, il a été montré que le Glu-352 du motif GXMEN de l'APA de souris interagit avec l'amine libre de l'Ang I alors qu'il est incapable de lier l'extrémité N-terminale bloquée de l'Ang I N-acétylée. Cette étude conclut que ce Glu est impliqué dans la liaison de l'amine N-terminale libre des substrats et des inhibiteurs (Vazeux et al., 1998) et est confortée par les travaux effectués sur le Glu-350 de l'APN porcine, conférant le même rôle à ce résidu (Luciani et al., 1998). Un autre résidu de ce motif GXMEN, l'Asn-353 a été également démontré comme effectuant des interactions avec l'amine libre N-terminale des substrats et des inhibiteurs par une étude structure-fonction par mutagenèse dirigée, en étudiant les paramètres enzymatiques des enzymes mutées pour ce résidu et les pouvoirs inhibiteurs de molécules mimant le complexe de Michaelis ou l'état de transition (Iturrioz et al., 2001).

Grâce à la résolution de la structure cristallographique de la LTA4H (Thunnissen et al., 2001), il a été possible de construire un modèle tridimensionnel de l'APA de souris par homologie grâce à l'identité de séquence entre les deux enzymes (31%) et les données fonctionnelles obtenues sur le site actif de l'APA. Ce modèle comprend les résidus 79 à 559 de l'APA de souris et constitue la majeure partie du domaine extracellulaire de l'APA. Un inhibiteur mimant l'état de transition de la catalyse enzymatique, l'inhibiteur glutamate-phosphonate (GluPO_3H_2), a été introduit dans le modèle afin de visualiser les interactions possibles entre le substrat et le site actif de l'enzyme au cours de la catalyse. Il a été montré que l'organisation du complexe APA/ GluPO_3H_2 était similaire à celle du complexe LTA4H/bestatine et que les interactions suggérées par les études structure-fonction par mutagenèse dirigée se retrouvaient dans le modèle. En effet, l'ion zinc se trouve coordonné par les résidus His-385, His-389, Glu-408, une molécule d'eau et un oxygène du groupement phosphonate du GluPO_3H_2 . Dans le modèle, le Glu-386 est dans une position optimale pour polariser la molécule d'eau catalytique

responsable de l'attaque nucléophile. La Tyr-471 est, quant à elle, engagée dans deux liaisons hydrogènes avec le groupement phosphonate du GluPO_3H_2 dont la géométrie tétraédrique mime l'état de transition. Enfin, le Glu-352 interagit bien avec l'amine libre N-terminale du GluPO_3H_2 et aussi avec la molécule d'eau catalytique qu'il pourrait polariser en complément du Glu-386 (Rozenfeld et al., 2002).

L'utilisation de ce modèle a permis de visualiser l'Arg-220, et un Asp, l'Asp-227, interagissant via un pont-salin et situés dans une boucle proche du Glu-215. L'analyse des APAs mutées pour ces deux résidus ont montré la production d'enzymes immatures, séquestrées dans le réticulum endoplasmique. Ainsi, il a été conclu que ces résidus présentaient un rôle structural crucial dans la stabilisation du domaine N-terminal de la partie extracellulaire de l'enzyme (Rozenfeld et al., 2002).

Toujours sur la base du modèle tridimensionnel de l'APA de souris complexé avec le GluPO_3H_2 , il a été démontré par mutagenèse dirigée, l'implication du résidu Glu-215 dans le caractère exopeptidase de l'enzyme et dans l'induction de la catalyse. En effet, le Glu-215 interagit avec l'extrémité N-terminale du substrat et induit un changement conformationnel de l'enzyme permettant au Glu-352 d'interagir avec l'amine libre N-terminale du substrat d'une part, et, conjointement avec le Glu-386, de polariser la molécule d'eau catalytique d'autre part.

Ensuite, il a été démontré le rôle des résidus Asp-213 et Asp-218 dans la liaison du calcium dans le site actif de l'APA de souris. En effet, le modèle tridimensionnel montrait que l'atome de calcium est coordonné par les chaînes latérales acides de ces deux Asp ainsi que par le groupement carbonyle du Glu-215 et trois molécules d'eau. Les études structure-fonction par mutagenèse dirigée ont montré que les mutations conservatives de ces Asp permettaient une activation par le calcium des APA mutées similaire à l'APA sauvage, alors que les mutations non conservatives empêchaient le calcium d'activer l'APA. De plus, il a été montré que les mutations de ces résidus induisaient une perte de la spécificité de substrat de l'APA pour résidus N-terminaux acides en présence de calcium. Ainsi, les résidus Asp-213 et Asp-218 sont bien les résidus liant l'ion calcium dans le site actif de l'APA et participent à la spécificité de l'APA pour les substrats et les inhibiteurs acides en présence de calcium (Claperton et al., 2008).

Enfin, le modèle tridimensionnel de l'APA de souris a montré que le groupement hydroxyle du résidu Thr-348 pouvait interagir avec le groupement carboxylate de la chaîne latérale du Glu de l'inhibiteur GluPO_3H_2 . Les études structure-fonction par mutagenèse dirigée sur cette Thr ont montré que les mutations de ce résidu changeaient la spécificité de substrat de l'APA en absence de calcium qui devenait spécifique des substrats basiques. L'ajout de calcium au milieu réactionnel permettait de restaurer la spécificité de l'APA pour les substrats acides. Par contre, les études des pouvoirs

inhibiteurs de différents inhibiteurs d'aminopeptidases montraient que les mutants de la Thr-348 présentaient le même profil d'inhibition que l'APA sauvage en présence ou en absence de calcium. Ainsi cette étude a permis de démontrer l'implication du résidu Thr-348 dans la spécificité de substrat acide de l'APA (Claperon et al., 2009).

Les résultats de l'ensemble de ces études ont été validés par la structure cristallographique de l'APA humaine (Yang et al., 2013) et ont permis de réaliser une cartographie fonctionnelle du site actif de l'enzyme, nécessaire au développement d'inhibiteurs à la fois puissants et sélectifs de cette enzyme (**Figure 18**).

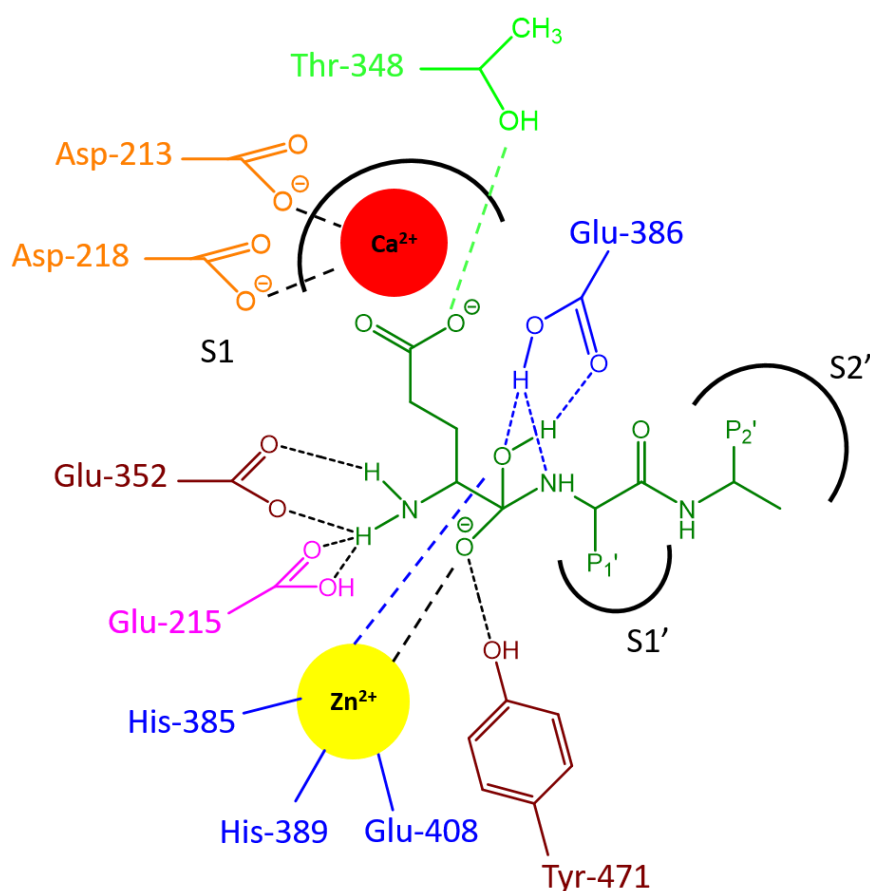


Figure 18 : Organisation du site actif de l'APA.

III) Objectifs de thèse

L'APA cérébrale constitue une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'hypertension artérielle et le développement d'inhibiteurs de cette enzyme à action centrale représente une nouvelle voie thérapeutique en vue de traiter certaines formes d'hypertension résistantes aux traitements actuels.

La résolution de la structure cristallographique de l'APA est un outil de premier ordre pour le développement de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme via des campagnes de criblages *in silico* de chimiothèques virtuelles ou par la conception de molécules assistée par ordinateur (drug design).

Afin de réaliser ces campagnes, un nouveau modèle tridimensionnel de l'APA a été construit en utilisant la structure cristallographique de l'APA humaine comme patron et l'ensemble des inhibiteurs de l'enzyme développés par le Professeur Bernard Pierre Roques, en collaboration avec notre laboratoire, ont été introduits dans ce modèle et de nouvelles interactions ont été observées.

L'objectif de ma thèse a consisté à :

- Caractériser pharmacologiquement le rôle du résidu Arg-878 de l'APA dans la spécificité de substrat de l'enzyme pour les résidus N-terminaux acides.
- Caractériser pharmacologiquement le rôle des résidus Arg-360 et Arg-378 de l'APA dans l'interaction avec les résidus P2' des inhibiteurs tripeptidiques.

Les résultats obtenus serviront, d'une part, à valider ce nouveau modèle tridimensionnel de l'APA et, d'autre part, à apporter les informations structurales nécessaires à l'initiation d'un criblage *in silico* de chimiothèques virtuelles en vue de découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'APA.

IV) Etudes structure-fonction sur le site actif de l'APA

1) Article 1 : Etude du rôle de l'arginine 878 de l'APA de souris dans la spécificité de substrat de l'enzyme (En révision)

a) Introduction

L'ensemble des études structure-fonction menées sur l'APA ont utilisé le modèle tridimensionnel de cette enzyme construit par homologie en utilisant la LTA4H comme patron (Rozenfeld et al., 2002, 2003, Claperon et al., 2008, 2009). Ce modèle est constitué des résidus 79 à 559 de l'APA et est donc amputé des 386 derniers résidus C-terminaux de la protéine participant, avec l'ensemble du domaine C-terminal, au rôle de chaperonne intramoléculaire (Rozenfeld et al., 2004). Très récemment, la structure de la partie extracellulaire de l'APA humaine a été résolue (résidus 76 à 956) (Yang et al., 2013). La superposition du cristal et du modèle tridimensionnel a montré, notamment au niveau du site actif, une concordance parfaite entre les résidus du cristal et ceux du modèle permettant de valider le modèle ainsi que les résultats des études structure-fonction précédentes.

De plus, l'étude de la structure de l'APA humaine cristallisée avec un glutamate a permis d'observer un résidu situé dans le domaine C-terminal, l'Arg-887 (Arg-878 de l'APA de souris), qui contribue à la spécificité de substrat de l'enzyme pour les résidus N-terminaux acides sans préciser le mode d'action de ce résidu (Yang et al., 2013).

Afin de préciser le rôle de l'Arg-878, un nouveau modèle tridimensionnel de l'APA a été construit sur la base de la structure cristallographique de l'enzyme. Dans ce modèle a été introduit l'EC33 qui présente une affinité 1000 fois supérieure à celle du Glu ($K_i=10^{-4}$ M) avec lequel a été stabilisé le cristal. Nous avons observé que le groupement guanidinium électropositif de l'Arg-878 interagit avec le groupement sulfonate électronégatif de l'EC33. Nous avons donc, par des études structure-fonction par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée, caractérisé le rôle du résidu Arg-878 dans la liaison de substrat ou d'inhibiteur ainsi que dans la spécificité de substrat de l'APA pour les résidus N-terminaux acides en absence ou en présence de calcium. Nous avons substitué le résidu Arg-878 soit par une Ala, soit par une Lys. Puis, nous avons vérifié que les enzymes mutées étaient exprimées à la membrane plasmique de façon similaire à l'APA sauvage. Ensuite, nous avons étudié les paramètres biochimiques et cinétiques des APAs recombinantes sauvage et mutées en utilisant soit un substrat acide (GluNA), soit un substrat neutre (AlaNA), soit un substrat basique (LysNA). Nous avons aussi caractérisé la sensibilité de ces enzymes au calcium. Enfin, nous avons comparé le pouvoir inhibiteur

de différents composés en présence ou en absence de calcium ciblant le sous-site S1 de l'APA sur les APAs sauvage ou mutées.

b) Discussion

Grâce à notre modèle tridimensionnel de l'APA humaine, nous avons montré que l'Arg-887 (Arg-878 de l'APA de souris) établit une interaction avec le sulfonate de la chaîne latérale de l'inhibiteur EC33 participant ainsi au sous-site S1.

La substitution de cette Arg par une Ala ou une Lys conduit à des enzymes s'exprimant à la membrane plasmique des cellules CHO exprimant de façon stable ces dernières, comme le montre les expériences d'immunofluorescence. Les formes membranaires présentent des formes matures de l'APA hautement glycosylée, avec une forme dimérique de 320 kDa et une forme monomérique de 160 kDa, observées par Western Blot.

Par la suite, nous avons caractérisé l'activation des enzymes mutées par le calcium. Ainsi, il a été montré que les enzymes mutées étaient activées par le calcium de la même façon que l'APA sauvage. Ainsi le résidu Arg-878 ne participe pas à la liaison du calcium dans le sous-site S1 de l'enzyme. Cependant, l'activité maximale des enzymes mutées R878A et R878K étaient diminuées d'un facteur 2 par rapport à celle de l'APA sauvage. Du fait que ces enzymes présentent un profil d'expression similaire à celui de l'APA sauvage, nous avons émis l'hypothèse que le résidu Arg-878 pourrait participer à la reconnaissance du substrat et à l'activité d'hydrolyse de l'APA.

Nous avons donc déterminé les paramètres cinétiques des enzymes mutées en absence et en présence de calcium, en utilisant du GluNA comme substrat et les avons comparés à ceux de l'APA sauvage. En absence de calcium, l'efficacité d'hydrolyse du GluNA par les enzymes mutées était fortement diminuée par rapport à celle de l'APA sauvage (26 fois pour le R878A et 281 fois pour le R878). Cette diminution est due à une forte diminution de l'affinité des enzymes mutées pour le substrat acide ainsi qu'à une légère diminution dans la vitesse d'hydrolyse du substrat. En présence de calcium, comme cela a déjà été montré par le passé, l'efficacité d'hydrolyse des substrats acides par l'APA augmente. Ceci passe par une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le substrat ainsi qu'à une augmentation de la vitesse d'hydrolyse. Ainsi, en présence de calcium, l'efficacité d'hydrolyse des enzymes mutées pour les substrats acides augmente, néanmoins, elle reste bien inférieure à celle de l'enzyme sauvage (20 fois pour le R878A et 4 fois pour le R878K). Encore, cette différence dans l'efficacité d'hydrolyse est due, pour l'APA mutante R878A, à une affinité et une vitesse d'hydrolyse du substrat GluNA plus faible que celle de l'APA sauvage. En revanche, pour le mutant R878K, seule l'affinité de l'enzyme pour le substrat acide est plus faible que l'APA sauvage. Ceci suggère que le résidu Arg-878, de par sa charge et la longueur de sa chaîne latérale, participe au complexe de Michaelis (formation du complexe enzyme-substrat) que ce soit en absence ou en présence de calcium mais est aussi impliqué dans la catalyse.

En effet, l'analyse des modèles tridimensionnels de l'APA sauvage ou mutées en présence de calcium a montré que les mutations induisaient des changements dans l'organisation du site actif de l'enzyme. Chacune entraînait une suppression (R878A) ou une diminution (R878K) de l'interaction entre le groupement carboxylate du substrat et la chaîne latérale du résidu, ce qui induit une diminution de l'affinité des enzymes pour le substrat acide. De plus, la chaîne latérale du mutant Lys, plus longue d'un carbone par rapport à l'Arg, augmente le volume du site actif de l'enzyme. Ceci permet une optimisation du positionnement de la molécule d'eau catalytique, ce qui permet de d'augmenter la vitesse d'hydrolyse par rapport au mutant Ala et à l'APA sauvage en présence de calcium. Ceci tend à confirmer que l'Arg-878 est située dans le sous-site S1 de l'APA et qu'elle puisse médier la spécificité de l'APA pour les résidus N-terminaux acides des substrats.

Afin de préciser le rôle de l'Arg-878, nous avons étudié le mode de liaison de différents inhibiteurs mimant le complexe de Michaelis comme les inhibiteurs thiolés, EC33, GluSH, MetSH et LysSH. Nous avons mesuré et comparés les pouvoirs inhibiteurs de ces molécules sur les APA sauvage et mutées en utilisant le GluNA avec ou sans calcium. Ces inhibiteurs interagissent avec l'enzyme via leur amine libre N-terminale, leur groupement thiol chélatant le zinc et les autres résidus du sous-site S1 avec leur chaîne latérale soit acide (EC33 et GluSH), soit neutre (MetSH), soit basique (LysSH). Nous avons également étudié le mode de liaison d'un inhibiteur de l'état de transition, le GluPO_3H_2 , qui mime les interactions entre le substrat et l'enzyme lors de cet état, notamment, par son groupement phosphonate remplaçant l'intermédiaire tétraédrique formé lors de la catalyse. Nous avons montré qu'en l'absence de calcium, l'APA mutée R878A est mieux inhibée par les inhibiteurs basique (LysSH) ou neutre (MetSH) que l'APA sauvage, alors que l'APA mutée R878K était moins bien inhibée par les inhibiteurs acide (GluSH) ou neutre que l'APA sauvage. En présence de calcium, le profil d'inhibition des APAs mutées est partiellement restauré avec une préférence pour les inhibiteurs acides ($\text{EC33} > \text{GluSH} > \text{MetSH} > \text{LysSH}$), démontrant que le calcium est le composant majeur de la spécificité de l'APA pour les inhibiteurs ayant un résidu N-terminal acide. Cependant, l'affinité de l'EC33 et du GluSH pour les APA mutées restent inférieures à celles pour l'APA sauvage (de 3 à 9 fois inférieure). Ceci suggère que l'interaction de la chaîne latérale acide de l'inhibiteur et l'APA requière une charge positive mais il faut également un positionnement adéquat de l'inhibiteur, assuré en partie par l'Arg-878. En effet, nous avons montré que le mutant R878K, bien que conservatif de l'Arg-878, est moins bien inhibé par l'EC33 et le GluSH que l'APA sauvage. Or, la Lys présente une chaîne latérale plus longue que l'Arg ce qui implique moins de liberté de positionnement pour l'inhibiteur et donc une affinité moins bonne pour l'enzyme mutée.

Nous avons montré que l'Arg-878 jouait un rôle dans l'établissement du complexe de Michaelis mais également dans la catalyse. Ainsi, nous avons étudié l'effet des mutations de l'Arg-878 sur le pouvoir

inhibiteur du GluPO_3H_2 en présence de calcium. Ainsi, nous avons montré que le GluPO_3H_2 inhibait les APAs mutées R878A et R878K, respectivement, 87 et 8 fois moins bien que l'APA sauvage. Ce comportement différent de l'inhibiteur entre les APA mutées est en accord avec ce que nous avons obtenu lors de la caractérisation des paramètres cinétiques du GluNA. Les simulations de dynamique moléculaire ont confirmé ces résultats en montrant que les mutations modifiaient aussi bien l'énergie d'interaction entre le GluPO_3H_2 et l'APA que le volume du site actif, impliquant des positionnements de l'inhibiteur différents selon chaque enzyme. La mutation de l'Arg-878 en Ala entraîne une forte diminution de l'énergie d'interaction entre le GluPO_3H_2 et le site actif de l'enzyme ce qui est dû à une modification majeure de l'environnement électropositif du sous-site S1. De plus, la plus forte interaction entre l'inhibiteur et le solvant observée chez ce mutant impacte négativement son affinité vis-à-vis de l'APA mutée R878A. La mutation de l'Arg-878 en Lys entraîne, quant à elle, une plus faible diminution de l'affinité du GluPO_3H_2 que le mutant R878A par rapport à l'APA sauvage. Ceci est probablement dû au groupement ϵ amine de la chaîne latérale de la Lys qui maintient l'environnement électropositif du sous-site S1. Cependant, la perte d'affinité de l'inhibiteur pour l'APA mutée R878K par rapport à l'APA sauvage peut-être due à une position inadéquate du carboxylate du GluPO_3H_2 du fait de l'augmentation du volume du sous-site S1 au cours de la dynamique.

Afin de confirmer l'hypothèse que l'Arg-878 est impliquée dans la spécificité de l'APA pour les résidus N-terminaux acides, nous avons étudié l'efficacité d'hydrolyse des APAs sauvage et mutées de différents substrats, soit neutre (AlaNA), soit basique (LysNA) en présence ou en absence de calcium et les avons comparés à ceux obtenus avec le substrat acide (GluNA). Ainsi, en absence de calcium, le profil d'hydrolyse de l'APA sauvage est : $\text{GluNA} > \text{LysNA} > \text{AlaNA}$. Ce profil est modifié pour l'APA mutée R878A ($\text{LysNA} > \text{AlaNA} > \text{GluNA}$) ainsi que pour l'APA mutée R878K ($\text{AlaNA} = \text{LysNA} \gg \text{GluNA}$). En présence de calcium, l'APA sauvage hydrolyse plus efficacement le substrat acide et présente le profil suivant : $\text{GluNA} \gg \text{LysNA} > \text{AlaNA}$. Ce profil est maintenu pour le mutant R878K mais présente une diminution de l'efficacité d'hydrolyse du GluNA. En revanche, l'APA mutée R878A hydrolyse avec la même efficacité le GluNA, le LysNA et l'AlaNA, confirmant ainsi l'hypothèse que l'Arg-878 participe, avec le calcium, à la spécificité de l'APA pour les substrats ayant un résidu N-terminal acide via l'interaction entre son groupement guanidinium et le groupement carboxylate du substrat. Nous avons également montré que, de par la longueur de sa chaîne latérale, l'Arg-878 permet un positionnement optimal du substrat pendant la catalyse ce qui assure une hydrolyse optimale de la liaison peptidique. La découverte de ce résidu apporte une nouvelle fonction au domaine C-terminal de l'APA qui, jusqu'alors, était uniquement considéré comme une chaperonne intramoléculaire (Rozenfeld et al., 2004). Le résidu Arg-878 est spécifique de l'APA, néanmoins, l'alignement de la structure cristallographique de l'APA humaine et de l'APN humaine montre qu'il se superpose parfaitement avec

le résidu Phe-896 de l'APN (Wong et al., 2012). L'APN ayant une spécificité de substrat neutre ou basique, on peut émettre l'hypothèse que cette Phe puisse interagir avec les groupements neutres ou avec le groupement amine des substrats basiques, via une interaction π -cation et participer à la spécificité de substrat de l'APN comme l'Arg-878 pour l'APA.

Il est également à noter que dans les dynamiques moléculaires utilisant des inhibiteurs du complexe de Michaelis, il n'est pas observé d'interaction entre le résidu Thr-348 qui avait été démontré comme participant à la spécificité de substrat de l'APA (Claperon et al., 2009). Le résidu Thr-348 correspond à l'Ala-351 dans l'APN humaine et également, aucune interaction n'a été observé entre les inhibiteurs du complexe de Michaelis co-cristallisés avec l'APN et ce résidu, suggérant qu'il n'ait pas de rôle dans la spécificité de substrat. Cependant, il a été montré que la Met-260 de l'APN d'*Escherichia. Coli* (APN *E.Coli*) et la Val-459 de l'aminopeptidase PfA-M1 de *P.falsiparum* (PfA-M1), correspondant aux résidus Ala-351 de l'APN humaine et Thr-348 de l'APA de souris, sont indirectement responsables de la spécificité de substrat de ces aminopeptidases (Dalal et al., 2013). En effet, il a été montré que le sous-site S1 de ces enzymes possédait la forme d'un cylindre où ces résidus sont situés à l'entrée. Des études de mutagenèse dirigée sur ces résidus ont montré que, selon la nature du résidu substituant, l'APN *E.Coli* et la PfA-M1 voyaient leur spécificité de substrat modifiée. Il a donc été conclu que la Met-260 de l'APN *E.Coli* et la Val-459 de la PfA-M1 imposent une organisation structurale du sous-site S1 et déterminant la spécificité de substrat des enzymes correspondantes (Dalal et al., 2013). Ainsi, le rôle de la Thr-348 serait de contraindre la structure du sous-site S1 de l'APA pour lui permettre d'accueillir préférentiellement les résidus N-terminaux acides des substrats. Cependant, une interaction entre ce résidu et le carboxylate du GluPO_3H_2 est observé, or cet inhibiteur est un analogue de l'état de transition, c'est-à-dire lorsque la réaction d'hydrolyse a déjà commencé. Le résidu Thr-348 aurait donc un rôle double, tout d'abord structural, en privilégiant l'entrée des résidus acides dans le sous-site S1, puis catalytique, en interagissant lors de l'état de transition avec le groupement carboxylate des substrats. Il y aurait donc un transfert d'interaction du carboxylate de l'Arg-878 à la Thr-348 permettant à l'Arg-878 d'effectuer son action de positionnement du substrat lors de la catalyse enzymatique.

2) Article 2 : Etude du rôle potentiel des résidus Arg-360 et Arg-378 dans le sous-site S2' de l'APA de souris (En préparation)

a) Introduction

Afin d'augmenter la sélectivité et la spécificité de molécules fondées sur l'EC33, des études ont cherché à trouver de nouvelles interactions avec les sous-sites S1' et S2' du site actif de l'APA par le développement d'inhibiteurs di- ou tripeptidiques. Ainsi, en ajoutant un résidu P1' ou P1' et P2' à l'EC33, il a été possible de connaître la préférence d'interaction des sous-sites S1' et S2' de l'enzyme. En effet, il a été montré que le sous-site S1' de l'APA interagissait préférentiellement avec les résidus Tyr ou Ile ou pseudo-Phe en position P1' des inhibiteurs di- ou tripeptidiques (David et al., 1999; Inguibert et al., 2005). Enfin, il a été montré que le sous-site S2' de l'APA liait spécifiquement les fonctions acides des résidus P2', Asp ou carboxyproline, des inhibiteurs tripeptidiques (David et al., 1999). Cependant, les résidus de l'APA formant les sous-sites S1' et S2' de l'enzyme restaient à définir.

La résolution récente de la structure cristallographique de l'APA humaine (Yang et al., 2013) associée à la modélisation moléculaire pourrait permettre de découvrir ces résidus. Ainsi, un nouveau modèle tridimensionnel de l'APA a été construit sur la base de la structure cristallographique de l'enzyme et les inhibiteurs dipeptidiques : NI929 (acide (3S,4S)-3-amino-4-mercapto-6-phényl-hexane-1-sulfonique) et tripeptidiques : CD409b-11 ([[(2S, 3R), 3-Amino-2-sulfhydryl-5-sulfonate]-pentanoyl]-(L)Tyr-(L)Asp-OH), CD497b ([[(2S, 3R), 3-amino-2-sulfhydryl-5-sulfonate]-pentanoyl]-(L)Ile-(L)((3S)-COOH)Pro-OH) et SC1021 ([[(2S, 3R), 3-Amino-2-sulfhydryl-5-sulfonate]-pentanoyl]-(L)Ile-(L)Asp-OH) ont été introduits dans ce modèle. De nouveaux résidus d'intérêts ont été observés et notamment les résidus Arg-360 et Arg-378 qui formeraient le sous-site S2' de l'APA et interagiraient avec la fonction acide du résidu P2' des inhibiteurs tripeptidiques.

Ainsi par mutagenèse dirigée, nous avons substitué l'Arg-360 et l'Arg-378 par un résidu Ala. Nous avons vérifié que les enzymes mutées R360A et R378A présentaient un profil d'expression similaire à celui de l'APA sauvage. Ensuite, nous avons caractérisé les paramètres cinétiques des différentes enzymes et déterminé leur sensibilité au calcium et à différents inhibiteurs mono-, di- ou tripeptidiques développés au laboratoire. Conjointement à ces expériences, les effets de ces mutations ont été étudiées par des expériences de modélisation et dynamique moléculaire sur le modèle tridimensionnel de l'APA.

b) Discussion

L'introduction des inhibiteurs dipeptidiques fondés sur l'EC33 (NI929 et EC33-Ile (CD424c, (((2S, 3R), 3-Amino-2-sulphydryl-5-sulfonate]-pentanoyl)-(L)Ile-OH))) n'ont pas permis de visualiser de résidus du sous-site S1' de l'APA interagissant directement avec le résidu P1' de ces inhibiteurs. Cependant, les simulations de dynamique moléculaire ont montré que l'Ile du CD424c et la pseudo-Phe du NI929 sont stabilisés dans un anneau lipophile délimitant l'entrée du sous-site S1. Ces résultats suggèrent que le sous-site S1' de l'APA est formé par cet environnement hydrophobe qui va forcer le substrat de l'APA (l'Ang II : Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) à se diriger vers le sous-site S1 et, une fois la liaison peptidique entre l'Asp¹ et l'Arg² de l'Ang II hydrolysée, expulser chaque produit de la réaction du site actif de l'APA (Asp et Ang III : Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe).

L'introduction des inhibiteurs tripeptidiques fondés sur l'EC33 (SC1021, CD497b et CD409b-11) ont montré des interactions possibles entre la fonction acide des résidus P2' de ces inhibiteurs et les chaînes latérales des résidus Arg-360 et Arg-378 du site actif de l'APA. La substitution de ces résidus en Ala n'affecte pas la maturation des protéines mutées, comme le montrent l'expression à la membrane plasmique et la taille des protéines recombinantes observées par immunofluorescence et Western Blot, respectivement. L'étude de l'effet de ces mutations sur l'activation de l'enzyme a montré que l'affinité du calcium pour les APAs R360A et R378A était identique à celle pour l'APA sauvage indiquant que ces résidus ne sont pas impliqués dans l'activation du calcium. Cependant, nous avons observé que les mutations de ces Arg en Ala entraînaient une chute dans l'activité de l'enzyme suggérant un rôle de ces résidus dans la catalyse enzymatique.

Par la suite, nous avons étudié l'impact de ces mutations sur la capacité de l'APA à hydrolyser le substrat acide GluNA. Ainsi, l'analyse des paramètres cinétiques montrent que l'activité d'hydrolyse du GluNA était légèrement diminuée pour le mutant R378A et fortement diminuée pour le mutant R360A par rapport à l'APA sauvage avec, pour chaque mutant, une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et une diminution de la vitesse d'hydrolyse du substrat par l'enzyme. Les simulations de dynamique moléculaire ont montré que le résidu Arg-378 se situe à l'entrée du site actif de l'APA. La substitution de l'Arg-378, un résidu basique, par une Ala, un résidu aliphatique, change l'environnement électropositif à l'entrée du site actif. Le substrat, ayant un résidu N-terminal acide, pourrait avoir plus de difficulté pour entrer dans le site actif de l'enzyme ce qui explique la chute d'affinité du substrat pour l'enzyme mutée. L'étude de la capacité des inhibiteurs mono-, di- et tripeptidiques de l'APA à inhiber l'APA mutée R378A a permis de montrer que les inhibiteurs mono- et dipeptidiques présentaient une affinité pour cette enzyme deux fois inférieure environ à celle du sauvage. Etant donné la localisation de ce résidu, la chute de l'affinité de ces inhibiteurs pour l'enzyme peut s'expliquer de la même façon que la chute d'activité enzymatique pour le substrat GluNA.

Néanmoins, les inhibiteurs tripeptidiques présentent une plus forte chute d'affinité pour l'APA mutée R378A par rapport à celle des inhibiteurs mono- ou dipeptidiques. En effet, les affinités du CD497b, du SC1021 et du CD409b-11 pour le mutant R378A sont respectivement 7, 10 et 62 fois inférieures à celles pour l'APA sauvage. Ceci ne peut s'expliquer que par la perte d'une ou plusieurs interactions entre l'inhibiteur et l'enzyme. Le résidu Arg-378 participerait donc bien au sous-site S2' de l'APA et interagit avec la ou les fonctions acides de la chaîne latérale des résidus P2' des inhibiteurs ou des substrats de l'enzyme.

L'étude du modèle tridimensionnel de l'APA a montré que le résidu Arg-360 est voisin du résidu Arg-378 et pourrait interagir avec la Gly-351 du motif GAMEN de l'APA. Or, il a été montré que la mutation de l'Asn-353 de ce motif entraîne une forte diminution de l'affinité de l'enzyme mutée pour le substrat GluNA et de sa vitesse d'hydrolyse (Iturrioz et al., 2001). Ceci suggère qu'en substituant le résidu Arg-360 par une Ala, il y a une modification de l'organisation du motif GAMEN entraînant une réorganisation du sous-site S1 et une diminution de l'activité d'hydrolyse de l'enzyme. De plus, l'étude des pouvoirs inhibiteurs des molécules mono-peptidiques a montré que le mutant R360A présentait une diminution d'un facteur 8 à 10 de l'activité d'inhibition des analogues du complexe de Michaelis et d'un facteur 415 pour l'inhibiteur de l'état de transition par rapport à l'APA sauvage. Ce qui suggère que le résidu a un rôle dans l'établissement du complexe de Michaelis et dans l'état de transition de la catalyse. Or, les simulations de dynamique moléculaire n'ont montré aucune interaction directe entre ces inhibiteurs mono-peptidiques ciblant le sous-site S1 et le résidu Arg-360. Ceci appuie l'hypothèse que les perturbations du sous-site S1 entraînées par la substitution de cette Arg en Ala sont dues à la déstabilisation du motif GAMEN de l'APA. L'étude du pouvoir inhibiteur des composés dipeptidiques sur le mutant R360A montrent une diminution de leur efficacité par rapport à celle sur l'APA sauvage du même ordre que celle observée pour le mutant R378A. Comparé aux inhibiteurs mono-peptidiques, le rapport entre le mutant R360A et l'APA sauvage se réduit, synonyme d'une interaction existante entre le résidu P1' de l'inhibiteur et le sous-site S1' de l'APA. Ainsi le résidu Arg-360 ne participe pas au sous-site S1' de l'enzyme. Par contre, l'étude du pouvoir inhibiteur des inhibiteurs tripeptidiques sur l'APA mutée R360A montre une chute importante de l'activité d'inhibition des molécules CD497b, SC1021 et CD409b-11 par rapport à l'APA sauvage d'un facteur 8, 7 et 49 respectivement. Ceci indique que le résidu Arg-360, lorsque muté en Ala, perd une interaction avec la fonction acide de la chaîne P2' des inhibiteurs tripeptidiques et donc que cette Arg participe, avec l'Arg-378, au sous-site S2' du site actif de l'APA.

Ainsi, il a été démontré que les résidus Arg-360 et Arg-378 forment le sous-site S2' du site actif de l'APA en interagissant, grâce à leur groupement guanidinium, avec la chaîne latérale acide des résidus P2' des substrats ou des inhibiteurs. De plus, le résidu Arg-360 participe à la structuration du sous-site S1

de l'enzyme en interagissant avec la Gly-351 du motif GAMEN de l'APA. Ces deux résidus sont conservés dans l'APN et la pLAP, le résidu Arg-360 est également conservé dans l'IRAP. Ainsi cette Arg (Arg-360 de l'APA) pourrait être un résidu structural fondamental de certaines aminopeptidases monozincs. Enfin, ces nouvelles découvertes sur le sous-site S2' du site actif de l'APA apportent des informations cruciales qui permettront d'améliorer notre modèle tridimensionnel et de développer un programme de criblage virtuel afin de découvrir, dans des chimiothèques de composés, de nouvelles classes d'inhibiteurs de l'APA ou des structures permettant d'améliorer la biodisponibilité de nos inhibiteurs.

Conclusions et perspectives

Afin de connaître l'organisation structurale du site actif de l'APA, notre laboratoire a entrepris des études structure-fonction sur le site actif de cette enzyme.

En l'absence de données structurales sur les aminopeptidases monozincs, les premières études ont été fondées sur la comparaison d'alignements de séquences d'aminopeptidases monozincs. Elles ont permis de proposer un premier schéma de l'organisation du site actif de l'APA ainsi qu'un mécanisme catalytique potentiel pour cette enzyme (Vazeux et al., 1996, 1997, 1998; Iturrioz et al., 2001) permettant d'expliquer le mode d'inhibition d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA ciblant le sous-site S1 développés en collaboration avec le laboratoire du Pr. Bernard Pierre Roques (Lejczak et al., 1993; Chauvel et al., 1994b; Vazeux et al., 1997). Grâce à ces informations, des études exploratoires des sous-sites S1' et S2' de l'APA ont été menées afin d'améliorer la spécificité et la sélectivité de l'EC33. Ces études ont montré la préférence du sous-site S1' de l'APA pour les résidus P1' neutres ou aromatiques et celle du sous-site S2' pour les résidus P2' acides sans pour autant déterminer quels résidus de l'APA constituaient ces sous-sites (David et al., 1999; Inguibert et al., 2005).

La résolution récente de la structure cristallographique de l'APA humaine nous a permis de valider l'ensemble des résultats issus des études structure-fonction par mutagenèse dirigée. Afin de mettre au point un programme de criblage *in silico* de chimiothèques virtuelles de molécules en vue de découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'APA, un nouveau modèle tridimensionnel de l'enzyme a été construit sur la base de la structure cristallographique de l'APA humaine. L'ensemble des inhibiteurs de l'APA ont été introduits successivement dans ce modèle et ont permis de visualiser des interactions nouvelles entre les inhibiteurs et l'APA dont nous avons étudié le rôle par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée.

Tout d'abord, nous avons montré que le résidu Arg-878 de l'APA de souris est situé dans le sous-site S1 de l'enzyme et, par son interaction avec la fonction acide de la chaîne latérale du résidu N-terminal des substrats, est responsable avec le calcium de la spécificité de substrat acide de l'enzyme. Son implication dans la catalyse enzymatique peut-être expliquée par la longueur de la chaîne latérale de ce résidu qui permet une orientation optimale du substrat lors de l'état de transition et permet au résidu Thr-348 d'interagir avec la fonction acide de la chaîne latérale du résidu P1 du substrat et de stabiliser cet état.

Ensuite, nous avons montré, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs di- et tri-peptidiques, que les résidus Arg-360 et Arg-378 de l'APA de souris sont situés dans le sous-site S2' du site actif et sont responsables de l'interaction avec la fonction acide de la chaîne latérale des résidus P2' des inhibiteurs ou des substrats. Aucun résidu du sous-site S1' n'a pu être identifié comme étant responsable de la liaison de la chaîne

latérale aliphatique ou aromatique du résidu P1' des inhibiteurs ou des substrats. Néanmoins, l'étude des dynamiques moléculaires montrent la stabilisation du résidu P1' des inhibiteurs di- et tripeptidiques au centre d'un anneau composé de résidus majoritairement non-chargés pouvant potentiellement former le sous-site S1'. Cet anneau aliphatique pourrait permettre l'entrée des substrats et contraindre la sortie des produits de la réaction enzymatique. Enfin, les expériences de mutagenèse dirigée et de dynamique moléculaire ont montré l'implication du résidu Arg-360 de l'APA dans la structuration du motif GAMEN au moyen d'une interaction avec la Gly-351 de ce motif. Cette même Arg, retrouvée dans plusieurs aminopeptidases monozincs, pourrait avoir un rôle caractéristique dans cette famille d'enzymes (**Figure 19**).

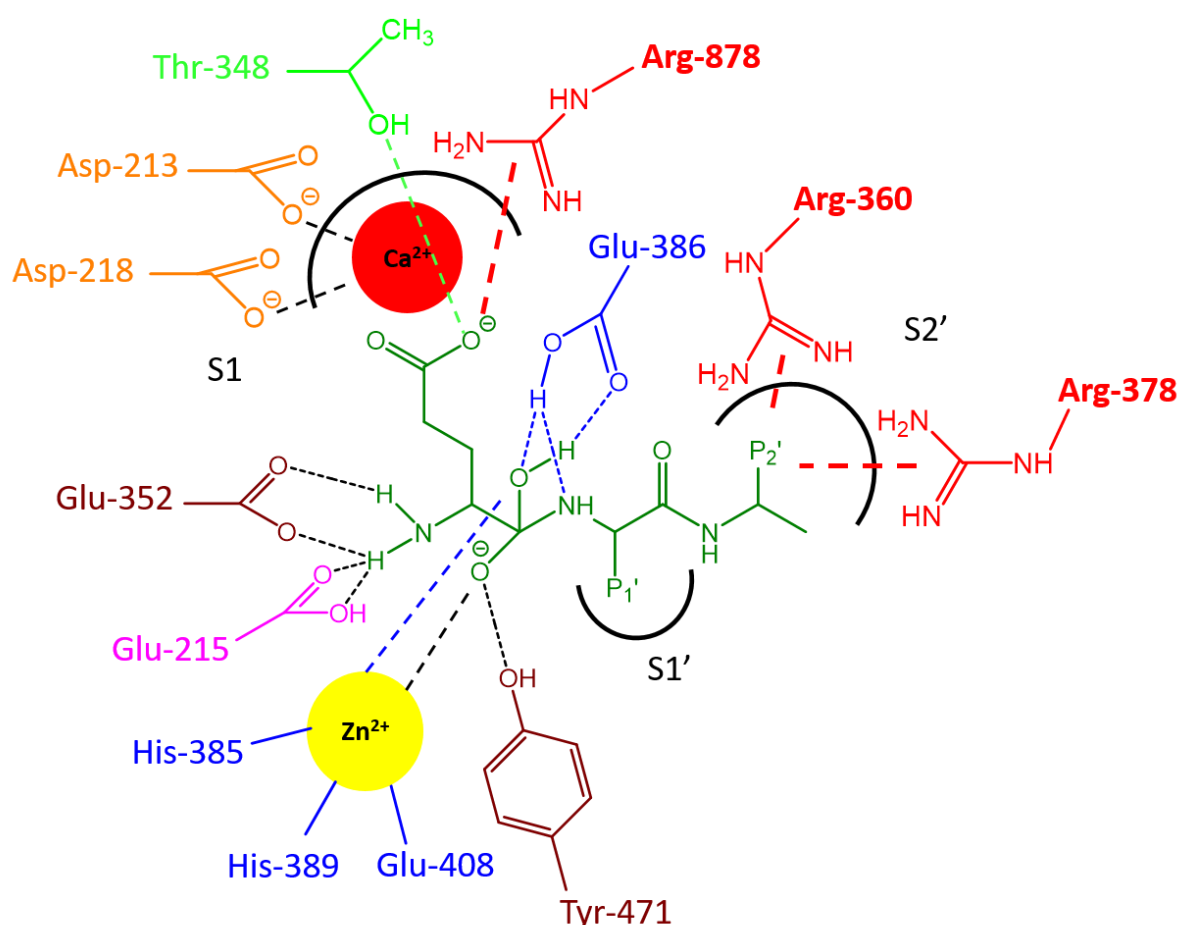


Figure 19 : Nouvelle représentation du site actif de l'APA sur la base des études structure-fonction.

Nos travaux vont permettre, d'une part, de mettre en place une campagne de criblage *in silico* de chimiothèques virtuelles afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'APA. D'autre part, nous allons pouvoir, grâce au modèle tridimensionnel de l'enzyme et à une approche rationnelle, chercher à développer de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme présentant d'autres groupements chélateurs de l'atome de zinc et interagissant avec les sous-sites S1' et S2' de l'enzyme. Enfin, de nouvelles études structure-fonction par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée pourront être menées en

étudiant le mode d'entrée de l'atome de calcium et des substrats dans l'enzyme. En effet, les études structure-fonction effectuées sur l'His-450 de l'APA de souris ont montré que les mutations de ce résidu entraînaient une incapacité des enzymes recombinantes à lier le calcium (Iturrioz et al., 2000). Or ce résidu est situé à l'entrée d'un tunnel donnant sur le sous-site S1 de l'APA, à environ 11 Å de ce dernier. Il serait intéressant d'étudier le rôle potentiel des résidus formant ce tunnel dans l'activation de l'APA par le calcium (**Figure 20**).

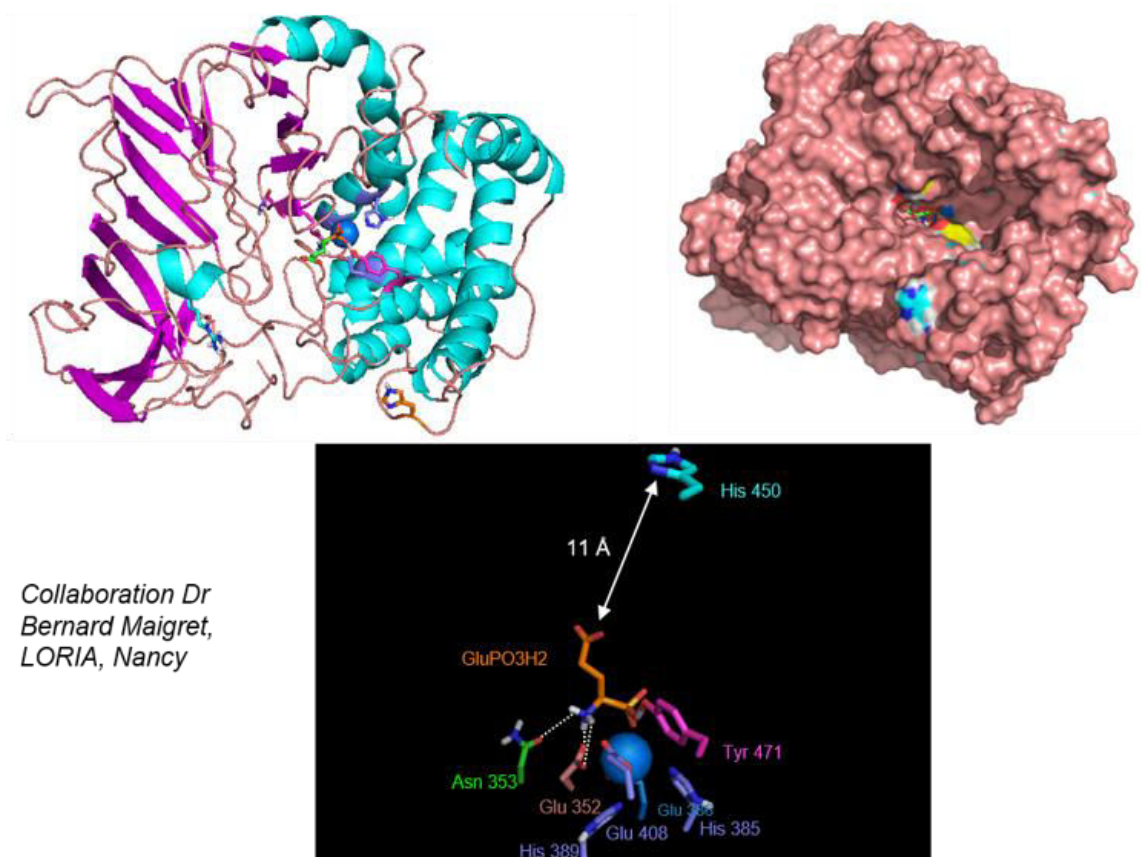


Figure 20 : Position de l'His-450 (en cyan) par rapport au sous-site S1.

Partie 2 : Le récepteur de l'apéline, cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et des désordres hydriques

Chapitre 1 : Le récepteur de l'apéline, un récepteur couplé aux protéines G

I) Structure et classification

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont issus d'une grande famille de protéines membranaires. Ils sont aussi appelés récepteurs à sept domaines transmembranaires (TM) du fait de la présence de sept hélices α hydrophobes traversant la membrane plasmique de la cellule. Ces boucles sont connectées entre elles par trois boucles extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3) et par trois boucles intracellulaires (ICL1, ICL2 et ICL3). Les boucles ECL1 et ECL2 sont reliées par un pont disulfures entre deux de leurs Cys. Le domaine N-terminal des RCPGs est extracellulaire et comporte des sites de glycosylation alors que le domaine C-terminal est intracytoplasmique et comporte des sites de phosphorylation. Il existe peu d'identité de séquence protéique entre les RCPGs. Néanmoins, les TMs sont plus conservés que les boucles extra- et intracellulaires et il existe certaines séquences consensus des RCPGs, comme le motif DRY situé dans le TM2 ou le motif NPxxY situé dans le TM7. La caractérisation de ces motifs parmi de nombreux RCPGs a montré leur importance dans l'intégrité structurale et dans les mécanismes d'activation de ces récepteurs (Venkatakrishnan et al., 2013). Les ligands agonistes des RCPGs sont de natures multiples. En effet, ils peuvent être des acides aminés (acide glutamique...), des amines (acétylcholine...), des nucléosides (adénosine...), des nucléotides (ATP...), des lipides (prostaglandines...), des peptides (apéline...), du rétinol (rhodopsine...) des ions (Ca^{2+} ...), des molécules sensorielles (phéromones...) ou encore des protéines (chimiokines...).

Du fait de la diversité des RCPGs, il est difficile d'établir une classification prenant en compte l'ensemble des aspects structuraux et pharmacologiques de ces récepteurs. Néanmoins, plusieurs classifications ont été établies prenant en compte, soit la nature du ligand des RCPGs (SwissProt) ; soit les identités de séquences protéiques entre RCPGs (GPCRDb) (Kolakowski, 1994; Horn et al., 1998, 2003) ; soit l'analyse phylogénétique des gènes codant les RCPGs (GRAFS) (Fredriksson et al., 2003; Schiöth and Fredriksson, 2005). Cette classification se base uniquement sur les distances phylogénétiques entre séquences voisines et non sur les aspects pharmacologiques permettant une classification des RCPGs en 5 familles (**Figure 21**) :

- Glutamate
- Rhodopsine
- Adhesion
- Frizzled/ Taste 2
- Sécrétine

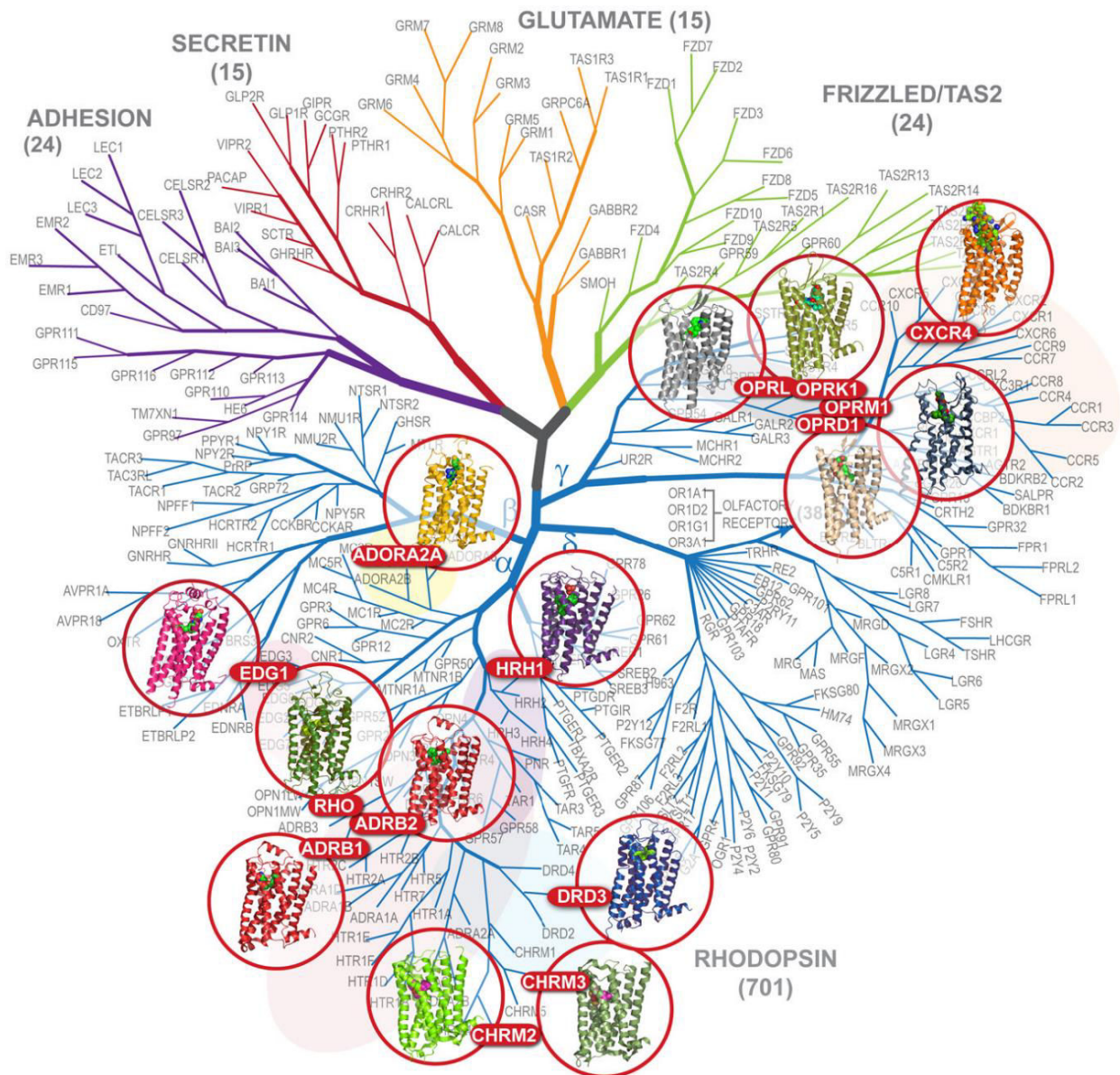


Figure 21 : Arbre phylogénétique des RCPGs construit à partir de la méthode GRAFS présentant les structures cristallographiques de récepteurs appartenant à la branche Rhodopsine (Katritch et al., 2013)

La famille « **Glutamate** » est constituée des récepteurs métabotropiques du Glu (mGluRs), de l'acide γ -amino butyrique (GABA), des récepteurs gustatifs et des récepteurs sensibles au calcium qui détectent les concentrations extracellulaires de calcium dans les glandes parathyroïdes. Les RCPGs constituant cette sous-famille possèdent un large domaine N-terminal extracellulaire, d'environ 600 résidus, jouant un rôle clé dans la liaison du ligand et dans l'activation du récepteur. De nombreuses structures cristallographiques de RCPGs de cette famille sont aujourd'hui résolues (Doré et al., 2014; Lee et al., 2014).

La famille « **Rhodopsine** » comporte la majorité des RCPGs et est divisée en 4 sous familles : α , β , γ et δ . Au sein de ces sous-famille on retrouve notamment les récepteurs de la rhodopsine, les récepteurs adrénergiques, les récepteurs olfactifs, les récepteurs des amines et des nucléotides et les récepteurs peptidiques. Les récepteurs de cette famille présentent certains résidus et motifs conservés. Tout d'abord, ils possèdent majoritairement au niveau du TM I une asparagine (Asn) (98 %, N^{1.50} selon la nomenclature de Ballesteros et Weinstein dont le premier chiffre indique dans quel TM se situe le résidu et dont le second indique la position de ce résidu par rapport au plus conservé servant de référence et arbitrairement assigné à 50 (Ballesteros and Weinstein, 1995)), au niveau du TM II un Asp (90%, D^{2.50}), au niveau du TM III, une Arg (95%, R^{3.50}), au niveau du TM IV un Trp (97%, W^{4.50}), et au niveau des TM V, VI et VII une Pro (78%, P^{5.50} ; 99% P^{6.50} ; 88% P^{7.50}) (Isberg et al., 2015). Ensuite, ils présentent un pont disulfure entre une Cys de l'ECL1 et une Cys de l'ECL2 (Congreve et al., 2011). Enfin, ils présentent une séquence consensus de cette famille, le motif NPXXY situé dans le TM VII (Chen et al., 1990). Dans la majeure partie des RCPGs de cette famille, le site de liaison du ligand endogène se trouve localisé dans une poche formée par les TM et les boucles extracellulaire du récepteur. Cependant, certains récepteurs comme les récepteurs aux glycoprotéines (récepteur de l'hormone lutéinisante (LH), récepteur de l'hormone folliculostimulante (FSH), récepteur de l'hormone thyroïdostimuline (TSH) et récepteur de l'hormone luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)) présentent un site de liaison au niveau de la queue N-terminale. Les récepteurs de cette famille sont ceux dont les structures cristallographiques ont été le plus résolues avec pas moins de cent structures pour une trentaine de récepteurs différents (D. Zhang et al., 2015; Wacker et al., 2017; Sun et al., 2017).

La famille « **Adhésion** » est constituée des récepteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire. Ces RCPGs présentent des répétitions de domaines de type EGF ou muscin et/ou des domaines riches en Cys situés à leur extrémité N-terminale. Cette région est très variable et peut compter de 200 à 2800 résidus. Il n'existe aujourd'hui pas de structure cristallographique de RCPGs de cette classe, néanmoins des modèles tridimensionnels par modélisation moléculaire ont été construits par homologie avec les récepteurs de la famille des sécrétine notamment (de Graaf et al., 2016).

La famille « Frizzled/Taste 2 » est divisée en deux sous-familles : Frizzled et Tas2. Les récepteurs Frizzled ont un rôle physiologique fondamental dans le développement embryonnaire ainsi que dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Les récepteurs Tas 2 regroupent les récepteurs gustatifs de type 2. La structure cristallographique d'un des membres de cette famille, le récepteur *smoothed*, a aujourd'hui été résolue (Wang et al., 2013).

La famille « Sécérétine » est constituée de RCPGs capables de lier des hormones peptidiques (sécérétine, glucagon, calcitonine...). Ils présentent un domaine N-terminal riche en Cys formant des ponts disulfures entre elles qui, avec les boucles extracellulaires du récepteur, forment un site de liaison liant leur ligand endogène. Les structures cristallographiques de deux membres de cette famille, les récepteurs humains au glucagon et au facteur de libération de la corticotrophine, ont été aujourd'hui résolues (Hollenstein et al., 2013; Siu et al., 2013).

II) Mode d'action des RCPGs

1) Les ligands

La réponse cellulaire d'un RCPG est liée à la capacité de son ligand à interagir avec lui mais aussi à la nature de cette interaction. En effet, en se liant, le ligand stabilise le récepteur dans une conformation spécifique induisant le couplage ou non du récepteur à la protéine G, l'activation ou non de cette dernière ainsi que l'activation ou non des autres voies de signalisation contrôlées par le RCPG.

Suivant les ligands, la liaison à un récepteur R n'entraîne pas les mêmes effets maximums ($E_{\max}$ ou efficacité maximale). En effet, chaque ligand d'un récepteur donné peut avoir une puissance de liaison différente, illustrée par la concentration efficace 50 (EC_{50}) ou la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) qui correspondent, respectivement, à la concentration de ligand nécessaire à atteindre 50 % de l' $E_{\max}$ et la concentration de ligand nécessaire à inhiber 50 % de l' $E_{\max}$ (**Figure 21**). Les informations apportées par l' EC_{50} et l' IC_{50} permettent ainsi de comparer entre eux des molécules agissant sur un même RCPG.

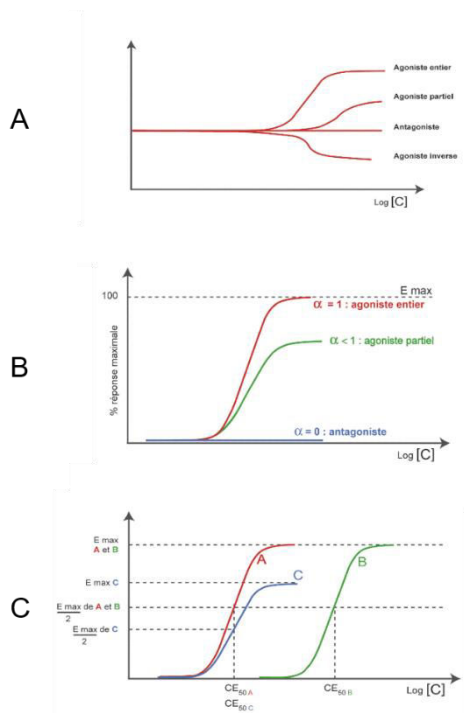


Figure 22 : Caractérisation des différents ligands pouvant interagir avec un RCPG.

(A) Activité des RCPG en fonction du type de ligand, (B) Activité intrinsèque α des différents types de ligand, (C) Comparaison de la puissance de différents agonistes (A, B et C) d'un même récepteur, caractérisée par la CE_{50} .

a) Les ligands orthostériques : Notions d'agonisme et d'antagonisme

Suivant le ligand lié à un récepteur donné, les réponses pharmacologiques associées peuvent différer. En effet, selon son E_{max} , un ligand pourra être considéré soit comme un agoniste entier, soit comme un agoniste partiel, soit comme un antagoniste ou soit comme un agoniste inverse. Chacune de ces catégories de ligands se fixent au niveau d'un site de liaison, spécifique à chaque classe de RCPG, et correspondant au site de liaison du ligand naturel. L'ensemble de ces ligands sont appelés ligands orthostériques.

Tout d'abord, les agonistes entiers sont caractérisés par un effet maximum correspondant à celui du ligand naturel ($E_{max} = 1$). Les agonistes partiels sont des ligands dont l'amplitude de l'effet maximum est plus faible que celle du ligand naturel ($0 < E_{max} < 1$). Les antagonistes sont des ligands n'ayant aucune activité mais qui, par compétition, vont réduire la liaison des autres ligands orthostériques ($E_{max} = 0$). Enfin, les agonistes inverses induisent des effets pharmacologiques opposés à ceux du ou des ligands naturels du récepteur. Ils ne sont pas considérés comme des antagonistes car ils induisent des changements conformationnels du récepteur, différents de ceux induits par les ligands naturels. ($E_{max} < 0$).

b) Les ligands allostériques

A l'instar des enzymes, il existe des ligands des RCPGs qui ont la capacité de se lier au récepteur ailleurs qu'au niveau du site de liaison orthostérique. On parle alors de ligands non-compétitifs ou ligands allostériques ou encore modulateurs allostériques.

Ces ligands n'entrent pas en compétition avec les ligands du récepteur mais ils vont pouvoir moduler l'activité de ce dernier. Les ligands allostériques présentent des avantages non-négligeables par rapport aux ligands orthostériques. En effet, leurs effets sont saturables, c'est-à-dire qu'ils n'entraînent pas d'effets secondaires au-delà d'un certain seuil d'administration. Leurs effets sont également limités dans le temps puisqu'ils dépendent du ligand endogène et de son lieu d'action. Enfin, les ligands allostériques sont plus sélectifs que les ligands orthostériques qui peuvent agir, s'ils existent, sur différents sous-types d'un même RCPG (Christopoulos and Kenakin, 2002; May et al., 2007) (**Figure 23**).

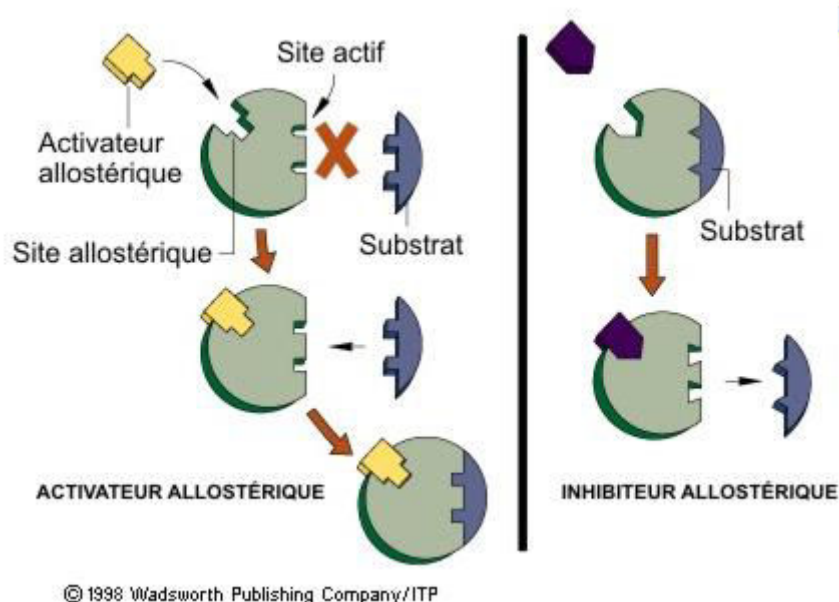


Figure 23 : Exemple de site de liaison orthostérique et allostérique.

c) Les ligands biaisés

Pendant longtemps, on a pensé que les RCPGs liaient des ligands agonistes qui induisaient un couplage du récepteur à sa protéine G et une activation de cette dernière alors que les ligands antagonistes bloquaient l'activation du récepteur en empêchant, par compétition, la liaison du ligand agoniste. Ainsi, la fonctionnalité des RCPGs était interprétée comme permettant l'activation ou l'inhibition d'une voie de signalisation donnée. Il est aujourd'hui établi que nombre de RCPGs peuvent lier différentes protéines G (Kelly et al., 1985; Murayama and Ui, 1985; Brown and Goldstein, 1986; Burch et al., 1986),

recruter différentes β -arrestines (Benovic et al., 1987; Lohse et al., 1990; Ferguson et al., 1996b), être phosphorylés par différentes kinases (GRKs) (Benovic et al., 1985; Nambi et al., 1985; Bouvier et al., 1987, 1988) et activer différents effecteurs (Azzi et al., 2003; Baker et al., 2003; Gbahou et al., 2003; Wei et al., 2003) dont l'ensemble va permettre la régulation de voies de signalisations différentes.

Du fait de cette multitude de régulations possibles par les RCPGs, il a été émis l'hypothèse que la liaison d'un ligand entraînerait la stabilisation du récepteur dans un état donné permettant la signalisation de voies données et que des ligands d'un même récepteur mais de structures différentes pourraient stabiliser le récepteur dans des conformations différentes et activer des voies de signalisation distinctes (Kenakin and Morgan, 1989). Des études ont permis de vérifier cette hypothèse (Spengler et al., 1993; Eason et al., 1994; Kenakin, 1995) et d'établir la théorie de la sélectivité fonctionnelle des RCPGs et de l'existence des ligands biaisés (Jarpe et al., 1998; Costa-Neto et al., 2016; Gundry et al., 2017). Ainsi, les agonistes d'un récepteur activant préférentiellement la signalisation dépendant de la protéine G sont dit agonistes biaisés vis-à-vis de la protéine G et ceux activant préférentiellement la signalisation dépendant de β -arrestine sont dit agonistes biaisés vis-à-vis de la β -arrestine (**Figure 24**).

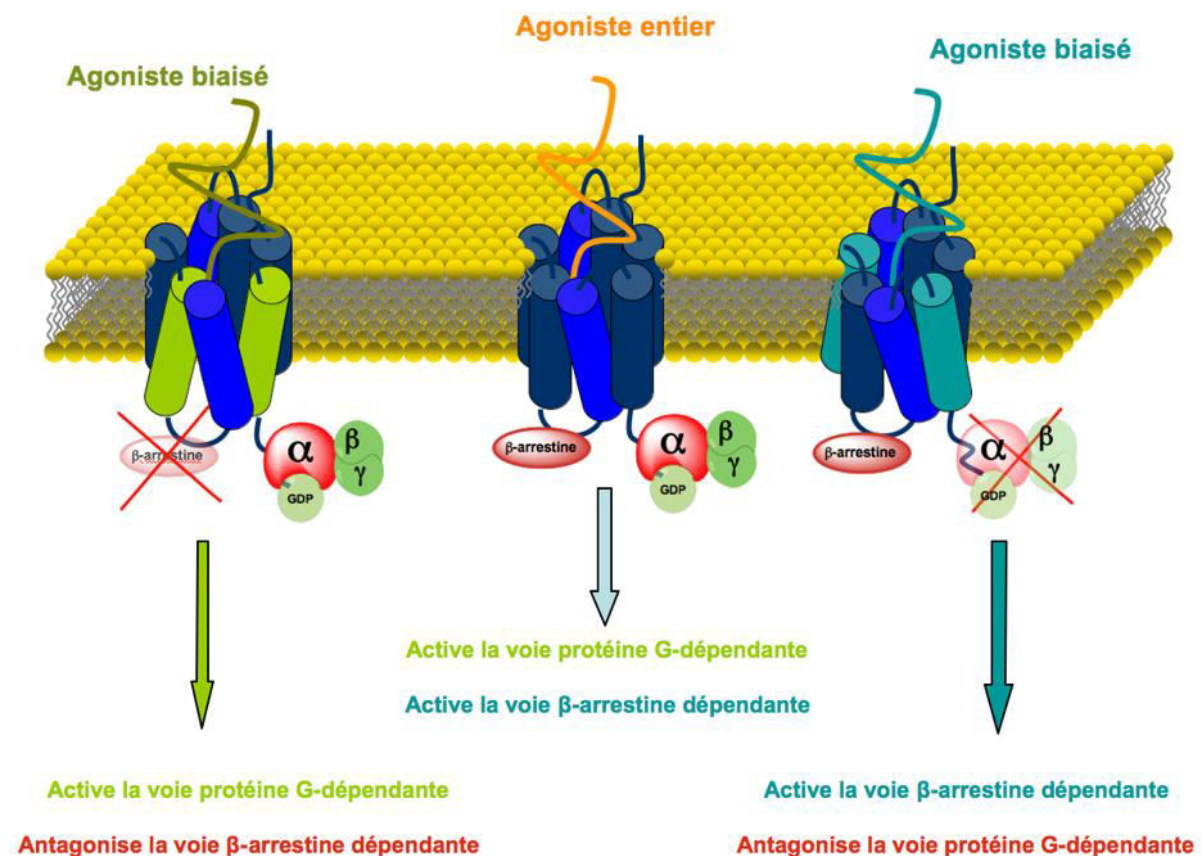


Figure 24 : Effet de la liaison d'agonistes biaisés sur la signalisation intracellulaire (Thèse Romain Gerbier 2011).

2) Les protéines G hétérotrimériques

La protéine G est composée de trois sous-unités : $G\alpha$ (39-55 kDa), $G\beta$ (36 kDa) et $G\gamma$ (6 kDa). La sous-unité $G\alpha$ interagit avec la partie intracellulaire du récepteur (entre le TM5, l'ICL2 et le TM6) via son hélice $\alpha 5$ C-terminale alors que les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ forment un complexe $G\beta\gamma$ indissociable (Higgins and Casey, 1994). De plus, la protéine G possède une activité GTPasique au niveau de sa sous-unité $G\alpha$ qui, dans l'état inactif du récepteur, possède une molécule de Guanosine DiPhosphate (GDP). Lors de l'activation du récepteur, la molécule de GDP est expulsée de la sous-unité α et va être remplacée par une molécule de Guanosine TriPhosphate (GTP), en excès dans le cytoplasme. Ceci va induire des changements conformationnels au sein de la protéine G entraînant la dissociation de la sous-unité $G\alpha$ du complexe $G\beta\gamma$ et du récepteur. Cette dissociation va permettre l'activation des deux entités de la protéine G qui vont agir sur des protéines effectrices comme l'adénylate cyclase (AC), la phospholipase $C\beta$ (PLC β) et d'autres protéines produisant des seconds messagers. Grâce à son activité GTPase intrinsèque, la sous-unité $G\alpha$ va hydrolyser la molécule de GTP en GDP permettant la reformation du complexe hétérotrimérique $G\alpha\beta\gamma$. Ce cycle d'échange va perdurer tant que le ligand agoniste est lié à son récepteur et/ou que le système n'est pas désensibilisé (Bornancin et al., 1989; Preinerger and Hamm, 2004; Oldham and Hamm, 2008; Duc et al., 2015, 2017). Ces mécanismes moléculaires impliquant de nombreux changements conformationnels de la protéine G hétérotrimérique ont pu être mesurés par l'apport des biosenseurs de Bioluminescence Resonance Energy Transfert (BRET) (Galés et al., 2006) (**Figure 25**).

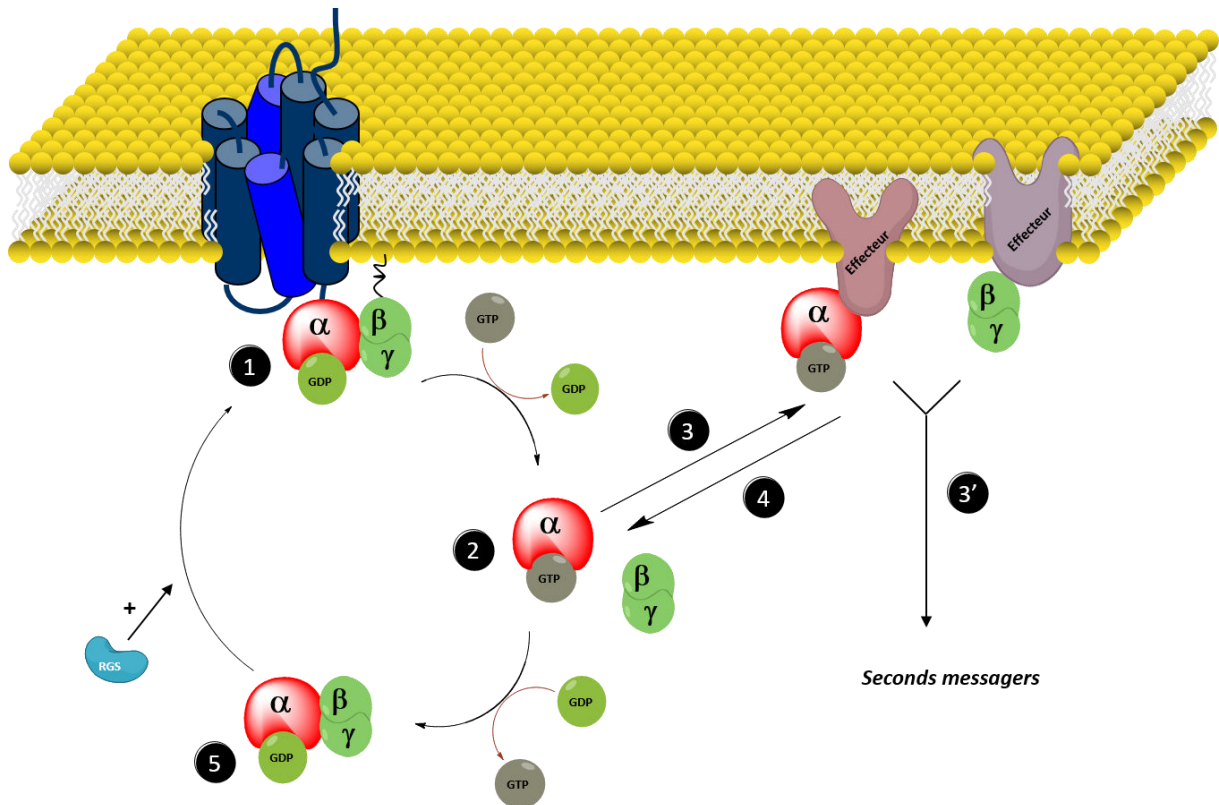


Figure 25 : Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques (Thèse Romain Gerbier, 2011).

La liaison d'un agoniste au récepteur va induire l'activation de la protéine G hétérotrimérique (1). La GDP associé à la sous-unité G_α va être libérée et une molécule de GTP, présente en très haute concentration dans la cellule, va alors se fixer à sa place (2). La protéine hétérotrimérique va alors se dissocier avec, d'un côté, la sous-unité G_α et de l'autre, le complexe dimérique $G\beta\gamma$ qui vont chacun de leur côté activer des effecteurs et déclencher différentes cascades de signalisation (3 et 3'). Par son activité enzymatique inhérente, la sous-unité G_α va éventuellement hydrolyser la GTP en GDP, permettant de se réassocier avec $G\beta\gamma$ pour redémarrer un nouveau cycle (4 et 5).

a) La sous-unité G_α

i) Structure de la sous-unité G_α

Les différentes résolutions de la structure cristallographique de la sous-unité G_α ont permis de montrer que celle-ci présente un domaine de type Ras et un domaine en hélices α dont l'interface présente un site de liaison nucléotidique (Coleman et al., 1994; Jones et al., 2011). Le domaine de type Ras possède l'activité GTPase, permettant d'hydrolyser le GTP en GDP, ainsi que les sites de liaison du complexe $G\beta\gamma$. La partie N-terminale de la sous-unité G_α est myristoylée permettant l'ancrage de la protéine G à la membrane plasmique (Degtyarev et al., 1994; Preinerger et al., 2003). Le site de liaison nucléotidique se trouve enfoui entre quatre régions flexibles (une longue boucle et trois tours) qui vont permettre l'ancrage et l'hydrolyse du GTP en GDP (Coleman et al., 1994) (**Figure 26**).

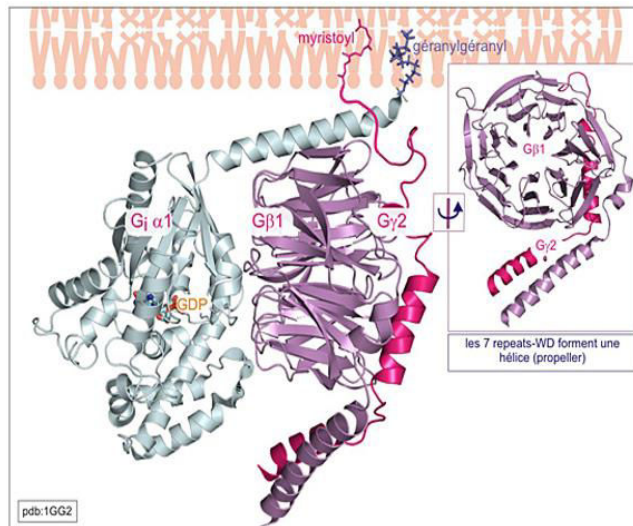


Figure 26 : Structure cristallographique protéine G s'attachant à la membrane plasmique.

ii) Les sous-unités G α

Dans le génome humain, il existe 16 gènes codant pour 23 protéines G α différentes que l'on peut classer en quatre catégories distinctes (Simon et al., 1991) :

- La sous-unité G α_s qui permet la stimulation de l'AC (Ross and Gilman, 1977). Elle conduit à la production d'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPC) qui peut ainsi activer la protéine kinase A (PKA) qui va réguler l'activité des canaux sodium voltage dépendant ou le canal ionique à calcium afférent.
- La sous-unité G α_i qui permet l'inhibition de l'AC conduisant ainsi à une inhibition de la production d'AMPC (Hildebrandt et al., 1983). La sous-unité G α_i active directement la protéine kinase v-src sarcoma (c-SRC) qui permet l'activation du facteur de transcription Signal Transducer and Activator Factor 3 (STAT3) (Ma and Huang, 2002). Elle régule également l'action de la GTPase RAP1 (RAP1GAP1) qui inhibe l'activité du gène v-raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1 (BRAF) , via la voie des MAP kinases (Weissman et al., 2004). Elle est inhibée par les protéines régulatrices des protéines G (RGS7, RGS10, RGS11 et RGS18), ainsi que par la cavéoline 1 (Zhong and Neubig, 2001; Minshall et al., 2002).
- La sous-unité G α_q qui permet l'activation de la phospholipase C β (PLC β). Cette dernière va hydrolyser le phosphatidyl inositol bisphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). Les IP₃ vont agir au niveau du cytoplasme en s'associant au réticulum endoplasmique (RE) et provoquant la libération cytosolique de calcium qui par exemple, au niveau du cœur (ventricule gauche) induit la contractilité cardiaque. Le

calcium sécrété va permettre, avec le DAG, l'activation de protéines sérine (Ser)/thréonine (Thr) calcium dépendante (PKC) (Cockcroft and Gomperts, 1985) au niveau de la membrane plasmique. La sous-unité $G\alpha_q$ présente d'autres effecteurs puisqu'elle active le facteur d'échange p63RhoGEF ainsi que la Burton's Tyrosine Kinase (Btk). Elle inhibe la Phosphoinositide 3 kinase de type 1a (PI_3K). Elle est inhibée par la G Protein Regulated Kinase 2 (GRK2). (Litosch, 2016).

- Les sous-unités $G\alpha_{12/13}$ qui régulent de nombreuses fonctions cellulaires comme l'agrégation plaquettaire, l'apoptose, la formation de jonctions cellulaires ou la motilité cellulaire (Strathmann and Simon, 1991). Ces sous-unités activent directement certaines RH-RhoGEFs comme la p115Rho-GEF qui vont réguler l'activité de la GTPase Rho (Suzuki et al., 2009).

b) La sous-unité $G\beta\gamma$

i) Structure de la sous-unité $G\beta\gamma$

La sous-unité $G\beta$ est formée de deux domaines. L'un correspond à la partie N-terminale et présente la topologie d'une hélice α . L'autre correspond au reste de la protéine et est formé de sept brins β s'organisant sous la forme d'un tonneau β antiparallèle. La sous-unité $G\gamma$ possède deux domaines formés chacun d'une hélice α . Celle de la partie N-terminale va interagir avec l'hélice N-terminale de la sous-unité $G\beta$ tandis que l'hélice C-terminale va interagir avec le feuillet β de la sous-unité $G\beta$. L'extrémité C-terminale de la sous-unité $G\gamma$ est prénylée ce qui permet un ancrage à la membrane plasmique (Lambright et al., 1996; Sondek et al., 1996; Rasmussen et al., 2011).

ii) Les sous-unités $G\beta\gamma$

Dans le génome humain, il existe six gènes codant pour la protéine $G\beta$ et douze codant pour la protéine $G\gamma$ (Oldham and Hamm, 2008). Toutes les combinaisons existent sauf le complexe $G\beta_2\gamma_1$ (Schmidt et al., 1992). Selon la combinaison, le complexe $G\beta\gamma$ induit une activation de l'effecteur cible de la sous-unité $G\alpha$ avec plus ou moins d'efficacité. En effet, il a été montré qu'après la stimulation du récepteur de l'adénosine A2a, le niveau activation de l'AC via la protéine $G\alpha_s$ était dépendant de la sous-unité de $G\beta$ du complexe $G\beta\gamma_2$ (McIntire et al., 2001) Ainsi, le complexe $G\beta\gamma$ permet de moduler le signal induit par l'activation de la sous-unité $G\alpha$. Enfin, le complexe $G\beta\gamma$ peut également réguler de nombreuses voies de signalisation, indépendamment de la sous-unité $G\alpha$, comme les isoformes de l'AC, de la $PLC\beta$

ou de la PI₃K, les canaux calcium voltage dépendant, etc.. (Yamauchi et al., 1999; Lehmann et al., 2008; Khan et al., 2013).

3) La β -arrestine et l'internalisation des RCPGs

Les RCPGs s'internalisent sous l'action de ligands agonistes. Cette internalisation a pour rôle de désensibiliser les récepteurs afin d'arrêter leur activation par leur ligand. Ce processus débute par le recrutement de kinases, soit résultantes de l'activation des effecteurs (PKA ou PKC), soit spécifiques aux RCPG (GRK pour G-protein coupled Receptor Kinase) (Ferguson et al., 1996a), qui vont phosphoryler le récepteur au niveau de ses boucles intracellulaires et de sa queue C-terminale cytosolique (Premont and Gainetdinov, 2007). La phosphorylation du récepteur entraîne le recrutement de β -arrestines qui vont permettre l'endocytose des récepteurs (Ferguson et al., 1996a) (**Figure 27**). Les β -arrestines jouent le rôle de protéines d'échafaudages moléculaires qui vont recruter les molécules de clathrines et d'AP-2 et permettre ainsi la formation de puits recouverts de clathrine entraînant l'invagination de la membrane plasmique et l'endocytose du complexe ligand/récepteur (Laporte et al., 2000). Les vésicules d'endocytose vont fusionner entre elles et former des endosomes qui vont soit emprunter la voie de recyclage vers la membrane, soit la voie de dégradation lysosomiale (**Figure 28**).

Les β -arrestines partagent une forte identité de séquence protéique entre elles (78%). Néanmoins, il existe des différences dans leur spécificité d'interaction avec les récepteurs. En effet, certains RCPGs sont capable de s'internaliser uniformément sous l'action de chaque protéine alors que d'autres ne peuvent s'internaliser que grâce à une seule β -arrestine (Kohout et al., 2001).

Il existe trois isoformes de β -arrestine (1, 2 et 3) que peuvent lier les RCPGs. Le recrutement des β -arrestines aux RCPGs bloque la signalisation protéine G-dépendante du fait de l'encombrement stérique de l'association du récepteur à la protéine G. Ce recrutement permet également l'activation de kinases intracellulaires conduisant à l'activation de secondes voies de signalisations indépendamment de l'activation des protéines G (Shenoy and Lefkowitz, 2003). Néanmoins, il a été montré que, lors de l'internalisation du RCPG, la β -arrestine pouvait être toujours complexée au récepteur, formant un super-complexe endosome-RCPG-Protéine G- β -arrestine qui présentait une signalisation cellulaire dépendante de la protéine G continue (Thomsen et al., 2016). Il a également été montré que suivant la conformation qu'adopte la β -arrestine, la signalisation, la désensibilisation et le recyclage du récepteur étaient modifiées (Lee et al., 2016; Cahill et al., 2017). Ainsi, la réponse cellulaire induite par l'activation du RCPG va être médiée suivant la façon dont la β -arrestine interagit avec le RCPG et la conformation qu'elle adopte.

Un RCPG présente donc une multitude de combinaisons de régulations possibles, que ce soit suivant le type de protéine G avec lequel il est couplé, mais aussi suivant son interaction avec la β -arrestine et la façon donc il s'internalise et se désensibilise.

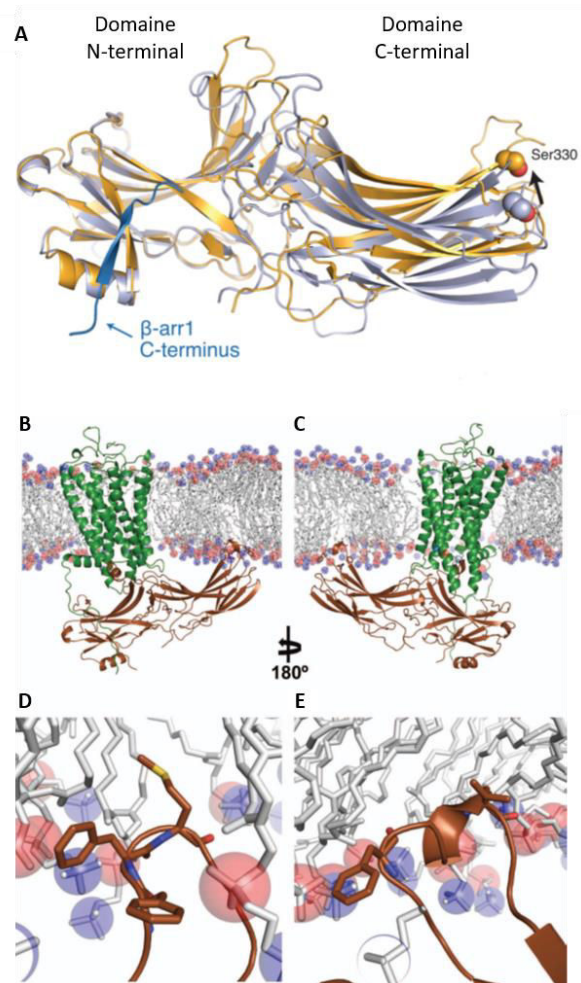


Figure 27 : Structure cristallographique de la β -arrestine (Shukla et al., 2013; Kang et al., 2015).

A : superposition des structures cristallographiques de la forme active (argent) et inactive (or) de la β -arrestine 1
B et C : Visualisation du complexe β -arrestine 1/récepteur de la rhodopsine, cristallisé dans une bicouche lipidique

D et E : Visualisation de l'ancrage des résidus aromatiques du domaine C-terminal de la β -arrestine 1 dans la bicouche lipidique

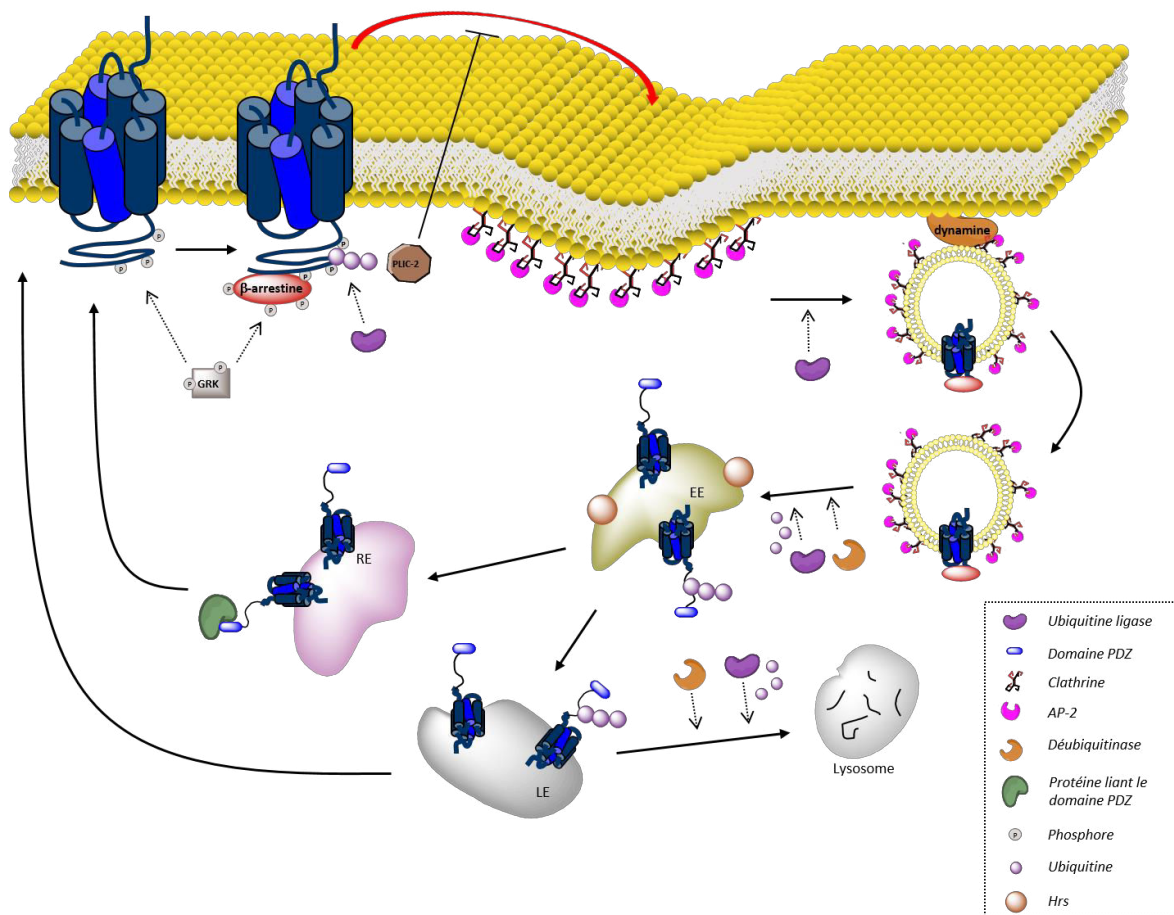


Figure 28 : Mécanisme d'internalisation et de désensibilisation d'un RCPG (Thèse Romain Gerbier, 2011).

RE : Endosome de recyclage, EE : endosome précoce ; LE : Endosome tardif

Chapitre 2 : l'apéline et son récepteur

I) Découverte et désorphanisation du récepteur de l'apéline

1) Clonage et structure du récepteur de l'apéline

Le récepteur de l'apéline a pendant longtemps été un récepteur orphelin, c'est-à-dire sans ligand endogène identifié. Ce récepteur a été cloné à partir d'une banque génomique humaine lors d'une étude cherchant à identifier un récepteur homologue aux récepteurs de l'arginine-vasopressine (AVP). Son gène est localisé sur le chromosome humain 11 au niveau du locus q12 et ne présente pas d'intron (O'Dowd et al., 1993). Il présente 31% d'identité de séquence protéique avec le récepteur des angiotensines II/III de type 1 (AT1) et fut appelé APJ. L'isolement du récepteur APJ de rat fut effectué à partir d'ARN totaux de noyaux supraoptiques (SON), puis en utilisant une banque d'ADNc de cerveaux de rats lors d'une étude visant à trouver un récepteur spécifique de l'angiotensine III (Ang III) (De Mota et al., 2000). Ce récepteur fut également caractérisé comme étant un RCPG de 377 acides aminés et partageant 31 % d'identité de séquence protéique avec le récepteur AT1 de rat (**Figure 29**). Aussi, il partage plus de 90% d'identité de séquence avec le récepteur APJ humain (O'Dowd et al., 1993) et murin (Devic et al., 1999) et 10% avec celui isolé chez la grenouille (Devic et al., 1996). Le récepteur APJ de rat n'est pas capable de lier les Ang II, III et IV ce qui en faisait un récepteur orphelin jusqu'à la découverte de son ligand endogène (Tatemoto et al., 1998; De Mota et al., 2000).

Le récepteur APJ est un RCPG appartenant à la famille « Rhodopsine » et situé dans la branche γ . Il présente les résidus conservés Asn^{1.50}, Asp^{2.50}, Arg^{3.50}, Trp^{4.50}, Pro^{5.50}, Pro^{6.50} et Pro^{7.50}, ainsi que le motif DRY, comprenant le résidu Arg^{3.50}, le motif NPXXY, comprenant le résidu Pro^{7.50} et les Cys des boucles ECL1 et ECL2 pouvant former un pont disulfure.

Le récepteur APJ présente de possibles sites de N-glycosylation, de N-myristoylation, de phosphorylation par la caséine II, la PKA, la PKC et par une kinase GMPc-dépendant (analyse de la séquence protéique du récepteur APJ humain avec le programme Prosite®). Enfin, le récepteur APJ présente quatre Cys, une sur la queue N-terminale, une dans l'ECL1, une dans l'ECL2 et une dans l'ECL3. Cette dernière a été montrée comme étant importante dans l'activation du récepteur (Kumar et al., 2016).

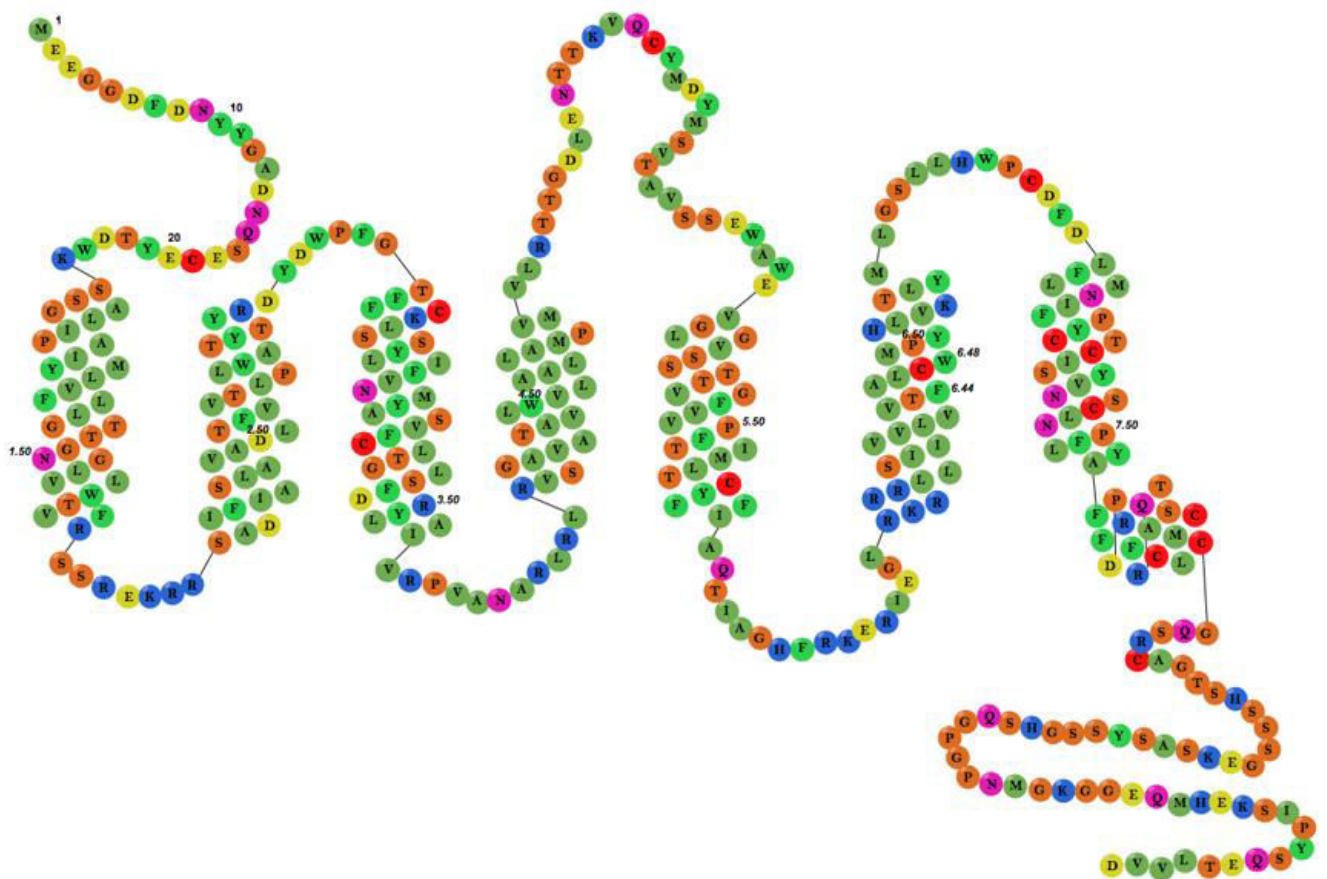


Figure 29 : Séquence protéique du récepteur de l'apéline (Thèse Romain Gerbier, 2011).

2) L'apéline : ligand endogène du récepteur APJ, découverte et caractéristiques

Cinq années après la découverte du récepteur APJ, son ligand fut isolé à partir d'extraits d'estomac de bœuf. Il s'agissait d'un peptide de 36 acides aminés qui a été nommé apéline pour **APJ Endogenous LiGaNd** (Tatemoto et al., 1998). Les 17 acides aminés N-terminaux de l'apéline ont ensuite été utilisés pour isoler l'ADNc du précurseur de l'apéline qui est un peptide de 77 acides aminés nommé préproapéline (Tatemoto et al., 1998).

Le gène codant pour la préproapéline est situé chez l'Homme, sur le chromosome X au niveau des loci q25-26.1. Ce gène présente trois exons dont la séquence codante recouvre l'exon 1 et une partie de l'exon 2 et la séquence 3' UTR recouvre l'autre partie de l'exon 2 et l'exon 3 (D. K. Lee et al., 2000). Ces recouvrements expliquent la présence de deux types de transcrits d'environ 3 et 3,6 kb que l'on retrouve dans différents tissus (D. K. Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000). Les alignements de séquences de préproapéline chez différentes espèces montrent, chez les mammifères, une stricte conservation des 17 résidus C-terminaux du peptides appelé apéline-17 ou K17F (**Figure 30**).

In vivo, on retrouve trois formes actives d'apéline issues de la maturation de la préproapéline et correspondant aux 36 (apéline-36), 17 (K17F) et 13 (apéline-13, E13F) résidus C-terminaux du précurseur. Dans le cerveau et le plasma de rat, la forme pyroglutamylée de l'apéline 13 (pE13F) est majoritaire alors que K17F est présent en plus faible quantité (De Mota et al., 2004). Dans l'utérus et le testicule, l'apéline-36 est majoritaire alors que dans la glande mammaire on retrouve à la fois l'apéline-36 et pE13F (Kawamata et al., 2001).

La présence de paires de résidus basiques dans la séquence de la préproapéline en amont de K17F et pE13F suggère la possible action de prohormones convertases (PC) qui hydrolyseraient la liaison peptidique en aval de ces doublets pour donner naissance à K17F et pE13F. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée *in vivo*. Néanmoins, il a été montré *in vitro* que la proprotéine convertase subtilisine/kexin 3, également appelée furine, pourrait hydrolyser directement la préproapéline au niveau du doublet en aval de pE13F et générer le peptide correspondant (Shin et al., 2013). Du fait de l'absence de résidus dibasiques en amont de l'apéline-36, l'action de PC est à exclure et le mécanisme de maturation de ce peptide reste à définir (**Figure 30**).

Veau	M	N	L	R	R	C	V	Q	A	L	L	L	L	W	L	C	L	S	A	V	C	G	G	P	L	L	Q	T	S	D	30
Humain	M	N	L	R	L	C	V	Q	A	L	L	L	L	W	L	S	L	T	A	V	C	G	G	S	L	M	P	F	P	D	30
Rat	M	N	L	S	F	C	V	Q	A	L	L	L	L	W	L	S	L	T	A	V	C	G	V	P	L	M	L	P	P	D	30
Souris	M	N	L	R	L	C	V	Q	A	L	L	L	L	W	L	S	L	T	A	V	C	G	V	P	L	M	L	P	P	D	30
Veau	G	K	E	M	E	E	G	T	I	R	Y	L	V	Q	P	R	G	P	R	S	G	P	G	P	W	Q	G	G	R	R	60
Humain	G	N	G	L	E	D	G	N	V	R	H	L	V	Q	P	R	G	S	R	N	G	P	G	P	W	Q	G	G	R	R	60
Rat	G	K	G	L	E	E	G	N	M	R	Y	L	V	K	P	R	T	S	R	T	G	P	G	A	W	Q	G	G	R	R	60
Souris	G	T	G	L	E	E	G	S	M	R	Y	L	V	K	P	R	T	S	R	T	G	P	G	A	W	Q	G	G	R	R	60
Veau	K	F	R	R	Q	R	P	R	L	S	H	K	G	P	M	P	F	77													
Humain	K	F	R	R	Q	R	P	R	L	S	H	K	G	P	M	P	F	77													
Rat	K	F	R	R	Q	R	P	R	L	S	H	K	G	P	M	P	F	77													
Souris	K	F	R	R	Q	R	P	R	L	S	H	K	G	P	M	P	F	77													
Apéline-17																															

Apéline-17

Formes moléculaires d'apéline détectées *in vivo* chez l'homme et le rongeur

Apéline-36 LVQPRGSRNGPGPWQGGRKFRQRPRLSHKGPMPF

Apéline-17 (K17F) KFRRQRPRLSHKGPMPF

Forme pyroglutamylée de l'apéline-13 (pE13F) pERPRLSHKGPMPF

Figure 30 : Alignements de séquences protéiques de l'apéline de différentes espèces de mammifères (Flahault et al., 2017).

La flèche noire indique le début de la séquence de l'apéline-36. La séquence strictement conservée chez les mammifères correspond à l'apéline-17 (K17F). Les boîtes noires discontinues encerclent les doublets dibasiques pouvant être ciblés par les prohormones convertases, potentiellement responsables de la maturation de la préproapéline. La flèche bleue montre le site d'hydrolyse par l'ECA 2. La flèche verte montre le site d'hydrolyse par la Néprilysine.

Concernant le métabolisme des fragments d'apéline, il a été montré que l'enzyme de conversion de l'angiotensine de type II (ECA2, EC 3.4.17.23) était capable d'hydrolyser la Phe C-terminale de l'apéline-36, de K17F et de pE13F (Vickers et al., 2002; Wang et al., 2016). Enfin, il a été montré que l'endopeptidase neutre (NEP, EC 3.4.24.11) hydrolyse la liaison peptidique entre l'Arg⁸-Leu⁹ de K17F et l'Arg⁴-Leu⁵ de pE13F, entraînant la production de deux peptides tronqués et inactifs (McKinnie et al., 2016).

II) L'apéline et son récepteur : propriétés pharmacologiques

1) Caractérisation de l'interaction apéline/récepteur

a) Affinité de l'apéline pour son récepteur

Les premières études ont cherché à caractériser les propriétés de liaison de l'apéline au récepteur APJ (ApélineR). Ainsi, il a été montré que les apélines radioiodées, [¹²⁵I][Nle 11, Tyr 13]pE13Y et [¹²⁵I][Nle 34, Tyr 36]apéline-36, se lient à l'ApélineR humain exprimé de façon stable en cellules CHO avec une affinité de 22 et 6 pM, respectivement (Hosoya et al., 2000; Kawamata et al., 2001). Il a également été montré que l'affinité de l'apéline-13 radioiodée par Bolton Hunter sur la Lys⁸ de pE13F pour l'ApélineR de rat exprimé de façon stable en cellules CHO est de 40 pM (Iturrioz et al., 2010b; Gerbier et al., 2015). Enfin, il a été montré *ex vivo*, sur des tissus cardiaques humains (ventricule gauche et oreillette droite) et sur des tissus ventriculaires, cérébraux et pulmonaires de rat, que pE13F radioiodé possède une affinité de, respectivement, 350 pM, 200 pM, 560 pM et 650 pM (Katugampola et al., 2001).

b) Etudes structure-activité de l'apéline

L'affinité des trois fragments actifs d'apéline (apéline-36, K17F et pE13F) est relativement proche. Ceci peut être dû au fait que les interactions ligand/récepteur doivent s'établir entre l'ApélineR et les 13 résidus C-terminaux de ces peptides.

Ainsi, plusieurs études ont cherché à découvrir quels résidus de l'apéline étaient impliqués dans la liaison à l'ApélineR. Des études d'« Alanine-scanning » de pE13F ont été effectuées en caractérisant l'impact de la substitution de chaque résidu de pE13F en Ala sur la capacité de ces peptides à se lier à l'ApélineR, inhiber la production d'AMPc provoquée par la forskoline (FSK) et à mobiliser le calcium intracellulaire. Il a été montré que l'Arg², l'Arg⁴ et la Leu⁵ du motif RPRL de pE13F sont des résidus

essentiels pour la liaison de l'apéline à l'ApélineR auxquels s'ajoutent les résidus Ser⁶, Lys⁸ et Met¹¹ mais dont les impacts sont moins importants (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003).

Conjointement à ces études d'«Alanine-scanning», des expériences de troncations de K17F ont été menées. Ces études ont évalué l'effet de la délétion successive de chaque acide aminé situé à l'extrémité N-terminale ou C-terminale de K17F sur la capacité de ces nouveaux peptides à se lier à l'ApélineR de rat, à induire l'inhibition de la production d'AMPc provoquée par la FSK et à induire l'internalisation de l'ApélineR. Il a été montré que les troncations N-terminales à partir de l'Arg⁶ de K17F (soit l'Arg² de pE13F) conduisent à des peptides incapables de se lier à l'ApélineR et par conséquent à l'activer. Par ailleurs, la délétion de la Phe C-terminale de K17F conduit à un peptide (K16P) toujours capable de se lier à l'ApélineR avec une très bonne affinité (subnanomolaire) et d'induire l'inhibition de la production d'AMPc induite par la FSK mais avec une habilité très réduite pour induire l'internalisation de l'ApélineR (El Messari et al., 2004). Il a également été montré *in vivo*, que l'injection par voie i.v de K16P chez le rat normotendu, n'entraînait pas la baisse de la pression artérielle observée suite à l'injection de K17F. Ceci indiquant l'existence d'une dissociation fonctionnelle entre le couplage de l'ApélineR à la protéine G et l'internalisation du récepteur médiant l'effet hypotenseur de l'apéline (El Messari et al., 2004).

La première étude visant à caractériser l'interaction entre l'apéline et l'ApélineR a montré par mutagenèse dirigée que les résidus Glu-20 et Asp-23 situés sur la queue N-terminale du récepteur participeraient à la liaison de pE13F. Ces résidus acides pourraient interagir avec les résidus basiques du ligand ayant un rôle crucial dans la liaison à l'ApélineR (Zhou et al., 2003b).

2) Signalisation du récepteur de l'apéline

a) Couplage du récepteur de l'apéline

De nombreuses études ont exploré les voies de signalisation contrôlées par le système apéline/ApélineR. Il a été montré que l'apéline-36, K17F et pE13F présentent la même capacité, de l'ordre du subnanomolaire, à inhiber la production d'AMPc induite par la FSK dans des cellules CHO exprimant de façon stable l'ApélineR de rat et dans des cellules embryonnaires rénales humaines (HEK) exprimant l'ApélineR humain (Habata et al., 1999; De Mota et al., 2000; Medhurst et al., 2003; El Messari et al., 2004). Il a également été montré que le traitement à la toxine pertussis, un inhibiteur spécifique du couplage de la protéine G α_i / G α_s au RCPG, de cellules CHO exprimant de façon stable l'ApélineR humain ou de rat empêchait l'induction par l'apéline-36 et pE13F de l'inhibition de la production d'AMPc provoquée par la FSK, démontrant ainsi que l'ApélineR est naturellement couplé à

la protéine $G\alpha_i$ (Hosoya et al., 2000). Ceci a été confirmé par une étude démontrant que l'ApélineR couple préférentiellement les protéines $G\alpha_{i1}$ et $G\alpha_{i2}$ mais pas $G\alpha_{i3}$ et que ce couplage entraîne une inhibition de l'AC et une phosphorylation de la kinase de régulation des signaux extracellulaires (ERK 1 et 2 (ERK ½)) (Masri et al., 2006; Bai et al., 2008). Il a également été montré que l'ApélineR est couplé à la protéine $G\alpha_{13}$ et que son activation entraîne une translocation cytoplasmique et une phosphorylation des histones déacétylase de classe II (HDAC) 4 et 5 induisant l'activation du facteur de transcription « Myocyte Enhancer Factor 2 » (MEF2) (Kang et al., 2013). Enfin il a été montré dans des cœurs isolés perfusés de rats que l'apéline entraînait l'activation de la phospholipase C (PLC), indiquant que dans le cœur, l'ApélineR pourrait être couplé à la protéine Gq (Szokodi et al., 2002).

b) Modulation des concentrations de calcium intracellulaire par l'apéline

Il a été montré que l'apéline-36, K17F et pE13F étaient capables d'augmenter la mobilisation de calcium intracellulaire dans différents types cellulaires exprimant de façon stable l'ApélineR humain, comme les cellules de tératomes carcinomiques humains (NTera2), les cellules dérivées de basophiles (RBL-2H3) et les cellules HEK (Choe et al., 2000; Medhurst et al., 2003; Zhou et al., 2003a, 2003b). Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-tendant l'augmentation de calcium intracellulaire induite par les fragments d'apéline restent à ce jour inconnus.

Enfin, il a été montré dans les artérioles glomérulaires que K17F entraînait, au niveau des cellules musculaires lisses, une diminution de la mobilisation de calcium intracellulaire induite par l'Ang II de façon oxyde nitrique (NO) dépendante (Hus-Citharel et al., 2008).

c) L'activation de kinases

De nombreuses kinases ont été montrées comme étant activées suite à la stimulation de l'ApélineR par l'apéline. En effet, il a été montré que la stimulation par pE13F de l'ApélineR murin exprimé de façon stable en cellules CHO, entraîne une phosphorylation de ERK ½ (Masri et al., 2002, 2004). L'activation de ERK 1 et ERK 2 sont dépendantes de la protéine $G\alpha_i$ et indépendantes de l'activation de la GTPase Ras (Masri et al., 2002, 2004).

Il a également été montré que la phosphorylation des résidus Thr-389, Thr-421 et Ser-424 de l'ApélineR entraînait l'activation de la kinase p70S6 par des voies de signalisation différentes (Masri et al., 2004). En effet, la phosphorylation de la Thr-389 entraîne une activation de la voie des phosphoinositides 3 Kinase (PI_3K) / Protéine Kinase B (Akt) qui vont activer la kinase p70S6. Par la suite, cette kinase

phosphoryle la protéine « mammalian Target of rapamycin » (mTor) (Masri et al., 2004; Eyries et al., 2008) qui entraîne une production de NO via l'activation de l'oxyde nitrique synthase de l'endothélium (Ishida et al., 2004; Azizi et al., 2008). L'activation de la p70S6 via la phosphorylation de la Thr-421 et la Ser-424 fait intervenir une protéine kinase C (PKC) appartenant à la famille des PKC atypiques comme cela a été démontré en traitant les cellules exprimant l'ApélineR avec un pseudo-substrat de la PKC ζ . Cette PKC atypique, une fois activée, phosphoryle et active les kinases de la voie MAPK (Masri et al., 2004). Enfin, il a été montré que la stimulation de l'ApélineR par pE13F induisait une phosphorylation de p70S6K via l'activation des MAPK contrôlée par la protéine G α_i . De cette activation résulte l'augmentation de la différenciation des cellules souches en cardiomyocytes (D'Aniello et al., 2009).

Enfin, la ou les GRK régulant la dissociation de la protéine G à l'ApélineR ainsi que le recrutement des protéines de type β -arrestine sont à ce jour inconnues. Néanmoins, il a été montré *in vitro* que l'ApélineR était capable de recruter les GRKs 2 et 5 et que les sites de phosphorylation potentiel de l'ApélineR pouvant médier le recrutement de ces GRKs étaient les résidus Ser-335, Ser-345 et Ser-348 (Chen et al., 2014). De plus, il a été montré que la mutation de la Ser-348 de l'ApélineR entraînait une absence de phosphorylation de cette dernière et surtout une absence de recrutement des GRKs 2 et 5, une absence de recrutement des β -arrestines 1 et 2 et une absence d'internalisation du récepteur. Toutefois, l'ApélineR muté était toujours capable de signaler via sa protéine G (Chen et al., 2014). Ainsi, cette étude a permis de montrer que, *in vitro*, l'ApélineR présentait une signalisation MAPK β -arrestine dépendante via la phosphorylation de la Ser-348, très vraisemblablement, par les GRKs 2 et 5.

d) L'internalisation du récepteur de l'apéline

Comme la plupart des RCPGs, l'ApélineR s'internalise suite à la liaison des différents fragments d'apéline (Reaux et al., 2001; Medhurst et al., 2003; Zhou et al., 2003b; El Messari et al., 2004; Iturrioz et al., 2010b). Cependant, K17F est 30 fois plus puissant que pE13F pour induire l'internalisation de l'ApélineR de rat (Gerbier et al., 2017). Comme mentionné plus haut, la délétion de la Phe C-terminale de K17F (K16P), mais aussi la substitution de cette Phe par une Ala (K17A), conduisent à des peptides liant l'ApélineR et activant son couplage à la protéine G α_i , avec la même efficacité que K17F, sans pouvoir induire l'internalisation du récepteur, suggérant que ce résidu joue un rôle crucial dans l'activation de ce mécanisme (El Messari et al., 2004; Iturrioz et al., 2010b).

Afin de valider cette hypothèse, une étude structure-fonction a été menée sur l'ApélineR par modélisation moléculaire et mutagénèse dirigée. Pour ce faire, le premier modèle tridimensionnel (3D) de l'ApélineR complexé avec pE13F ou K17F a été construit dans le laboratoire en collaboration avec le Dr B. Maigret. Un modèle brut a été bâti par homologie en utilisant comme patron le modèle validé

du récepteur à la cholécystokinine 8 de type 1 (CCK1R) (Archer-Lahlou et al., 2005). Ce modèle fut privilégié par rapport à la seule structure cristallographique existante à l'époque, celle du récepteur de la Rhodopsine, en raison du fait que le modèle du récepteur CCK1 était une forme activée du récepteur et que ce modèle était validé par des études structure-fonction (Archer-Lahlou et al., 2005). L'observation du modèle complexé avec K17F ou pE13F montre que les peptides interagissent en surface du récepteur avec des acides aminés acides via leurs résidus basiques alors que leur Phe C-terminale s'insère au fond du site de liaison du récepteur dans une poche constituée des Trp 152 et 259 et de la Phe 255. Des études structures-fonctions par mutagenèse dirigée du récepteur de l'apéline ont montré que les récepteurs de l'apéline mutés sur ces résidus n'étaient plus capables d'être internalisés sous l'action de K17F alors qu'ils conservaient la capacité de lier l'apéline ou à se coupler à la protéine $G\alpha_i$. Ceci a permis de démontrer le rôle clé des résidus Phe 255 et Trp 259 dans l'internalisation du récepteur ainsi que de valider ce premier modèle 3D du récepteur de l'apéline (Iturrioz et al., 2010b). De plus, cette étude confirme l'existence d'une dissociation fonctionnelle entre le couplage de la protéine $G\alpha_i$ à l'ApélineR et l'internalisation de ce dernier. Ceci implique que le récepteur existe sous différentes conformations actives dépendant de la façon dont le ligand agoniste se lie dans le site de liaison, ce qui amène à l'activation de différentes voies de signalisation et par conséquent, à différents effets biologiques (Iturrioz et al., 2010b). Enfin, l'ApélineR pourrait présenter une sélectivité fonctionnelle ou une signalisation biaisée en pouvant coupler la protéine G d'une part, et recruter les β -arrestines 1 et 2 d'autre part (Ceraudo et al., 2014). Cette signalisation biaisée a été confirmée par une étude montrant, que K17F était capable d'induire la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ via un mécanisme dépendant du recrutement de la β -arrestine alors que K16P était uniquement capable d'induire l'activation de la protéine $G\alpha_i$ (Ceraudo et al., 2014). De plus, il a été montré que l'injection i.v chez le rat normotendu de K16P ou de pE13A n'entraînait pas la baisse de pression artérielle observée avec K17F ou pE13F (El Messari et al., 2004; Lee et al., 2005). Ce qui suggère que l'activation de ERK $\frac{1}{2}$ dépendant uniquement du recrutement de la β -arrestine est responsable de l'effet presseur de l'apéline.

Ainsi, ERK $\frac{1}{2}$ peuvent être activées de façon protéine G dépendante et β -arrestine dépendante. Cependant les actions qu'elles effectuent suite à leur activation sont différentes. En effet, lorsque leur activation est induite par l'activation de la protéine G, ERK $\frac{1}{2}$ sont transloquées dans le noyau où elles agissent comme des facteurs de transcription. A l'inverse, lorsque leur activation est induite par le recrutement de la β -arrestine, ERK $\frac{1}{2}$ restent dans le cytoplasme où elles vont réguler des mécanismes cytoplasmiques comme la traduction ou l'apoptose mais aussi d'autres voies de signalisation (Eishingdrelo and Kongsamut, 2013).

e) Recyclage du récepteur de l'apéline

La caractérisation des profils d'internalisation de l'ApélineR induits par l'apéline-36 ou pE13F montrent que le complexe pE13F/ApélineR s'internalise et est rapidement recyclé à la membrane via un mécanisme dépendant de la voie de signalisation Rab4 (Lee et al., 2010). A l'inverse le complexe apéline-36/ApélineR s'internalise et est dirigé vers la voie de dégradation lysosomiale via un mécanisme dépendant de la voie de signalisation Rab7. Chacune de ces voies sont induites par le recrutement de la β -arrestine 1 à l'ApélineR avec, toutefois, des différences dans l'association spatio-temporelle (Lee et al., 2010). Ces différences confirment les études précédentes ayant montrées que l'apéline-36 induisait une internalisation forte et durable alors que pE13F induisait une internalisation transitoire de l'ApélineR avec un recyclage rapide (Masri et al., 2006). Ainsi, malgré leur affinité pour l'ApélineR et leur pouvoir d'activation proches, il existe des différences subtiles entre les trois formes actives d'apéline qui ont des impacts majeurs sur leur propriétés physiologiques.

f) L'hétérodimérisation du récepteur

Comme de nombreux RCPGs, l'ApélineR est capable de s'homodimériser et de s'hétérodimériser. En effet, il a été montré que l'ApélineR pouvait, *in vitro*, former des homodimères via des interactions entre les TM I, II, III et IV des récepteurs (Cai et al., 2017). Toujours *in vitro*, il a été montré que l'ApélineR pouvait former des dimères avec le récepteur AT1, dont la liaison de l'apéline entraînait une inhibition de la signalisation induite par l'Ang II (Chun et al., 2008; Sun et al., 2011; Siddiquee et al., 2013). Il a également été montré que l'ApélineR était capable de former des hétérodimères avec le récepteur κ -opioïde, entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire via une augmentation de l'activité de la PKC et une diminution de celle de la PKA (Li et al., 2012). Enfin, il a été montré que l'ApélineR formait des hétérodimères avec le récepteur de la bradykinine de type 1, entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire et une phosphorylation de eNOs via l'activation de la voie de signalisation PKC G_q dépendante (Bai et al., 2014).

Chapitre 3 : le système apélinergique

I) Distribution de l'apéline et de son récepteur

1) Dans le cerveau

Différentes études ont montré soit par RT-PCR (Kawamata et al., 2001; Medhurst et al., 2003), soit par hybridation *in-situ* (Pope et al., 2012), soit par Northern Blot (D. K. Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000) la distribution hétérogène des ARNm de la préproapéline et de l'ApélineR dans différentes structures cérébrales humaines et de rat. Ainsi l'on retrouve ces ARNm dans les structures olfactives, le septum, l'hippocampe, l'hypothalamus et la glande pinéale.

La distribution des neurones apélinergiques dans le cerveau de rat a été observée en utilisant un anticorps polyclonal de haute affinité et de haute sélectivité pour K17F reconnaissant également l'apéline-36 et pE13F (Reaux et al., 2001, 2002; De Mota et al., 2004). Les neurones apélinergiques sont retrouvés de façon abondante dans les structures impliquées dans le contrôle des sécrétions neuroendocrines, de la prise alimentaire, du comportement dipsique et du contrôle de la pression artérielle comme la medulla oblongata.

Les corps cellulaires de ces neurones sont particulièrement présents dans le SON, la partie magnocellulaire du PVN, le noyau arqué, le noyau ambigu et le noyau réticulé latéral. Inversement, les fibres nerveuses et les terminaisons neuronales immunoréactives à l'apéline sont largement distribuées dans le thalamus, l'hypothalamus, et l'éminence médiane de l'hypophyse postérieure (Brailoiu et al., 2002; Reaux et al., 2002). Ces localisations suggèrent que, comme pour les neurones magnocellulaires vasopressinergiques et ocytocinergiques, les neurones apélinergiques du SON et du PVN projettent dans l'hypophyse postérieure, suggérant une colocalisation apéline/AVP ou apéline/ocytocine. Cette hypothèse a été vérifiée en utilisant un double marquage immunofluorescent qui a permis de démontrer que l'apéline était co-localisée avec l'AVP (De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo et al., 2004) et l'ocytocine (Brailoiu et al., 2002; Bodineau et al., 2011) dans les neurones magnocellulaires. Les corps cellulaires et les fibres nerveuses immunoréactives à l'apéline ont été identifiés le long de la lamina terminalis, localisée le long du 3^{ème} ventricule et contenant le SFO, dans l'OVLT et dans le noyau préoptique médian. Ces structures cérébrales sont impliquées dans le contrôle du comportement dipsique (Buggy et al., 1977; Johnson et al., 1996; Bodineau et al., 2010). Le SFO et l'OVLT présentent des capillaires fenêtrés permettant des échanges entre la périphérie et le système nerveux central. Ces organes constituent donc un lien entre les événements périphériques, comme

une déshydratation sévère ou une hypovolémie, et les réponses adaptatives cérébrales comme la prise de boisson ou la sécrétion d'AVP.

Chez le rat, l'ApélineR est également largement exprimé dans le système nerveux central. En effet, il a été montré par des expériences d'hybridation *in situ* que l'ARNm de l'ApélineR était localisé dans le cortex piriforme, dans le cortex enthorinal, dans l'hippocampe, dans la pars compacta de la substance noire, dans le noyau dorsal du raphé et dans le locus coeruleus contenant les corps cellulaires des neurones monoaminergiques (De Mota et al., 2000; D. K. Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000). Les niveaux d'expression de l'ARNm de l'ApélineR sont également élevés dans les noyaux hypothalamiques, comme le SON et le PVN, dans le noyau arqué, dans la glande pinéale ainsi que dans l'hypophyse au niveau de ses lobes antérieur et intermédiaire (De Mota et al., 2000) (**Figure 31**).

Il a été montré par des expériences de double marquage combinant l'hybridation *in situ* et l'immunofluorescence que l'ARNm de l'ApélineR est exprimé par les neurones magnocellulaires vasopressinergiques du SON et du PVN. Ces neurones expriment également les récepteurs de l'AVP de type 1a (V1a) et 1b (V1b) (Hurbin et al., 1998; Reaux et al., 2001; O'Carroll and Lolait, 2003) alors que l'ARNm du récepteur de l'AVP de type 2 (V2) est absent (Hurbin et al., 1998). Cette expression de l'ApélineR et des récepteurs V1a dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques suggère une régulation autocrine directe de ces neurones par l'apéline et l'AVP.

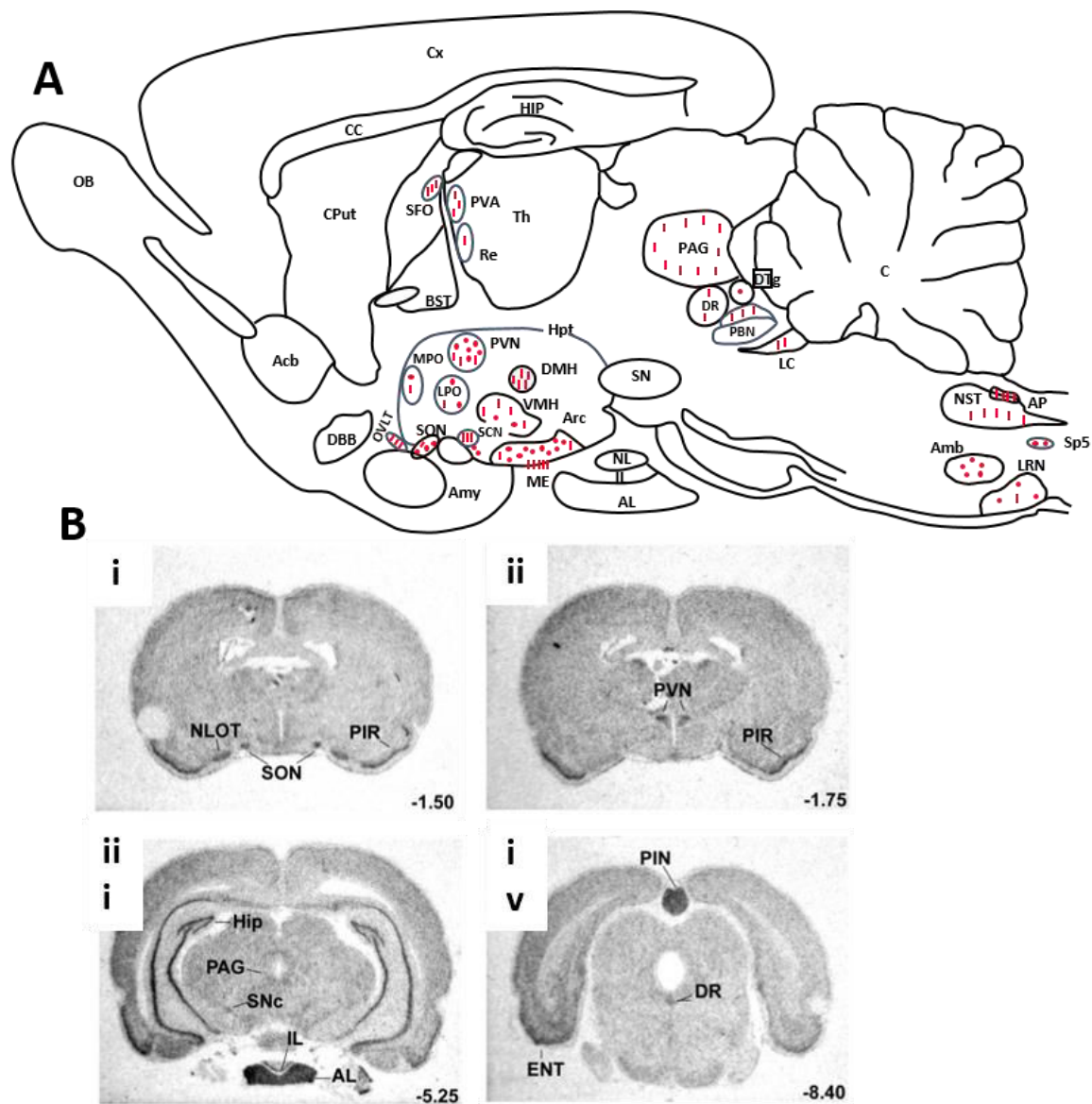


Figure 31 : Distribution de l'apéline et de son récepteur dans le cerveau de rat (Flahault et al., 2017).

A : Distribution neuroanatomique des corps cellulaires et des fibres nerveuses immunoréactifs à l'apéline sur une coupe parasagittale de cerveau de rat. Les corps cellulaires sont représentés sous forme de points et les fibres nerveuses sont représentées sous forme de lignes.

B : Films radiographiques de la distribution des ARN messagers de l'ApélineR dans le cerveau de rat. Il s'agit de coupes frontales antéropostérieures partant du bregma de cerveau de rat.

Abbréviations : Acb, noyau accubien ; Amb, noyau ambigu ; Amy, amygdale ; AL, lobe antérieur de l'hypophyse ; AP, area postrema ; Arc, noyau arqué ; BST, noyaux de la couche de la strie terminale ; C, cérébellum ; CC, corps calleux ; Cput, caudate putamen ; Cx, cortex cérébral ; DBB, bande diagonale de Broca ; DMH, noyau dorsomédian de l'hypothalamus ; DR, noyau raphé dorsal ; DTg, noyau dorsal tegmentale ; ENT, cortex entorhinal ; HIP, hippocampe ; Hpt, hypothalamus ; IL, lobe intermédiaire de l'hypophyse ; LC, locus coeruleus ; LPO, aire latérale préoptique ; LRN, hypophyse latérale réticulée ; ME, éminence médiane ; MPO, noyau médian préoptique ; NL, lobe neural de l'hypophyse ; NLOT, noyau du tractus olfactif latéral ; NST, noyau du tractus solitaire ; OB, bulbe olfactif ; OVLT, organe vasculaire de la lamina terminalis ; PAG, substance grise périarquédurale ; PBN, noyau parabrachial ; PIN, glande pinéale ; PIR, cortex piriforme ; PVA noyau paraventriculaire du thalamus ; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; Re, noyaux réunis du thalamus ; SCN, noyau suprachiasmatique ; SFO, organe subfornical ; SN, substance noire ; SNC, pars compacta de la substance noire ; SON, noyau supraoptique ; SP5, noyau spinal du nerf trijumeaux ; S, septum ; Th, thalamus ; VMH, noyau ventromédian de l'hypothalamus

2) Dans le rein

Des études ont montré par RT-PCR que les ARNm codant pour la préproapéline et l'ApélineR étaient exprimés dans le rein humain et de rat (Medhurst et al., 2003; O'Carroll et al., 2000). Par des expériences d'hybridation *in situ* effectuées chez le rat, il a été montré que l'ARNm de l'ApélineR était exprimé par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des artérioles glomérulaires (Hus-Citharel et al., 2008). Dans le rein, la plus grande concentration d'ARNm de l'ApélineR est observée dans le glomérule. L'ApélineR est également exprimé dans le canal collecteur suivant un gradient croissant avec une faible expression dans le canal collecteur cortical, une expression modérée dans le canal collecteur de la médullaire externe et une expression plus élevée dans le canal collecteur de la médullaire interne (Hus-Citharel et al., 2008). Il est intéressant de constater que l'ApélineR au niveau du canal collecteur est coexprimé avec le récepteur V2 (Ostrowski et al., 1992).

3) Dans le cœur et les artères

Il a été montré que les ARNm de la préproapéline et du récepteur de l'apéline sont largement présents dans le système cardiovasculaire, que ce soit chez le rat ou chez l'Homme.

En effet, les ARNms de la préproapéline et de l'ApélineR ont été détectés dans les cellules endothéliales vasculaires cardiaques de rat. Les niveaux d'expression de ces ARNm dans le cœur font partie des plus élevés de l'organisme et sont similaires à ceux retrouvés dans le rein et le poumon (Habata et al., 1999; Hosoya et al., 2000; O'Carroll et al., 2000).

Chez l'Homme, il a également été démontré l'expression des ARNm de la préproapéline et de l'ApélineR dans le cœur (Medhurst et al., 2003). Par des expériences d'immunohistochimie, l'expression de l'apéline a été détectée au niveau des cellules endothéliales vasculaires (notamment dans l'artère mammaire interne gauche, l'artère coronaire ou la veine saphène) ainsi que dans les vaisseaux sanguins du poumon, du rein et de la glande surrénale. L'ApélineR est, quant à lui, exprimé dans les cellules épithéliales de l'endocarde, dans les cardiomyocytes et dans les cellules musculaires lisses (Kleinz and Davenport, 2004; Kleinz et al., 2005).

II) Rôle dans le maintien de l'équilibre hydrique

1) Effets centraux de l'apéline sur l'activité des neurones à AVP, sur la sécrétion d'AVP et sur la diurèse

L'AVP est également connue sous le nom d'hormone antidiurétique et possède, en plus de son effet sur la diurèse, un effet vasoconstricteur. Au sein des neurones magnocellulaires vasopressinergiques, l'AVP est sécrétée de la neurohypophyse dans la circulation sanguine via les capillaires fenêtrés présents dans cette structure. Cette sécrétion s'effectue en réponse aux variations de l'osmolalité plasmatique et de la volémie (Manning et al., 1977; Brownstein et al., 1980) ou encore sous l'influence de neurohormones comme les peptides angiotensinergiques ou natriurétiques (Zini et al., 1996; Gouzènes et al., 1998). Comme décrit plus haut, au sein des neurones magnocellulaires vasopressinergiques, l'AVP, les récepteurs V1a, l'apéline et l'ApélineR colocalisent (Reaux et al., 2001; O'Carroll and Lolait, 2003), suggérant une interaction entre apéline et AVP. L'apéline agirait sur la sécrétion d'AVP et ce indépendamment du rétrocontrôle qu'effectue l'AVP sur sa propre sécrétion (Gouzènes et al., 1998; Ludwig, 1998).

Afin de vérifier cette hypothèse, des études ont été menées dans deux modèles animaux : la rate lactante et la souris déshydratée. Dans le modèle de la rate lactante, les animaux présentent une hyperactivité des neurones magnocellulaires qui sécrètent des taux élevés d'AVP afin de conserver l'eau de l'organisme pour permettre une production optimale de lait maternel (Poulain et al., 1977; Gimpl and Fahrenholz, 2001). L'injection par voie i.c.v de K17F chez ces rattes a permis de montrer une inhibition de l'activité électrique phasique des neurones vasopressinergiques, une réduction de la libération d'AVP dans la circulation sanguine et une augmentation de la diurèse aqueuse (De Mota et al., 2004). Dans le modèle des souris déshydratées pendant 24 à 48h, il est observé une augmentation de l'activité des neurones vasopressinergiques et une diminution de la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine (Hogarty et al., 1992; Kadekaro et al., 1992). L'injection par voie i.c.v de K17F chez ces souris a montré une diminution significative de la libération systémique d'AVP (Reaux-Le Goazigo et al., 2004). Ces études suggèrent que l'apéline pourrait être sécrétée des corps cellulaires des neurones du SON et du PVN puis se lierait sur les ApélineRs exprimés à la surface de ces neurones entraînant, de façon autocrine, une inhibition de leur activité et une inhibition de la sécrétion d'AVP. L'apéline agirait donc comme un inhibiteur naturel de l'effet antidiurétique de l'AVP (**Figure 32**).

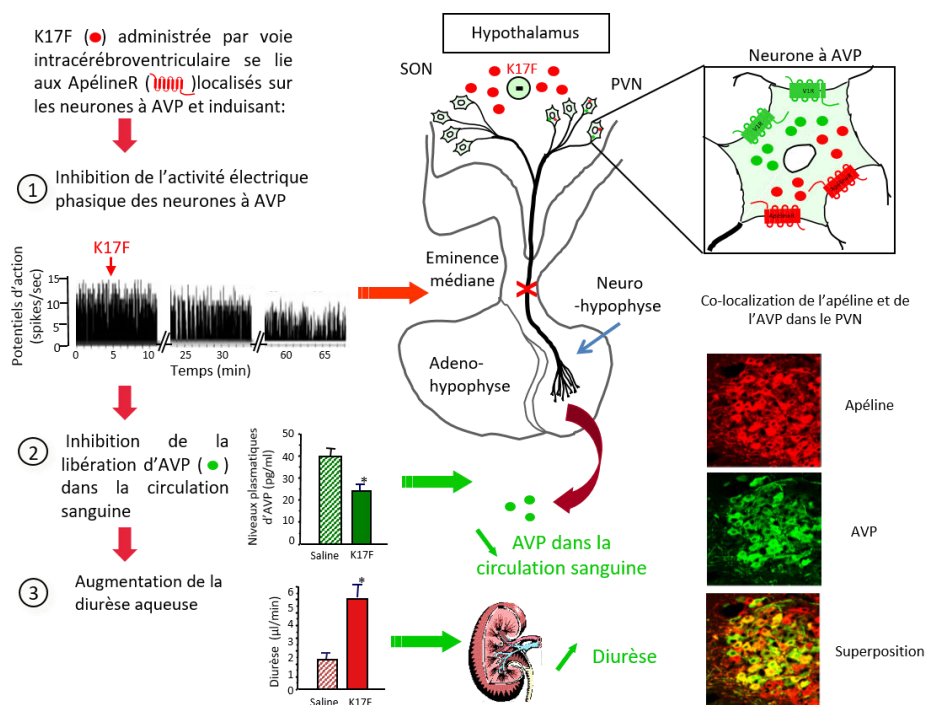


Figure 32 : Action centrale de l'apéline sur l'activité des neurones à vasopressine (Flahault et al., 2017).

L'apéline et l'ApélineR sont co-localisés dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques du PVN et du SON avec l'AVP et le récepteur à la vasopressine de type 1 (V1R). Chez la ratte lactante, l'injection i.c.v de K17F inhibe l'activité électrique phasique des neurones à AVP entraînant une diminution de la libération d'AVP dans la circulation sanguine et une augmentation de la diurèse. Les images de microscopie confocale illustre la distribution de l'apéline et de l'AVP dans les corps cellulaires du PVN. Une forte co-localisation de l'apéline (rouge) et de l'AVP (vert) a été détectée dans les neurones magnocellulaires à AVP.

2) Effets de l'apéline et de l'AVP sur le maintien de l'équilibre hydrique au niveau du rein

En plus de son action centrale sur la régulation de l'équilibre hydrique, l'apéline pourrait avoir une action rénale directe sur la diurèse. En effet, il a été montré que l'ARNm de l'ApélineR humain était exprimé dans le glomérule et le long du néphron et celui de l'apéline a été retrouvé le long des canaux collecteurs (De Falco et al., 2002; Hus-Citharel et al., 2008). Or les récepteurs V2 sont exprimés le long des canaux collecteurs. Chez la ratte lactante anesthésiée, l'injection par voie i.v de doses croissantes de K17F induit une augmentation dose-dépendante de la diurèse suggérant une action directe de l'apéline sur les canaux collecteurs où est observée l'action antidiurétique de l'AVP via les récepteurs V2 (Hus-Citharel et al., 2008). Au niveau des artérioles glomérulaires isolées, il a été montré qu'une fois précontractées par l'Ang II, l'application de K17F induit une vasodilatation de ces artérioles. Ce mécanisme a été démontré comme étant dépendant de la production de NO puisque la vasodilatation n'est plus observée lors de la co-application de K17F avec un inhibiteur de NO synthase ou lorsque les

artérioles sont désendothélisées (Hus-Citharel et al., 2008). Ainsi, l'effet vasodilatateur de l'apéline est directement lié à l'inhibition de la production de calcium induite par l'Ang II via l'activation de la protéine $G\alpha_i$ couplée à l'ApélineR. Ainsi l'apéline augmente le flux sanguin rénal via une action directe sur l'ApélineR situé sur l'endothélium des artérioles glomérulaires, contribuant ainsi à augmenter la diurèse.

L'AVP, en stimulant le récepteur V2 dans les canaux collecteurs, induit une augmentation de la production d'AMPC et une activation de la PKA qui phosphoryle les aquaporines de type 2 (AQP2). Une fois phosphorylées, les AQP2 s'insèrent à la membrane apicale des cellules principales des canaux collecteurs, entraînant une réabsorption d'eau, une diminution de la diurèse ainsi qu'une diminution de l'osmolalité plasmatique (Nielsen et al., 1995; Sands et al., 1997). L'expression de l'ARNm de l'ApélineR le long du canal collecteur suggère que l'apéline pourrait avoir une action aquarétique en agissant directement sur cette partie du néphron. Afin de vérifier cette hypothèse, il a été montré que l'application de K17F sur les canaux collecteurs médullaires entraînait une inhibition de la production d'AMPC induite par la dDAVP, un agoniste spécifique et sélectif du récepteur V2, et une diminution de la mobilisation du calcium intracellulaire induite par la dDAVP (Hus-Citharel et al., 2014). De plus, il a été montré que l'injection par voie i.v de doses croissantes de K17F chez la ratte lactante entraînait une augmentation de la diurèse et une diminution de l'osmolalité urinaire de façon dose-dépendante sans faire varier la kaliurèse et la natriurèse. Une diminution de l'expression des AQP2 à la membrane apicale est observée après injection par voie i.v de K17F chez la ratte lactante selon un gradient descendant du cortex jusqu'à la médullaire (Hus-Citharel et al., 2014). Cette étude montre que la diurèse induite par K17F est liée à une action directe sur le canal collecteur. Enfin, il a été montré que l'injection par voie i.v l'apéline 13 (correspondant à la forme non pyroglutamylée de pE13F) chez le rat Sprague-Dawley mâle entraînait une augmentation de la diurèse (Murza et al., 2016).

Ainsi, l'apéline exerce une action diurétique de deux façons. Tout d'abord, elle inhibe au niveau central la libération d'AVP dans la circulation sanguine. Ensuite, elle agit directement au niveau du rein où elle augmente le flux sanguin rénal en agissant sur les artérioles glomérulaires et elle s'oppose à l'effet antidiurétique de l'AVP au niveau du canal collecteur. Ainsi, l'apéline et l'AVP possèdent des effets opposés et contribuent au contrôle de l'osmolalité plasmatique en régulant la réabsorption d'eau par le rein (**Figure 33**).

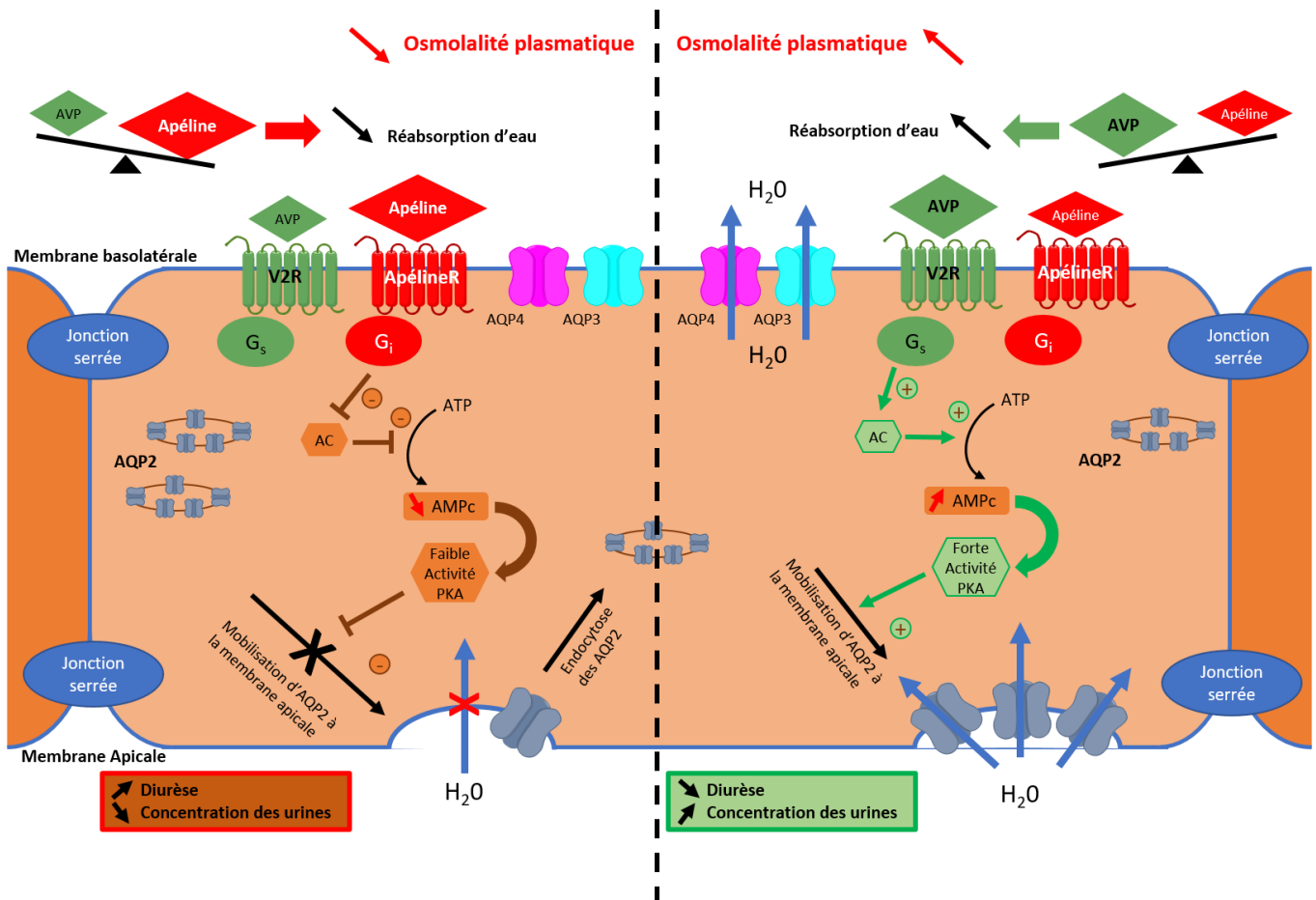


Figure 33 : Représentation des voies de signalisation activées par l'apéline et l'AVP dans les cellules principales des canaux collecteurs (Flahault et al., 2017).

Dans les cellules principales des canaux collecteurs, l'AVP se lie au récepteur V2, situé à la membrane basolatérale, qui active l'adénylate cyclase (AC) via son couplage à la protéine G_s et conduisant à une augmentation de la production d'AMPc. Ceci provoque une augmentation de l'activité de la protéine kinase A (PKA) induisant une insertion des aquaporines 2 (AQP2) à la membrane apicale. Les AQP2, à la membrane apicale, et les AQP3 et AQP4, à la membrane basolatérale, permettent une réabsorption d'eau conduisant simultanément à une diminution de la diurèse et une augmentation de la concentration des urines.

A l'inverse, la liaison de l'apéline à l'ApélineR induit une inhibition de l'AC via le couplage du récepteur à la protéine G_i conduisant à une diminution de la production d'AMPc ainsi que de l'activité de la PKA. Il en résulte une diminution de l'insertion des AQP2 à la membrane apicale, entraînant une diminution de la réabsorption de l'eau conduisant à une augmentation de la diurèse et une diminution de la concentration des urines.

3) Régulation opposée de l'apéline et de l'AVP lors de la déshydratation

Comme décrit plus haut, l'apéline et l'AVP sont colocalisées dans les neurones magnocellulaires et ont des actions opposées sur la diurèse. Il était donc important de savoir comment ces deux peptides sont régulés pour maintenir l'équilibre hydrique de l'organisme. Afin de répondre à cette question, la régulation de la synthèse et de la libération d'apéline et d'AVP a été étudiée lors de la déshydratation chez le rat. Puis, une étude effectuée chez l'homme a cherché à déterminer les niveaux plasmatiques d'apéline et d'AVP suivant l'état d'hydratation des volontaires.

a) Effets de la déshydratation chez le rat

Il a été montré chez le rat que suite à la déshydratation, l'AVP est sécrétée dans la circulation sanguine plus rapidement qu'elle n'est synthétisée, entraînant une déplétion des stocks d'AVP dans les neurones magnocellulaires (Zingg et al., 1986). Parallèlement, la déshydratation entraîne une diminution des taux plasmatiques d'apéline et une augmentation du contenu neuronal en apéline dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques (De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo et al., 2004). Ainsi, suite à la déshydratation, l'apéline s'accumule dans les neurones à AVP au lieu d'être sécrétée. Il a également été montré que l'injection par voie i.c.v d'AVP chez des rats ayant un accès libre à l'eau permettait de retrouver des concentrations neuronales d'apéline équivalentes à celles observées lors de la déshydratation. A l'inverse, il a été montré que, suite à la déshydratation et à l'injection par voie i.c.v d'un antagoniste des récepteurs V1, les concentrations neuronales d'apéline étaient réduites (Reaux-Le Goazigo et al., 2004). Ces études prouvent donc que l'apéline et l'AVP exercent des actions opposées lors de la déshydratation (Zingg et al., 1986; De Mota et al., 2004). Elles montrent aussi que l'AVP et l'apéline sont sécrétées séparément par les neurones magnocellulaires vasopressinergiques du SON et du PVN qui les produisent dans des compartiments distincts, confirmant la présence des deux peptides dans les expériences de colocalisation (De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo et al., 2004).

Ainsi, la régulation croisée de l'apéline et de l'AVP suivant un stimulus osmotique répond à un objectif physiologique : permettre le maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme en prévenant l'excrétion d'eau au niveau du rein lors de la déshydratation.

b) Effets de la déshydratation chez l'homme

La régulation croisée de l'apéline et de l'AVP a été étudiée chez des hommes, volontaires sains, en comparant les taux plasmatiques d'apéline et d'AVP. Pour ce faire les échantillons de plasma ont été recueillis soit 2h après l'injection d'une solution saline hypertonique entraînant une augmentation de l'osmolalité plasmatique, soit 30 min après une prise orale d'eau entraînant une diminution de l'osmolalité plasmatique (Azizi et al., 2008).

Il a été montré que l'augmentation de l'osmolalité plasmatique coïncidait avec une augmentation des niveaux plasmatiques d'AVP parallèlement à une baisse des taux d'apéline. A l'inverse, la diminution de l'osmolalité plasmatique coïncidait avec une diminution des niveaux plasmatiques d'AVP et une augmentation des niveaux plasmatiques d'apéline (Azizi et al., 2008).

Cette étude montre donc que l'osmolalité plasmatique est un régulateur physiologique majeur des taux plasmatiques d'AVP et d'apéline chez l'homme. De plus, la relation croisée entre la régulation de l'apéline et de l'AVP observée chez l'homme confirme les résultats des études sur la déshydratation menées chez le rat et démontre que, comme l'AVP, l'apéline participe au maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme, que ce soit chez l'homme ou chez le rongeur.

4) Effets de l'âge sur la régulation croisée entre l'apéline et l'AVP

Chez les personnes âgées, il a été montré que, du fait de la diminution de la prise de boisson et de la perte excessive d'eau, le risque de déshydratation était plus élevé que chez les adultes jeunes (Phillips et al., 1984; Jéquier and Constant, 2010). Du fait de leur implication dans la régulation de l'équilibre hydrique, l'apéline et l'AVP ont été étudiées chez le sujet âgé.

Il a été montré que le vieillissement entraînait, chez l'Homme, une augmentation de la taille des neurones magnocellulaires vasopressinergiques (Fliers et al., 1985) ainsi que du nucléole (Hoogendijk et al., 1985) et de l'appareil de Golgi (Lucassen et al., 1994; K. Palin et al., 2009) de ces neurones.

Chez le rongeur, il a été montré que le vieillissement entraînait une augmentation des taux plasmatiques d'AVP alors que les taux plasmatiques d'apéline sont considérablement diminués (Fliers and Swaab, 1983; Terwel et al., 1992; Sladek and Olschowka, 1994; Karine Palin et al., 2009). Une étude conduite chez le rat Wistar mâle âgé (22 semaines) a montré qu'au niveau du SON, l'ARNm de l'AVP avait une expression réduite alors que l'ARNm de l'apéline était augmenté par rapport à leur expression respectives chez le rat Wistar mâle adulte (3 semaines) (Sauvant et al., 2014). De plus, la déshydratation, qui entraîne chez l'adulte une augmentation des taux plasmatiques d'AVP et une baisse concomitante de ceux de l'apéline, n'a aucun effet chez le rat âgé sur les taux plasmatiques

d'AVP et d'apéline. Ce manque de régulation par un stimulus osmotique semble lié au fait que chez le sujet âgé, les taux plasmatiques d'AVP sont déjà très augmentés, alors que les taux plasmatiques d'apéline sont fortement diminués et que ces limites ne peuvent pas être franchies (De Mota et al., 2004; Sauvant et al., 2014).

Ainsi, le vieillissement entraînerait une perte de la régulation croisée de l'AVP et de l'apéline en réponse à des contraintes osmotiques prolongées. Ceci expliquerait la faible tolérance des patients âgés à la déshydratation. Cependant cette hypothèse se doit d'être confirmée par des études cliniques impliquant ces patients âgés.

III) Rôle dans la fonction cardiaque

1) Effets de l'apéline sur les vaisseaux

Il a été montré *in vitro* que l'injection d'apéline 13 dans des artérioles mésentériques humaines précontractées par un analogue du thromboxane A2 induisait une vasodilatation de ces artères. Cet effet a également été retrouvé, mais de façon atténuée, dans les artères hépatiques de patients cirrhotiques. De façon intéressante, l'ajout d'un inhibiteur de NO synthase (le N(w)-nitro-L-arginine méthylester ou L-NAME) diminue l'effet vasodilatateur de l'apéline sur les artères mésentériques saines mais n'empêche pas l'effet du peptide sur les artères présentant un défaut de l'épithélium (Salcedo et al., 2007), suggérant un effet vasodilatateur, NO et endothélium dépendant de l'apéline. L'effet vasodilatateur a également été observé chez le rat lors d'études *ex vivo* sur des artérioles glomérulaires afférentes et efférentes précontractées par l'Ang II (Hus-Citharel et al., 2008) et sur l'aorte précontractée à la noradrénaline (Iturrioz et al., 2010a). Puis *in vivo*, sur des artérioles humaines de l'avant-bras où l'injection d'apéline-36 ou de pE13F entraînait une vasodilatation des artérioles alors que la même injection en présence d'un inhibiteur de NO synthase atténuait l'effet de l'apéline sur les artérioles (Japp et al., 2008).

Afin de confirmer l'effet vasodilatateur endothélium dépendant de l'apéline, des études ont été effectuées en injectant de l'apéline *in vitro* sur des artères prélevées chez l'homme où a été retiré l'endothélium vasculaire (Katugampola et al., 2001; Maguire et al., 2009) ou *in vivo* chez des souris dont les artères ont été désendothélisées par un prétraitement de L-NAME pendant 8 semaines (Nagano et al., 2013). Il a été montré dans ces études qu'en l'absence d'endothélium, l'apéline exerçait un effet vasoconstricteur sur les vaisseaux. Il a donc été montré que la stimulation des ApélineR situés sur l'endothélium entraînait une vasodilatation NO-dépendante. Néanmoins, l'ApélineR est également

présent à la surface des cellules musculaires lisses (Wang et al., 2011). Leur stimulation entraîne une vasoconstriction uniquement visible en absence d'endothélium, qui impliquerait une autre voie de signalisation que celle du NO comme une action directe de l'apéline sur les cellules musculaires lisses (Wang et al., 2011).

Au niveau des cellules endothéliales, la liaison de l'apéline à son récepteur induit une phosphorylation de la NO synthase via l'activation de la voie PI_3K/Akt et provoque une synthèse de NO (Zhong et al., 2007). Le NO produit diffuse ensuite dans les cellules musculaires lisses où il active une protéine à activité guanylate cyclase qui déphosphoryle le Guanosine TriPhosphate (GTP) en Guanosine MonoPhosphate cyclique (GMPc). L'augmentation de GMPc provoque une activation de la Protéine Kinase C (PKC) qui va, d'une part, activer la pompe SERCA ATPase permettant une réabsorption du calcium vers le réticulum sarcoplasmique. D'autre part, la PKC va favoriser la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine réduisant la tension cellulaire et entraînant une vasodilatation (Japp and Newby, 2008; Ladeiras-Lopes et al., 2008; Rastaldo et al., 2011).

En l'absence d'un endothélium fonctionnel, l'apéline se lie directement à l'ApélineR présent sur les cellules musculaires lisses. Une fois l'ApélineR activé, il active la PKC provoquant une production de inositol triphosphate (IP_3) et de diacylglycérol (DAG). Ces médiateurs induisent une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et une phosphorylation des chaînes légères de la myosine provoquant une vasoconstriction (Hashimoto et al., 2006; Rastaldo et al., 2011; Modgil et al., 2013) **(Figure 34)**.

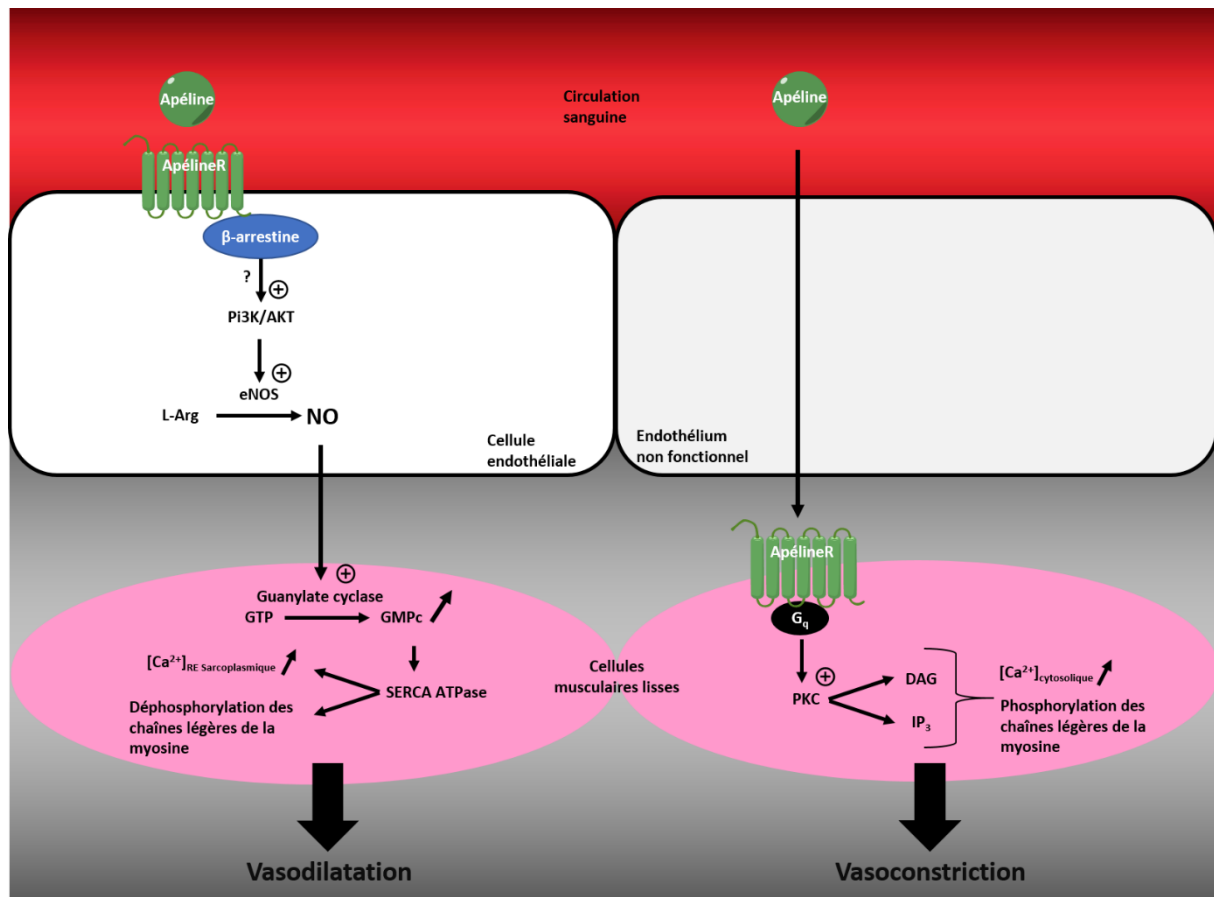


Figure 34 : Mécanismes vasodilatateur et vasoconstricteur induits par l'apéline.

2) Effets sur la pression artérielle

Il a été montré que l'injection systémique de K17F, pE13F, d'apéline 13 ou de R12F chez le rat normotendu induit une baisse de la pression artérielle, de façon NO dépendante (D. K. Lee et al., 2000; Reaux et al., 2001; Tatemoto et al., 2001; Cheng et al., 2003; El Messari et al., 2004; Nagano et al., 2013; Gerbier et al., 2017).

Au niveau central, l'effet de l'apéline est différent suivant la localisation de l'injection et le fait que le rat soit anesthésié ou vigile ou qu'il soit normotendu ou hypertendu. En effet, il a été montré que l'injection d'apéline-13 dans le NTS et dans les cellules de la médulla oblongata rostroventrolatérale du rat Sprague-Dawley anesthésié augmentait la pression artérielle (Seyedabadi et al., 2002). Il a également été montré que l'injection i.c.v d'apéline-13 chez le rat Wistar Kyoto (WKY) vigile augmentait la pression artérielle (Kagiyama et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré que l'injection i.c.v d'apéline-13 dans le PVN de rat WKY et SHR anesthésiés augmentait la pression artérielle de façon dose-dépendante avec un caractère hypertenseur de l'apéline-13 exacerbé chez le SHR (Zhang et al., 2014). De plus, il a été montré que l'injection de pE13F dans la médulla rostroventrolatérale de rats WKY

normotendus anesthésiés entraînait une légère augmentation de la pression artérielle et que ce mécanisme impliquait une activation consécutive du récepteur à l'AVP V1a (Griffiths et al., 2017). Cependant, il a été montré que l'injection i.c.v d'apéline 13 dans le SFO de rats Sprague-Dawley anesthésiés entraînait une diminution de la pression artérielle (Dai et al., 2013). De plus, il a été montré que suite à un stress, l'injection i.c.v d'apéline-13 chez le SHR vigil limitait l'effet presseur dû au stress, indiquant donc que l'apéline-13 pourrait jouer le rôle d'antihypertenseur dans ce modèle de rat puisque la même expérience réalisée chez le WKY ne montrait pas de limitation, ni d'augmentation de l'effet presseur (Gomolka et al., 2015). Enfin, il a été montré que l'injection i.c.v chez le rat anesthésié de pE13F n'entraînait pas de modification de la pression artérielle (Reaux et al., 2001). D'autres études sont donc nécessaires afin de déterminer précisément le rôle cérébral de l'apéline sur le contrôle de la pression artérielle.

3) Effets sur la contractilité cardiaque

Il a été montré sur des cœurs isolés perfusés de rat que l'apéline-16 (peptide non endogène constitué des 16 résidus C-terminaux de la préproapéline) induisait une augmentation dose-dépendante de la tension cardiaque avec une puissance comparable à celle de l'adrénomédulline ou de l'endothéline, de puissantes molécules endogènes inotropes positives (Szokodi et al., 2002). Cet effet a été confirmé ex vivo et in vivo. Ex vivo, sur des cardiomyocytes sains isolés où l'application d'apéline-16 induisait une augmentation significative du raccourcissement des sarcomères (Farkasfalvi et al., 2007). In vivo, en injectant de façon aigüe par voie i.v chez le rat normotendu ou insuffisant cardiaque de l'apéline-16 pendant 20 min à une dose de 10 ng/kg, il a été montré une amélioration de la contractilité cardiaque (Berry et al., 2004). In vivo encore, en injectant, par voie i.p chez la souris, pE13F qui augmente la contractilité cardiaque tout en diminuant la pré-charge (toute force s'opposant au remplissage du cœur) et la post-charge (toute force s'opposant à l'éjection du sang par le cœur) (Ashley et al., 2005).

Il est établi que l'effet inotrope positif est attribué à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Cette augmentation passe généralement soit par l'activation des canaux calciques de types L, soit par l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ (NHE) qui inhibe l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) et active l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ inverse (NCX*) (Katz and Lorell, 2000; Bers, 2002; Szokodi et al., 2002; Dorn, 2010; Mathar et al., 2014).

Dans le cas de l'apéline, les mécanismes responsables de cet effet sont encore mal connus et sujet à débats. L'effet inotrope positif de l'apéline est indépendant de l'activité des canaux calciques de type L, de la libération de NO, de l'activation du récepteur AT1, de l'activation des récepteurs α et β -

adrénergiques ainsi que de l'activation des récepteurs de l'endothéline de type A et B (Szokodi et al., 2002). Il a été montré que l'inhibition séparée de la PLC, la PKC, du NHE et du NCX*i* limitait l'effet inotrope positif de l'apéline, suggérant que l'apéline, en activant l'ApélineR, entraînait une activation de la PLC induisant la production de DAG. Ce DAG activerait les NHE via la PKC entraînant une augmentation de Na⁺ intracellulaire qui provoquerait l'activation des NCX*i* échangeant ce Na⁺ par du Ca²⁺. L'augmentation de calcium intracellulaire augmente le pH cytosolique et de fait entraîne une hypersensibilité des myofilaments d'actine au calcium et à induire leur contraction (Szokodi et al., 2002). L'implication des canaux NHE et NCX*i* a été confirmée lors d'une étude montrant également que l'apéline induisait, par un mécanisme PKC dépendant, l'activation de la pompe SERCA permettant la réabsorption du Ca²⁺ cytosolique dans le réticulum sarcoplasmique pendant la diastole, ajoutant à l'apéline une propriété lusitrope positive (la réabsorption de calcium entraîne une relaxation du cœur) en plus de son effet inotrope positif (Wang et al., 2008).

A l'amélioration de la contractilité induite, s'ajoute une augmentation de l'amplitude de la réponse au taux intracellulaire de calcium (Dai et al., 2006; Wang et al., 2008). Ainsi, il a été suggéré que la production d'IP3 induite par l'activation de la PLC pourrait également provoquer la libération de calcium dans le cytoplasme via la liaison de l'IP3 sur son récepteur sarcomérique (IP3R) (Rastaldo et al., 2011). Egalement, l'ApélineR activé pourrait, par un mécanisme PLC indépendant, provoquer l'activation du récepteur à la ryanodine (RyR) situé sur le sarcomère qui provoquerait une libération massive de calcium dans le cytoplasme (Galanth et al., 2012) (Figure 35).

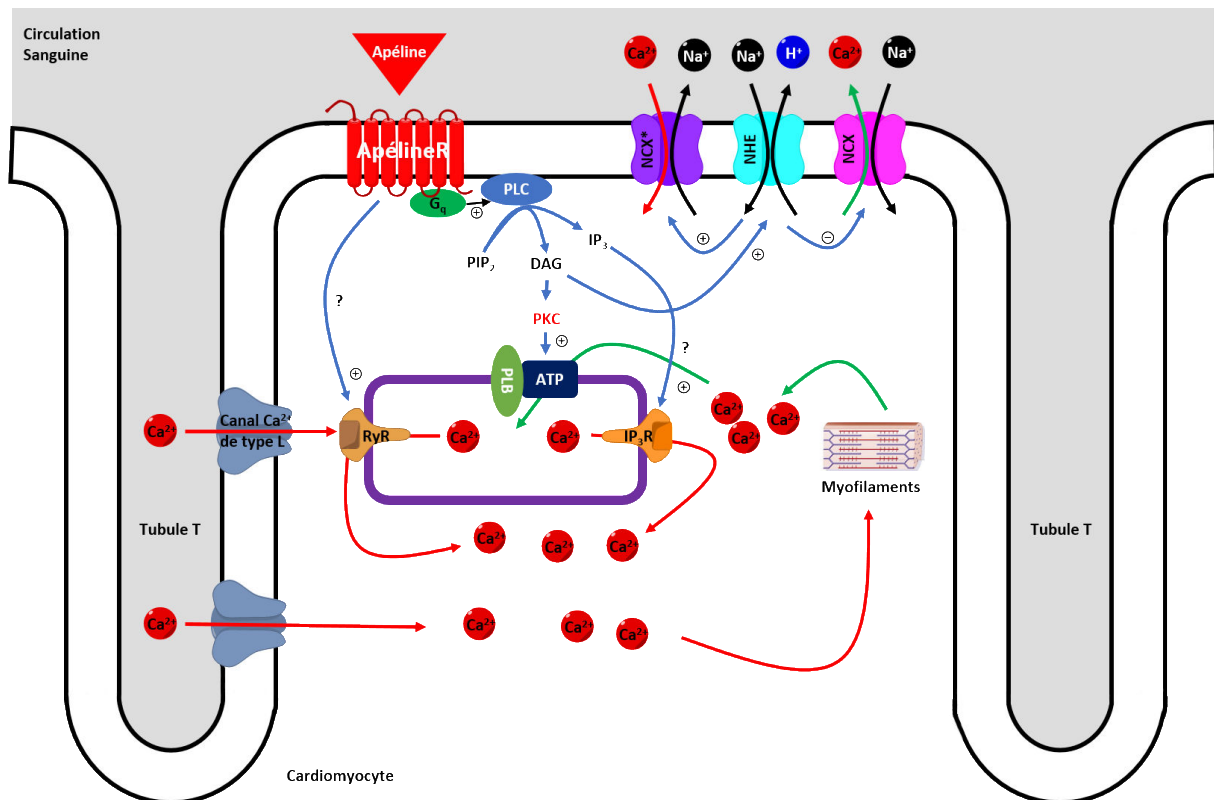


Figure 35 : Voies de signalisation intracellulaires responsables de l'effet inotrope positif de l'apéline (Galanth et al., 2012).

Les flèches rouges indiquent les flux de calcium au cours de la systole. Les flèches vertes indiquent le transport du calcium durant la diastole. Les flèches bleues indiquent les possibles actions induites par l'apéline au cours de la contraction cardiaque.

Chapitre 4 : Le récepteur de l'apéline, cible thérapeutique potentielle

I) Implication dans les désordres hydriques

Comme décrit plus haut, l'apéline possède un effet aquarétique via son action centrale en inhibant la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine et aussi via son action directe au niveau du rein en augmentant le flux sanguin rénal et en ayant un effet opposé à celui de l'AVP au niveau du canal collecteur. Ainsi l'ApélineR représente une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de pathologies associées à une rétention hydrique et/ou une hyponatrémie.

L'hyponatrémie est définie, chez l'Homme, par une concentration plasmatique en sodium inférieure à 135 mmol/L. Ce désordre métabolique fréquent est associé à une augmentation du risque de mortalité chez les patients hospitalisés et est plus fréquemment associée à une rétention de l'eau extracellulaire qu'à des apports alimentaires en sodium insuffisants. L'hyponatrémie peut être secondaire à la prise de certains traitements (antidépresseurs, diurétiques, ...), à une insuffisance cardiaque ou hépatique chronique. L'hyponatrémie peut également être due au syndrome de sécrétion inapproprié d'AVP (SIADH), où celle-ci est alors secondaire à une osmorégulation anormale de l'AVP (Ellison and Berl, 2007). Il est donc important en clinique, devant une hyponatrémie, de pouvoir déterminer la concentration plasmatique d'AVP. Toutefois, celle-ci est difficile à mesurer en pratique, notamment du fait de la faible demi-vie de l'AVP. La copeptine est depuis une dizaine d'années utilisée comme marqueur de substitution à l'AVP. En effet, la copeptine correspond à la partie C-terminale du précurseur de l'AVP et est sécrétée de façon équimolaire à l'AVP dans la circulation sanguine mais présente une demi-vie plus longue. De plus, les taux plasmatiques d'AVP et de copeptine sont fortement corrélés (Morgenthaler et al., 2008; Balanescu et al., 2011). Ce marqueur a permis de différencier, parmi les patients hyponatrémiques, les patients atteints de polydipsie primaire, qui présentent une faible concentration plasmatique en copeptine et une faible osmolalité urinaire, des patients dont l'hyponatrémie résulte d'une autre cause (Fenske et al., 2009).

Dans le cadre du SIADH, étant donné que l'AVP et l'apéline sont régulées de façon opposée par les stimuli osmotiques, les taux plasmatiques d'apéline parallèlement à ceux de l'AVP/copeptine ont été mesurés chez les patients atteints de SIADH. Les taux d'apéline et de copeptine chez ces patients étaient inappropriés puisqu'ils étaient respectivement 26 et 75% plus élevés que chez les volontaires sains (Blanchard et al., 2013). Ceci suggère que l'augmentation de la sécrétion d'apéline dans la circulation sanguine n'est pas suffisante pour compenser l'augmentation des taux plasmatiques d'AVP ne permettant pas de corriger l'hyponatrémie.

Comme développé plus haut, en réponse à l'augmentation de l'osmolalité plasmatique on observe une augmentation de la sécrétion d'AVP et une diminution de la sécrétion d'apéline ce qui permet une réabsorption de l'eau par le rein. A cela s'ajoute également la sensation de soif entraînée par l'augmentation de l'osmolalité plasmatique. Chez l'Homme, la symptomatologie associant une prise d'eau excessive (polydipsie) et une diurèse importante (excrétion d'urine hypotonique) s'appelle le syndrome polyuro-polydipsique (SPP). Le SPP peut être secondaire à 3 causes : le diabète insipide (DI) central (partiel ou complet), le DI néphrogénique (partiel ou complet) et la polydipsie primaire (PP). Le DI central (DIC) est secondaire à une déficience totale ou partielle de sécrétion de l'AVP au niveau central, reflétée par de faibles niveaux de copeptine plasmatique. Dans le DIC, les cas d'hyponatrémie sévère ne surviennent qu'en cas de restriction d'accès à l'eau. Le DI néphrogénique (DIN) est secondaire à l'insensibilité rénale à l'AVP due à des mutations héréditaires ou congénitales du récepteur V2 de l'AVP ou des AQP2. La PP consiste en une prise excessive d'eau alors que l'osmolalité plasmatique n'est pas perturbée. La PP n'est pas due à une déficience ou une résistance à l'AVP mais est plutôt le résultat d'une prise d'eau excessive sur une longue durée, en l'absence de désordre de la régulation de l'osmolalité plasmatique et qui est fréquente chez les malades souffrant de troubles psychiatriques (Christ-Crain and Fenske, 2016). Dans ce contexte, il a été montré que le dosage plasmatique de copeptine chez l'Homme permettait d'établir avec fiabilité la cause du SPP (Timper et al., 2015).

De même que dans l'hyponatrémie, il a été montré que l'équilibre Apéline/AVP plasmatique était dérégulé dans le SPP (Urwyler et al., 2016). En effet, chez les patients ayant un DIN complet (DINc), les taux de copeptine sont 13 fois plus élevés que chez les patients sains ; les taux d'apéline sont aussi plus élevés (1,6 fois). Cette moindre augmentation de la concentration d'apéline peut s'expliquer par le fait que le système apéline/AVP cherche à rééquilibrer la balance entre les deux hormones. Cependant, dans le DINc, l'AVP ne possède plus son activité antidiurétique au niveau du rein dû soit à la mutation de son récepteur V2, soit à la mutation de l'AQP2. L'apéline serait donc, dans cette pathologie, la seule hormone capable d'exercer un effet au niveau du rein en augmentant la diurèse.

Dans le DIC complet (DICc), les niveaux de copeptine plasmatique sont diminués de 52% alors que ceux d'apéline plasmatique sont légèrement abaissés de 18% par rapport aux taux mesurés chez les volontaires sains. De plus, le ratio apéline/copeptine chez les patients atteints de DICc est supérieur à celui des volontaires sains. Ceci suggère que la diminution de la concentration d'apéline plasmatique chez les patients atteints de DICc est insuffisante comparée à la très forte diminution du taux d'AVP/copeptine plasmatique. Ainsi, le déséquilibre de la balance effet antidiurétique de l'AVP/effet diurétique de l'apéline n'est pas corrigé, ce qui entraîne une polyurie.

Enfin dans la PP, la concentration plasmatique de copeptine et le ratio apéline/copeptine sont similaires à ceux des volontaires sains. Pourtant, la concentration plasmatique d'apéline est légèrement, mais significativement, diminuée chez les patients atteints de PP. Ceci suggère qu'un rapport apéline/copeptine normal atteste d'une homéostasie hydrique équilibrée alors qu'une augmentation, dans le DIN complet (DINc), ou une diminution, dans le DICc, de ce rapport comparé aux volontaires sains indique une perturbation de la régulation de l'équilibre hydrique. Les résultats obtenus chez les patients atteints de PP suggèrent que l'apéline pourrait être directement impliquée dans le développement de cette pathologie dont la cause est, à l'heure actuelle, mal connue. En effet, la diminution de la production d'apéline chez les patients pourrait être responsable de la très forte prise de boisson puisqu'il a été montré chez le rat déshydraté que l'injection par voie i.c.v d'apéline entraînait une inhibition significative de la prise de boisson (Reaux et al., 2001). Cependant, l'apéline circulante n'a pas pour seule origine les neurones magnocellulaires vasopressinergiques. Elle peut être produite par l'endothélium (O'Carroll et al., 2000; Tatemoto et al., 2001; Kleinz and Davenport, 2004; Kleinz et al., 2005), le cœur (Medhurst et al., 2003) ou les adipocytes (Boucher et al., 2005). Dans ces conditions, d'autres études sont nécessaires pour confirmer l'implication de l'apéline dans la physiopathologie de la PP.

En conclusion, l'ApélineR constitue une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de pathologies dans lesquelles l'équilibre hydrique est perturbé. En particulier, le développement d'agonistes de l'ApélineR ou d'analogues de l'apéline métaboliquement stables pourrait se révéler particulièrement utile dans le traitement de l'hyponatrémie.

II) Implications dans les pathologies cardiovasculaires

L'apéline et son récepteur pourraient être impliqués dans le développement et le maintien de pathologies cardiovasculaires.

En effet, il a été montré que les taux plasmatiques d'apéline étaient plus élevés chez les patients présentant un début d'insuffisance cardiaque par rapport aux volontaires sains (Chen et al., 2003) mais qui diminuent avec l'aggravation de la pathologie (Chen et al., 2003; Földes et al., 2003; Chong et al., 2006), suggérant que l'apéline aurait un rôle au moment du remodelage en induisant l'hypertrophie des cardiomyocytes. Il a également été montré chez le rat que l'expression de l'apéline et de l'ApélineR augmentait ou se maintenait lors de la phase d'hypertrophie du ventricule gauche (début d'insuffisance cardiaque) mais chutait lors de l'installation de la pathologie (Iwanaga et al., 2006).

Il a également été montré que l'injection aigüe d'apéline-16 par voie i.v chez le rat insuffisant cardiaque suite à un infarctus du myocarde, augmentait le volume sanguin éjecté par le cœur tout en réduisant la pression diastolique du ventricule gauche sans altérer les pré- et post-charges. Un effet similaire a été observé chez le rat témoin (Berry et al., 2004). De plus, il a été montré dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par l'isoprotérénol que l'injection d'apéline-36 restaurait partiellement la fonction ventriculaire gauche (Jia et al., 2006). De même, il a été montré que l'apéline augmentait la contractilité du muscle cardiaque du ventricule droit développant une insuffisance cardiaque consécutive à une hypertension pulmonaire (Dai et al., 2006). Il a été montré que l'apéline a un effet direct sur la propagation du potentiel d'action et de la contractilité des cardiomyocytes (Farkasfalvi et al., 2007). Cette induction de la contraction des cardiomyocytes s'effectue par l'activation de la voie Pi_3K -Akt-ERK^{1/2}-p70S6K (Xie et al., 2015). Ces études appuient l'hypothèse d'un rôle de l'apéline dans le remodelage cardiaque.

Egalement, il a été montré que l'inactivation génique de la préproapéline chez la souris entraînait le développement d'une insuffisance cardiaque à partir du 6^{ème} mois (Kuba et al., 2007). Enfin, chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque, il a été montré que l'injection aigüe par voie i.v d'apéline-36 ou de pE13F réduisait la pression artérielle ainsi que les résistances vasculaires (Japp et al., 2008).

Enfin, dans l'insuffisance cardiaque, la diminution du débit cardiaque associée à la diminution du volume sanguin circulant induit une activation des barorécepteurs. Ceux-ci activent le système nerveux sympathique, le SRA-aldostérone ainsi que la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine. Cette libération d'AVP entraîne une réabsorption d'eau par le rein (Urso et al., 2015). Il a été montré que 10% des patients insuffisants cardiaques présentent une hyponatrémie faible à modérée (Sica, 2005). De plus, les patients atteints d'une insuffisance cardiaque sévère et présentant une hyponatrémie ont souvent des taux plasmatiques d'AVP élevés (Goldsmith et al., 1986) et l'hyponatrémie est associée avec une réduction de la survie et une augmentation du risque de complications (Chin and Goldman, 1996). Il a été montré chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique que les niveaux de copeptine et d'apéline plasmatiques étaient 190% et 25%, respectivement, plus élevés que ceux des volontaires sains (Blanchard et al., 2013).

Ainsi, du fait de l'effet aquarétique, de la vasodilatation, de l'effet inotrope positif subséquents à l'activation de l'ApélineR, ce récepteur constitue une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et encourage le développement d'agonistes de l'ApélineR ou des analogues de l'apéline métaboliquement stable à visée thérapeutique dans ce contexte.

Chapitre 5 : Caractériser l'interaction apéline/récepteur pour développer une molécule d'intérêt

Afin de développer des outils thérapeutiques utiles dans le traitement des désordres hydriques ou de l'insuffisance cardiaque, les études se sont appuyées sur les études structure-fonction menées sur l'apéline et son récepteur. Ces études ont permis de déterminer que les résidus basiques de pE13F ou de K17F étaient importants pour la liaison du peptide à l'ApélineR (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003; El Messari et al., 2004) ainsi que le rôle de la Phe C-terminale de l'apéline, qui se fixe dans une poche aromatique située au fond du site de liaison (Iturrioz et al., 2010b). Cette Phe est responsable de l'internalisation du récepteur et du recrutement de la β -arrestine médiant les effets hypotenseurs de l'apéline (El Messari et al., 2004; Lee et al., 2005; Iturrioz et al., 2010b; Ceraudo et al., 2014). Les effets *in vivo* de l'apéline détaillés dans les parties précédentes sont transitoires ce qui suggère que les différentes formes moléculaires d'apéline possèdent une demi-vie plasmatique très courte. En effet, dans le plasma de souris, la demi-vie de K17F et de pE13F ont été évaluées à, respectivement, 4,6 et 7,2 minutes (Gerbier et al., 2017). Dans le plasma de rat, la demi-vie de pE13F a été évaluée à 14 minutes (Murza et al., 2014) tandis que l'apéline-36 possède une demi-vie inférieure à 5 minutes dans le plasma humain (Japp et al., 2010). Enfin, notre laboratoire a évalué que la demi-vie de K17F *in vivo* chez la souris était de 44 secondes (données non publiées). Du fait de cette demi-vie très courte, deux types de stratégies ont été mises en place afin de développer des agonistes ou des antagonistes puissants et sélectifs de l'ApélineR. Soit, le développement de molécules synthétiques non-peptidiques, soit le développement d'analogues de l'apéline métaboliquement stables.

I) Molécules non-peptidiques ou pseudopeptidiques

La toute première étude ayant cherché à développer un agoniste non-peptidique de l'ApélineR humain, a consisté à cribler une chimiothèque de 800 composés porteurs d'un groupement fluorescent (lissamine) par une technologie originale de transfert d'énergie de fluorescence (FRET) entre le groupement fluorescent et l'eGFP fusionnée à l'extrémité N-terminale de l'ApélineR humain exprimé de façon stable en cellules HEK-293. Ce criblage a permis d'isoler plusieurs composés ayant une affinité pour l'ApélineR allant de 90 nM à 1000 nM dont le composé E339-3D6 présentant une affinité pour l'ApélineR de 90 nM, via cette technique de FRET, et 390 nM, via la technique de radioliasion (Iturrioz et al., 2010a). Ce composé correspond à un pseudopeptide composé de 4 synthons comprenant : une pipéridine, un imidazolium benzylé, un amino-thiazol et une Lys sur laquelle est greffée une chaîne

dodécarbonée reliée à une lissamine. L'étude de ses caractéristiques pharmacologiques *in vitro* et de ses effets *ex vivo* et *in vivo* ont montré que ce composé présentait la même capacité que pE13F et K17F à induire l'internalisation de l'ApélineR mais inhibait partiellement la production d'AMPc induite par la FSK. Ainsi, l'E339-3D6 se comporte comme un agoniste entier vis-à-vis de l'internalisation de l'ApélineR et comme un agoniste partiel vis-à-vis du couplage à la protéine G α i. Les études *ex vivo*, effectuées sur des anneaux aortiques de rat précontractés par la noradrénaline, ont montré que l'E339-3D6 induisait de façon dose-dépendante et endothélium-dépendant, la vasorelaxation des anneaux aortiques et ce, de façon aussi efficace que l'acétylcholine et similaire à K17F. Les études *in vivo* ont montré que l'injection par voie i.c.v d'E339-3D6 chez la souris vigile et déshydratée induisait une diminution dose-dépendante de la libération d'AVP dans le sang, suggérant que l'E339-3D6 exerce les mêmes effets que l'apéline au niveau des neurones magnocellulaires vasopressinergiques (Iturrioz et al., 2010a).

Par la suite, des études de relation structure-activité menées sur l'E339-3D6 ont permis de développer différents composés ayant une affinité submicromolaire pour l'ApélineR. Elles ont également permis de montrer que la taille du linker permettait la sélectivité du composé vis-à-vis du récepteur AT1, que le groupement 3-benzyl-1-méthyl-3H-1 λ ⁴-imidazole était important pour induire l'internalisation de l'ApélineR ainsi que la liaison via le groupement méthylamine. Les deux autres groupements méthylamines et le groupement imine ont été également montrés comme étant importants pour l'affinité et le pouvoir internalisant du composé. Néanmoins, l'essentiel de l'activité de liaison et d'induction de l'internalisation étaient portées par le groupement lissamine (Margathe et al., 2014). Ce composé est cependant trop volumineux et fluorescent, ce qui rend impossible son utilisation potentielle comme agent thérapeutique.

Une autre étude a cherché par un criblage haut débit à découvrir des petites molécules, agonistes du récepteur de l'apéline grâce à un test de recrutement de la β -arrestine à l'ApélineR. Le criblage de 330600 composés, a permis d'isoler le ML223 présentant une EC₅₀ de 3,7 μ M pour induire le recrutement de β -arrestine par l'ApélineR avec une sélectivité pour l'ApélineR vis-à-vis du récepteur AT1 d'un facteur 21. Du fait de cette bonne sélectivité, ce composé a servi de pharmacophore pour des études structure-activité visant à augmenter l'efficacité du composé à induire le recrutement de la β -arrestine mais aucune amélioration n'a pu être obtenue (Khan et al., 2010). Au cours de cette même étude, une molécule au caractère antagoniste de l'ApélineR a été découverte, le ML221, et qui possède une affinité de 2 μ M et une sélectivité vis-à-vis du récepteur AT1 d'un facteur 37 (Maloney et al., 2010, 2012). Le ML221 a été utilisé *in vivo* et présente une activité inhibitrice sur le pouvoir angiogénique de l'apéline (Hall et al., 2017). Il pourrait être intéressant d'observer les effets *in vivo* d'un autre antagoniste de l'ApélineR, présentant une affinité pour le récepteur du même ordre que le

ML221, le cyclo(1-6)CRPRLC-KH-cyclo(9-14)CRPRLC qui consiste en motifs RPRL, motif clé de la liaison de pE13F à l'ApélineR, cyclisés (Macaluso et al., 2011).

Par la suite, une autre étude a cherché à découvrir une petite molécule agoniste de l'ApélineR par une méthode de criblage utilisant, premièrement, un test de mobilisation de calcium intracellulaire, puis un test de radiolisation. Pour ce faire, une chimiothèque de petites molécules a été utilisée en ne prenant que les molécules présentant des caractéristiques physicochimiques proches de l'apéline puis 100 composés ont été testés. Une molécule, le composé 1, a présenté une affinité de 5,2 μM pour l'ApélineR et une capacité à mobiliser le calcium intracellulaire de 21,5 μM . Cette molécule a ensuite servi de pharmacophore pour des études structure-activité visant à augmenter l'efficacité du composé. Ainsi, il a été obtenu une molécule, le composé 22, présentant une affinité de 1,3 μM pour l'ApélineR et une EC_{50} de 0,8 μM pour induire la mobilisation de calcium (Narayanan et al., 2016). Du fait de sa faible capacité à se lier et à activer l'ApélineR par rapport aux fragments endogène d'apéline, aucune étude *ex vivo* et *in vivo* n'ont été menées.

Enfin, une autre étude a développé une petite molécule agoniste de l'ApélineR biaisée vis-à-vis de la protéine G, le CMF-019 (acide (S)-3-[1-(1-Ethyle-propyle)-2-thiophène-2-ylmethyl-1H-benzoimidazole-5-carbonyl]-amino-5-methyl-hexanoïque) (Read et al., 2016). Cette molécule présente une affinité nanomolaire pour l'ApélineR et une capacité nanomolaire d'activation de la protéine $\text{G}\alpha_i$ semblable à celle de pE13F. Par contre, elle est 100 fois moins efficace à induire le recrutement de la β -arrestine et l'internalisation du récepteur. Ceci se traduit *in vivo*, lors de l'injection de cette molécule par voie i.v chez le rat Sprague-Dawley anesthésié, par un effet inotrope positif avec une augmentation de l'éjection et du débit cardiaque et une absence de variation de la pression artérielle jusqu'à 500 nmol. Ceci tend à confirmer que l'effet hypotenseur de l'apéline suit un mécanisme β -arrestine-dépendant. De plus, sa demi-vie dans le plasma de rat est de 38 minutes et sa petite taille pourrait lui permettre d'être administrée par voie orale (Read et al., 2016). Néanmoins, d'autres études doivent être entreprises pour confirmer le potentiel thérapeutique de cette molécule dans des modèles animaux d'insuffisance cardiaque et pour évaluer son mode d'administration (**Tableau IV**).

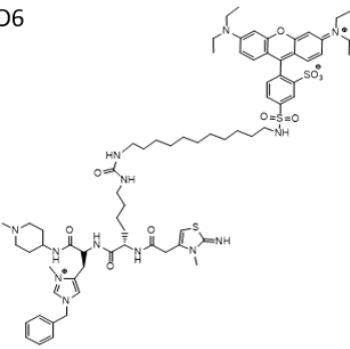
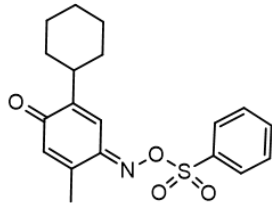
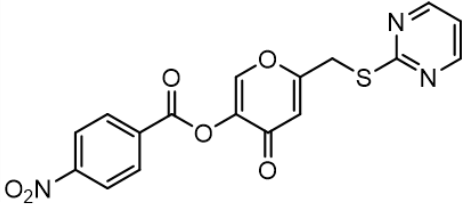
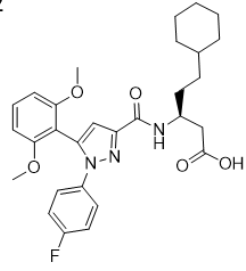
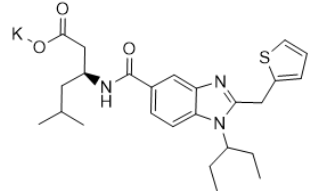
Molécule	Caractère	Publication
E339-3D6 	Agoniste	Iturrioz et al., 2010
ML223 	Agoniste	Khan et al., 2011
ML221 	antagoniste	Maloney et al., 2011
Cyclo(1-6)CRPRLC-KH-cyclo(9-14)CRPRLC Composé 22 	antagoniste	Macaluso et al., 2011
CMF-019 	agoniste	Narayanan et al., 2016
	Agoniste biaisé vis-à-vis de la protéine G _i	Read et al., 2016

Tableau IV : ligands pseudopeptidiques et non-peptidiques de l'ApélineR.

II) Analogues de l'apéline métaboliquement stables

1) Analogues de l'apéline-12

Il a été montré que l'apéline-12, qui n'existe pas *in vivo* et qui correspond aux 12 résidus C-terminaux de la préproapéline (Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe), était le fragment d'apéline le plus court capable de réduire de façon importante la pression artérielle (Tatemoto et al., 2001). Sur cette base, il a été développé 3 analogues cycliques de l'apéline-12 en liant soit, l'Arg¹ et la Phe¹², soit l'Arg¹ et la Lys⁷, soit la Lys⁷ et la Phe¹². L'analogue cyclique Lys⁷-Phe¹² a été montré comme étant le meilleur peptide capable d'inhiber la production d'AMPc induite par la FSK. Néanmoins, tous ces peptides cyclisés présentaient une activité 200 à 1000 fois inférieure à celle de pE13F (Hamada et al., 2008) (**Tableau V**). De ce fait, aucune étude *in vivo* n'a été conduite pour évaluer l'efficacité de ces composés.

Trois autres études ont cherché à développer des analogues de l'apéline en utilisant l'apéline-12 comme patron. La première a développé un composé en ajoutant un groupement nitro (NO₂) à l'Arg¹ de R12F et en substituant la Met¹⁰ de R12F par une norleucine (Nle) et en amidant l'hydroxyle de la Phe (Sidorova et al., 2012). La seconde a développé un composé en méthylant l'amine α l'Arg N-terminale et en substituant la Met¹⁰ du peptide par une Nle (Pelogeykina et al., 2015). Enfin le troisième analogue développé possède un groupement nitro ajouté au groupement guanidinium de l'Arg¹, une Nle à la place de la Met¹⁰ et une amidation sur l'hydroxyle de la Phe C-terminale (Pisarenko et al., 2015). Chacun de ces peptides ont été étudiés *in vivo* et présentent des effets cardioprotecteurs comparables à ceux de pE13F (**Tableau V**). Cependant, aucune de ces études ne détaille les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques de ces peptides, ce qui rend difficile l'évaluation du potentiel thérapeutique de ces analogues.

2) Analogues de l'apéline-36

L'apéline-36 a également été utilisée comme patron pour développer des analogues métaboliquement stables. La stratégie utilisée a consisté à ajouter des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) de tailles différentes sur l'amine libre de la Leu N-terminale de l'apéline-36. L'étude des différents peptides obtenus a montré que l'ajout d'une chaîne de PEG de 40 kDa sur la Leu¹ de l'apéline-36 permettait d'obtenir un analogue capable de lier l'ApélineR et d'induire l'inhibition de la production d'AMPc induite par la FSK de l'ordre du nanomolaire, comparable à celle de l'apéline-36. De plus, la PEG-apéline-36 présentait une augmentation de l'effet inotrope positif et une demi-vie 2,7 fois supérieure à celle de l'apéline-36 (Jia et al., 2012) (**Tableau V**). Bien que ce peptide soit plus efficace et plus stable

in vivo que l'apéline-36, son poids moléculaire et sa demi-vie (moins de 15minutes) le rendent impossible à utiliser pour un usage thérapeutique.

Une autre étude a utilisé le même type de stratégie pour observer les effets de l'apéline-36 sur le métabolisme. En effet, il a été montré que l'apéline-36 diminuait la glycémie et la prise de poids (Castan-Laurell et al., 2011; Galon-Tilleman et al., 2017). Par mutagénèse dirigée, il a été construit une série de variants de l'apéline-36 mutés sur des résidus conservés au cours de l'évolution. Il a été montré que l'apéline-36(L28A) présentait une capacité 100 fois plus faible que l'apéline-36 pour activer l'ApélineR et était incapable d'induire une hypotension chez le SHR. Néanmoins, il conservait le même profil que l'apéline-36 sur le métabolisme, suggérant que cet effet de l'apéline-36 n'est pas médié par l'ApélineR. Par la suite, il a été ajouté une chaîne de PEG de 30 kDa soit à l'extrémité N-terminale, soit à l'extrémité C-terminale de l'apéline-36, soit sur le résidu 28 de l'apéline-36 substitué en Cys. Il a été montré que l'ajout de PEG aux extrémités de l'apéline-36 entraînait une absence d'effet sur le métabolisme alors que le peptide apéline-36-[L28C(30 kDa-PEG)], qui présentait une activité sur l'ApélineR 10000 fois plus faible que l'apéline-36, était incapable de réduire la pression artérielle chez le SHR mais était capable de réduire la glycémie de façon plus importante et plus durable que l'apéline-36 (Galon-Tilleman et al., 2017) (**Tableau V**).

3) Analogues de l'apéline-13 et de pE13F

La majorité des études visant à développer un analogue métaboliquement stable de l'apéline se sont focalisées sur l'apéline-13 (Glu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe) et pE13F (pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe) puisqu'ils sont les fragments endogène d'apéline actifs les plus courts.

La première étude a développé un analogue de pE13F en substituant la Phe C-terminale par un isomère de l'Ala de la série D (peptide appelé F13A). Il a été montré que ce peptide ne présentait pas d'effet hypotenseur, ni d'augmentation de sa demi-vie par rapport à celle de pE13F. L'administration de F13A seul ou simultanément avec pE13F n'entraîne aucune variation de la pression artérielle ce qui suggère que F13A est capable de lier l'ApélineR mais n'est pas capable d'induire un effet hypotenseur alors qu'il antagonise l'effet presseur induit par pE13F (Lee et al., 2005). De fait, ce peptide est communément utilisé comme un antagoniste de l'ApélineR. Pourtant, il a été montré que F13A était capable de lier le récepteur, d'induire l'inhibition de la production d'AMPc induite par la FSK et d'induire la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire (Medhurst et al., 2003). Cependant, sa capacité à induire le recrutement de la β -arrestine et l'internalisation de l'ApélineR n'ont pas été étudiées. Il n'est donc pas possible de conclure si F13A est un antagoniste de l'ApélineR ou un agoniste biaisé vis-à-vis

de la protéine G comme peut l'être K16P (El Messari et al., 2004; Ceraudo et al., 2014) (**Tableau V**). En revanche, il conforte l'hypothèse que l'effet hypotenseur de l'apéline est médié par un mécanisme indépendant de la protéine G.

Suite aux études montrant que l'ECA2 présentait une activité protéolytique sur l'apéline en hydrolysant la Phe C-terminale de pE13F (Vickers et al., 2002), le développement d'analogues ayant une Phe C-terminale protégée afin de stabiliser le peptide a été entrepris. Ainsi Murza et coll. ont effectué un « D-scanning » de pE13F et substitué certains résidus du peptide par un acide aminé non-naturel (Murza et al., 2012). Il a été montré que chaque substitution de résidu par son stéréo-isomère de la série D entraînait une chute de la liaison à l'ApélineR avec un impact plus délétère pour les résidus du motif RPRL, la Lys⁸ et la Gly⁹ de pE13F, suggérant que ce résidu Gly pouvait avoir un rôle structural important. Il a également été montré que la substitution de la Met¹¹ par une Nle n'affectait pas la liaison du peptide à l'ApélineR, n'entraînait aucune augmentation de la demi-vie du composé mais le protégeait de l'oxydation par les produits ciblant la Met de pE13F. Afin de protéger l'analogue de l'hydrolyse par l'ECA2, la Phe C-terminale de pE13F a été substituée par un acide aminé non-naturel. Il a été démontré que les résidus 2-naphtal-Phe (2Nal) et 4-bromo-Phe (4Br(F)) augmentaient la demi-vie du peptide au-delà d'une heure et que les analogues résultants présentaient un profil pharmacologique similaire à celui de pE13F. Il en a également été de même pour la substitution de la Pro¹² de pE13F par un acide aminoisobutyrique (Aib) qui, en possédant un profil similaire à pE13F, voit sa demi-vie passer à environ 50 minutes (Murza et al., 2012). Cependant, aucune étude *in vivo* n'a été conduite sur ce peptide (**Tableau V**).

Suite à cette étude, trois analogues de pE13F ont été développés en utilisant le même patron, pE13F dont la Met¹⁰ est substituée par une Nle (pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe), et différant par leur résidu C-terminal (Murza et al., 2014, 2015) (**Tableau V**). Le premier présente un benzoïlphényle à la place de la Phe C-terminale (Bpa : pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Bpa), le second présente une Tyr-O-benzyle à la place de la Phe (Tyr(OBn) : pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr(OBn)) et le troisième présente un groupement méthyl sur le carbone α de la Phe (L- α Me : pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-(L- α Me)). En comparaison avec pE13F, qui présente une demi-vie de 14 minutes dans le plasma de rat, ces trois analogues présentent une demi-vie *ex vivo* augmentée (55 minutes pour le Bpa, 66 minutes pour le Tyr(OBn) et plus de 120 minutes pour le L- α Me) (Murza et al., 2014). De plus, les composés Bpa et L- α Me présentent une affinité pour l'ApélineR similaire à celle de pE13F mais sont 30 fois plus efficaces pour induire l'inhibition de la production d'AMPc induite par la FSK. De son côté, le composé Tyr(OBn) présente une affinité pour l'ApélineR 60 fois supérieure à celle de pE13F et est 4 fois plus efficace dans l'induction des voies de signalisation, notamment sur le recrutement de la β -arrestine. Il a été montré

in vivo que l'injection par voie i.v de cet analogue chez le rat Sprague-Dawley normotendu entraînait une hypotension supérieure à celle induite par pE13F (Murza et al., 2015) (**Tableau V**). Enfin, dans une étude récente, l'analogue Tyr(OBn) a été utilisé comme patron pour développer des analogues de l'apéline comprenant un macrocycle (Murza et al., 2017). L'étude part de l'hypothèse que, pour se lier, un analogue doit avoir une conformation particulière. Ceci implique, si l'analogue est très flexible, de forts coûts d'énergie entropique et donc une réduction de son affinité pour le récepteur. Ainsi, l'utilisation de macrocycles permettrait de contraindre l'analogue dans une conformation précise et donc de réduire les coûts d'entropie. Pour ce faire, il a été inséré entre l'His⁷ et la Met¹¹ du composé Tyr(OBn), substitués en allylglycine, un macrocycle. Par des études de relation structure-activité, la taille et la nature de ce macrocycle ont été modifiées afin d'obtenir les meilleurs composés. Ceci a conduit au développement d'un agoniste entier de l'ApélineR présentant un profil pharmacologique et un effet hypotenseur comparable à pE13F et 5 composés biaisés vis-à-vis de la protéine G. Sur ces 5 composés biaisés vis-à-vis de la protéine G, un seul a été injecté de façon aigüe par voie i.v chez le rat Sprague-Dawley anesthésié et il n'est pas capable d'induire de baisse de la pression artérielle (Murza et al., 2017) (**Tableau V**). Cette étude conforte encore l'hypothèse que l'effet hypotenseur de l'apéline est médié par un mécanisme β -arrestine dépendant. Bien que cette étude ait développé des composés prometteurs, aucune donnée de demi-vie, ni d'effets *in vivo* n'est détaillée.

Une autre étude a combiné la substitution de résidus de pE13F avec l'addition d'une chaîne palmytoyle sur le Glu N-terminal de pE13F. Il a été montré que la substitution de la Met¹¹ par une Nle et celle de la Pro¹² par un Aib entraînait une augmentation de la demi-vie du peptide dans le plasma de rat. De plus, il a été montré que l'ajout d'une chaîne palmytoylée sur ce peptide modifié augmentait la stabilité du peptide qui présentait alors une demi-vie plasmatique de 29 h tout en conservant les propriétés pharmacologiques du peptide (Juhl et al., 2016). Néanmoins, aucune expérience *in vivo* n'est venue confirmer le potentiel thérapeutique de ce composé.

Une autre étude a cherché à développer un analogue cyclisé de l'apéline-13 en substituant le Glu C-terminal et la Ser⁶ par des Cys formant un pont disulfure entre elles (MM07 : Cys-Arg-Pro-Arg-Leu-Cys-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe) (Brame et al., 2015). Ce composé présente une affinité pour l'ApélineR exprimé en CHO de 300 nM et pour l'ApélineR endogène exprimé dans le tissu cardiaque de 170 nM. Il présente une capacité à induire le recrutement de la β -arrestine 790 fois moins bonne que pE13F et il est 215 fois moins efficace à induire l'internalisation de l'ApélineR, en comparaison à pE13F. Par contre, il présente une activité similaire à pE13F pour induire la contraction de la veine saphène de rat, suggérant qu'il active la protéine G comme pE13F. Ainsi cet analogue de l'apéline-13 serait un agoniste biaisé vis-à-vis de la protéine G. Le MM07 présente une demi-vie dans le plasma de rat de 17,4 minutes ce qui est 8,7 fois plus long que pE13F (2 minutes). Enfin, il a été montré chez le rat que le MM07

induisait une augmentation dose-dépendante de la fraction d'éjection, une diminution des résistances vasculaires mais n'avait pas d'effet sur la pression artérielle. Chez l'homme, il a été montré que l'injection de MM07 entraînait une vasodilatation de la veine de l'avant-bras et une augmentation du débit cardiaque (Brame et al., 2015) (**Tableau V**). Ainsi, le MM07 semble bien être un agoniste biaisé vis-à-vis de la protéine G. Néanmoins, il possède une affinité pour l'ApélineR du même ordre que sa capacité à induire l'internalisation du récepteur. De plus, les auteurs n'expliquent pas la différence entre la capacité du MM07 à induire le recrutement de la β -arrestine à l'ApélineR et à induire l'internalisation de ce dernier. En effet, le MM07 est 3,6 fois plus efficace à induire l'internalisation alors que ce mécanisme est dépendant du recrutement de la β -arrestine. Egaleme nt, les auteurs ne caractérisent pas directement la capacité du MM07 à induire l'activation de la protéine G. On ne peut donc pas savoir si ce composé est réellement un agoniste biaisé vis-à-vis de cette protéine. Si tel était le cas, il conforterait les hypothèses suggérant que l'effet inotrope positif de l'apéline est médié par l'activation de la protéine G et que son effet hypotenseur est médié par le recrutement de la β -arrestine.

Enfin, une étude a cherché à augmenter la demi-vie de pE13F en l'encapsulant dans une nanoparticule constituée de PEG et de liposomes. Il a été montré *in vitro* que pE13F était libéré au bout de 60 minutes avec un pic atteint au bout de 15 h. Par la suite, il a été montré que l'injection chronique, par voie i.p, des nanoparticules chez la souris infarctée développant une insuffisance cardiaque, réduisait la zone d'infarctée et présentait un effet cardioprotecteur (Serpooshan et al., 2015) (**Tableau V**). Ce type de méthodologie pourrait être utile pour augmenter l'efficacité de celles-ci en permettant une libération plus longue.

Analogue	Publication
Analogues de l'apéline-12	
Cyclo(1-12)R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	Hamada et al., 2008
Cyclo(1-7)R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	Hamada et al., 2008
Cyclo(7-12)R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	Hamada et al., 2008
R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F-NH ₂	Sidorova et al., 2012
CH ₃ -R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F	Pelogeckina et al., 2015
N(G)R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F-NH ₂	Pisarenko et al., 2015
Analogues de l'apéline-36	
40kDa-PEG-Apéline-36	Jia et al., 2012
Apéline-36-[L28C(30 kDa-PEG)]	Gallon-Tilleman et al., 2017
Analogues de l'apéline-13 et de pE13F	
E-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-(D)A	Lee et al., 2005
E-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-2NaI	Murza et al., 2012
E-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-4Br(F)	Murza et al., 2012
E-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-Aib-F	Murza et al., 2012
pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Bpa	Murza et al., 2014 Murza et al., 2015
pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Y(O)Bn	Murza et al., 2014 Murza et al., 2015
pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F(L-αCH ₃)	Murza et al., 2014 Murza et al., 2015
Cyclo(7-11)pE-R-P-R-L-S-AllyG-K-G-P-AllyG-P-Y(O)Bn	Murza et al., 2017
Palmitoyl-E-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-Aib-F	Juhl et al., 2016
Cyclo(1-6)C-R-P-R-L-C-H-K-G-P-M-P	Brame et al., 2015
PEG(pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F)	Serpooshan et al., 2015

Tableau V : Analogues de l'apéline métaboliquement stables.

III) Objectifs de thèse

L'apéline via son récepteur participe à la régulation des fonctions cardiovasculaires et au maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme. Ainsi l'ApélineR constitue une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de pathologies cardiovasculaires comme l'insuffisance cardiaque ou dans le traitement de l'hyponatrémie comme le SIADH. L'administration d'un agoniste de l'ApelinR serait particulièrement favorable pour le traitement de ces pathologies. En effet, dans le cas de l'insuffisance cardiaque, cet agoniste pourrait augmenter la diurèse et les performances contractiles du myocarde tout en diminuant les résistances vasculaires. Dans le cas de l'hyponatrémie, cet agoniste pourrait, en favorisant la diurèse aqueuse, augmenter les concentrations de sodium extracellulaire en excréant l'eau libre et en agissant sur les neurones magnocellulaires vasopressinergiques en diminuant la libération d'AVP dans la circulation sanguine et rééquilibrer le rapport apéline/AVP impliqué dans le maintien de l'équilibre hydrique.

Afin de développer de telles molécules il faut d'une part, pour les agonistes, connaître l'organisation structurale et fonctionnelle de l'ApélineR et de son ligand permettant de comprendre comment l'apéline se lie à son récepteur. D'autre part, pour les analogues de l'apéline métaboliquement stables, il faut chercher à augmenter la demi-vie de l'apéline en modifiant le peptide mais sans modifier ses propriétés pharmacologiques par rapport à l'apéline native.

L'objectif de ma thèse a consisté à :

- Identifier les résidus de l'ApélineR responsables des interactions avec les résidus basiques de pE13F par des études structure-fonction par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée.
- Développer des analogues de K17F et de pE13F métaboliquement stables par des études structure-activité de l'apéline et par une approche originale d'addition de chaîne fluorocarbonée à l'extrémité N-terminale de K17F.

Les résultats obtenus par les études structure-fonction, permettront d'initier un criblage *in silico* de chimiothèques virtuelles sur l'ApélineR afin de développer un pharmacophore d'agoniste ou d'antagoniste de ce récepteur. Les études structure-activité, conduiront au développement d'analogues de l'apéline métaboliquement stables qui pourraient constituer des agents thérapeutiques potentiels pour le traitement de l'insuffisance cardiaque et de l'hyponatrémie.

IV) Article 1 : Etude du mode de liaison de pE13F à l'ApélineR

1) Introduction

Afin de définir le mode de liaison de pE13F à son récepteur, nous avons construit plusieurs modèles 3D de l'ApélineR par homologie avec d'autres récepteurs de la famille de la rhodopsine cristallisés ou non.

Dans un premier temps, un modèle tridimensionnel (3D) de l'ApélineR fondé sur le modèle 3D validé du récepteur de la cholécystokinine-8 de type 1 (CCK1R), appartenant à la sous-famille des récepteurs « rhodopsine-like » et situé dans la branche β , a été réalisé. Ce premier modèle 3D de l'ApélineR fut en partie validé par des études de structure-fonction par mutagenèse dirigée et a permis de définir les éléments structuraux impliqués dans l'internalisation de l'ApélineR (Iturrioz et al., 2010b)

La résolution de plusieurs structures cristallographiques de RCPGS ont permis de construire ensuite deux nouveaux modèles 3D de l'ApélineR sur la base des structures cristallographiques du récepteur β 2-adrénérique et du récepteur des chimiokines α , CXCR4. Le premier patron utilisé a été la structure cristallographique du récepteur β 2-adrénérique avec un antagoniste (Rasmussen et al., 2007) . Ce récepteur fait partie de la sous-famille des récepteurs « rhodopsine-like » et est situé dans la branche α . Le second patron sélectionné a été la structure cristallographique du récepteur CXCR4 cristallisé avec un antagoniste peptidique (Wu et al., 2010).

Ce récepteur ayant pour ligand endogène de nature peptidique le Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1) ou CXCL12 appartient aussi à la sous-famille des récepteurs « rhodopsine-like » mais est situé dans la branche γ comme le récepteur de l'apéline.

L'introduction de pE13F dans les trois modèles 3D de l'ApélineR a permis de visualiser plusieurs interactions, différentes suivant les modèles, entre les résidus basiques de l'apéline (Arg², Arg⁴ et Lys⁸) indispensables à la liaison de l'apéline (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003) et des résidus acides des boucles extracellulaires du récepteur (**Figure 35**).

Dans le modèle 3D de l'ApélineR fondé sur le modèle 3D du CCK1R, l'Arg² de pE13F interagit avec les résidus Asp-182 et Asp-280 de l'ApélineR ; l'Arg⁴ lie l'Asp-182 du récepteur et la Lys⁸ interagit avec les résidus Asp-92 et Asp-282.

Dans le modèle 3D de l'ApélineR fondé sur la structure cristallographique du récepteur β 2-adrénérique, l'Arg² et l'Arg⁴ de pE13F interagissent avec le même résidu, le Glu-90 de l'ApélineR.

Enfin, dans le modèle 3D de l'ApélineR fondé sur la structure cristallographique du récepteur CXCR4, l'Arg² de pE13F interagit avec le Glu-172 de l'ApélineR, l'Arg⁴ interagit avec l'Asp-282 et la Lys⁸ interagit avec l'Asp-92.

Afin de vérifier ces interactions, des mutations ponctuelles de tous les résidus identifiés ont été effectuées dans le récepteur de l'apéline par mutagenèse dirigée. Ces résidus ont été substitués par une Ala ou par un résidu plus conservatif, une Asn pour les résidus Asp et une Gln pour les résidus Glu. Les ADNcs de ces différents récepteurs mutés ont été transfectés en CHO et des lignées stables ont été établies.

Nous avons ensuite caractérisé l'effet de ces mutations sur les propriétés pharmacologiques de l'ApélineR que ce soit sur sa capacité à lier pE13F radiomarqué ainsi que sur la capacité de pE13F à induire l'inhibition de la production d'AMPc induite par la FSK ou à induire l'internalisation des ApélineR mutés.

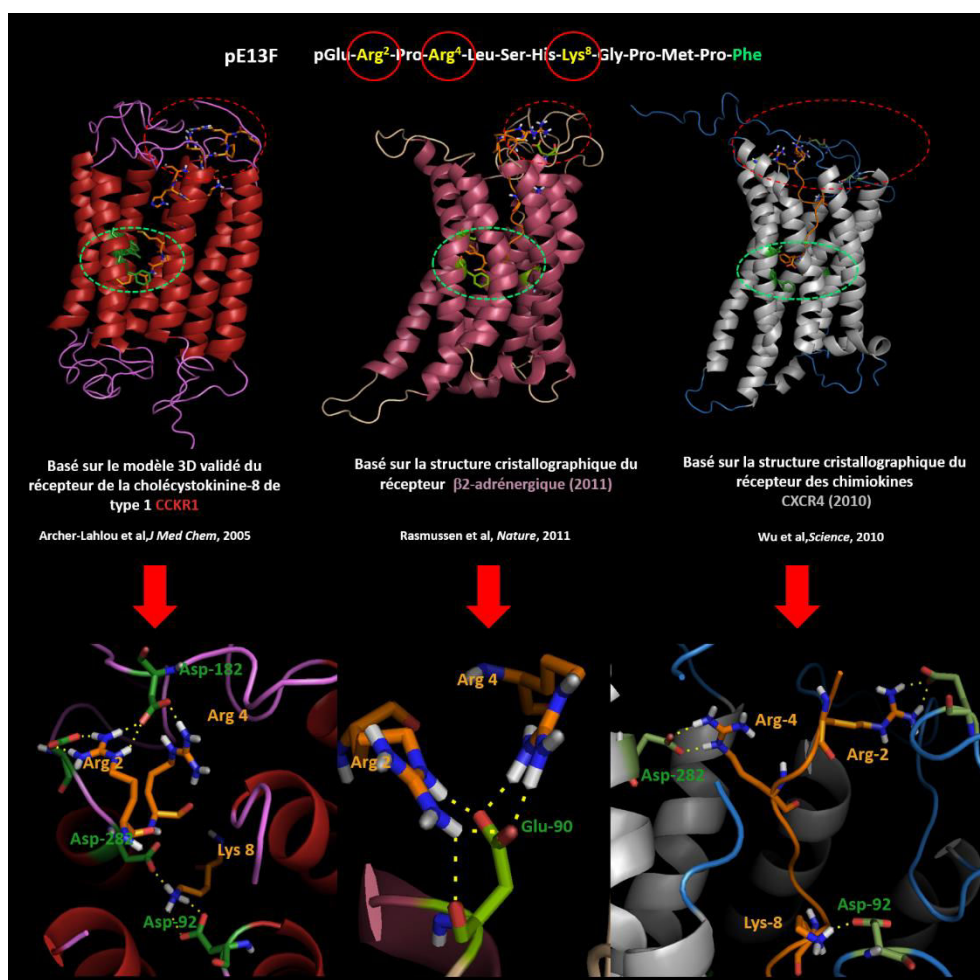


Figure 35 : Modèles tridimensionnels de l'ApélineR de rat construits par homologie de séquence protéiques et fondés sur la structure cristallographique ou sur le modèle tridimensionnel validé de différents RCPGs.

2) Discussion

Suite à l'introduction de pE13F dans chacun des trois modèles 3D de l'ApélineR, des interactions entre le peptide et le récepteur ont été observées. Ainsi, chaque résidu de l'ApelinR potentiellement impliqué dans la liaison du ligand a été substitué, par mutagenèse dirigée, soit par une Ala, soit par un résidu conservatif. Des lignées stables exprimant ces récepteurs mutés couplés à une protéine autofluorescente, eGFP, ont été établies afin de caractériser pharmacologiquement l'impact des mutations sur la capacité de pE13F à se lier à ces récepteurs ou à induire l'inhibition de la production d'AMPC induite par la FSK ainsi que l'internalisation des ApélineR mutés.

L'analyse par microscopie confocale à fluorescence de l'expression des ApelinR mutés a montré qu'aucune mutation n'impactait l'expression ni l'adressage à la membrane plasmique du récepteur. Nous avons montré que les ApelinR mutés D92A, E172A, D282A et D282N ne présentaient pas de liaison de pE13F radiomarqué jusqu'à 5 nM de radioligand suggérant que les résidus Asp-92, Glu-172 et Asp-282 sont impliqués dans la liaison de pE13F. De façon intéressante, nous avons montré que la substitution de l'Asp-92 et du Glu-172 par une Asn et une Gln, respectivement, aboutit à des récepteurs qui conservent leur capacité à lier pE13F, contrairement à la substitution de l'Asp-282 par une Ala. Ceci suggère que les résidus Asp-92 et Glu-172 établissent très certainement des liaisons hydrogènes avec l'apéline, alors que l'Asp-282 établit des liaisons électrostatiques avec l'apéline. Enfin les ApelinR mutés pour les résidus Glu-90, Asp-182 et Asp-280 présentent une liaison de pE13F radiomarquée similaire à celle de l'ApélineR sauvage, suggérant que ces résidus ne sont pas impliqués dans la liaison de pE13F au récepteur.

Nous nous sommes ensuite attachés à caractériser la capacité des récepteurs mutés à inhiber la production d'AMPC induite par la FSK. La stimulation par pE13F des récepteurs mutés mutants E90A, D92N, E172Q et D280A entraîne une inhibition de la production d'AMPC induite par la FSK indiquant que ces mutations n'affectent pas la capacité du récepteur de l'apéline à être couplé négativement à l'AC.

De plus, les récepteurs mutés D92A et E172A ne présentent pas d'inhibition de la production d'AMPC en accord avec les résultats des expériences de liaison. A l'inverse, les récepteurs mutés D282A et D282N qui ne présentaient pas de liaison jusqu'à 5 nM de pE13F radiomarqué, sont capables d'inhiber la production d'AMPC. Néanmoins, leurs capacités à inhiber la production d'AMPC sont fortement diminuées d'un facteur 208 et 1137 respectivement par rapport à l'ApélineR sauvage confirmant ainsi les résultats de liaison.

Enfin, nous avons vérifié si les différentes mutations du récepteur de l'apéline pouvaient affecter sa capacité à s'internaliser sous l'action de pE13F. Le traitement des différentes lignées de cellules CHO

exprimant de façon stable les récepteurs sauvage et mutés par une concentration supramaximale de pE13F montre que les mutants E90A, D92N, E172Q, D182A et D280A sont capables de s'internaliser sous l'action de pE13F comme le récepteur sauvage. A l'inverse, pE13F n'induit pas l'internalisation des mutants D92A, E172A, D282A et D282N. Les résultats d'internalisation viennent confirmer le rôle des résidus Asp-92, Glu-172 et Asp-282 dans la liaison de pE13F.

Nous avons donc démontré que les résidus Asp-92, Glu-172 et Asp-282 sont impliqués dans la liaison de pE13F à l'ApelinR. Ces résidus ont été observés uniquement dans le modèle 3D de l'ApélineR fondé sur la structure cristallographique du récepteur des chimiokines CXCR4. Ce résultat fait sens si l'on regarde l'arbre phylogénétique des récepteurs de la famille de la rhodopsine. En effet, l'ApélineR se trouve dans la même branche que le récepteur CXCR4 qui, de ce fait, se trouve être le patron le plus proche phylogénétiquement. Ce travail représente une seconde validation de ce modèle après celle concernant les résidus de la poche aromatique située au fond du site de liaison, accueillant la Phe C-terminale de l'apéline (Iturrioz et al., 2010b) (**Figure 36**). De la caractérisation pharmacologique de ces résidus et de la modélisation moléculaire, nous pouvons donc conclure que l'Asp-92 interagit avec la Lys⁸ et le Glu-172 interagit avec l'Arg² de pE13F via un pont salin entre leur groupement carboxylate et le groupement ammonium ou guanidinium de la Lys et de l'Arg de pE13F, respectivement. L'Asp-282 interagit, quant à lui, avec l'Arg⁴ de pE13F via une liaison électrostatique puisque la mutation conservative de ce résidu ne restaure pas la liaison de pE13F radiomarké. Les résidus Asp-92, Glu-172 et Asp-282 sont situés, respectivement, dans l'ECL1, l'ECL2 et à l'interface ECL3/TM7 de l'ApélineR ce qui confirme l'importance de ces domaines structuraux dans la reconnaissance et la liaison des peptides aux RCPGs (Howl and Wheatley, 1996; Shi and Javitch, 2004; Venkatakrisnan et al., 2013). La queue N-terminale de l'ApélineR étant absente dans notre modèle 3D, nous n'avons pas pu observer les interactions entre les résidus Glu-20 et Asp-23 de l'ApélineR avec pE13F. Or, ces résidus ont été montré comme jouant un rôle dans la liaison de pE13F (Zhou et al., 2003b). De façon intéressante, il a été montré par Résonance Magnétique Nucléaire et dynamique moléculaire que la queue N-terminale de l'ApelinR forme une ancre anionique interagissant avec les têtes lipidiques extracellulaires de la membrane plasmique et présentant ses résidus acides au milieu extracellulaire (Langelaan et al., 2013). Ainsi, pE13F pourrait interagir avec l'ApelinR via ses résidus basiques en deux temps, tout d'abord en étant capté par l'ancre anionique qui pourrait, une fois pE13F lié, changer de conformation et diriger le peptide vers le site de liaison où il interagirait fortement avec les résidus Asp-92, Glu-172 et Asp-282. Ceci est conforté par une étude ayant montré que la substitution de la Cys-284 de l'ApelinR rompt le pont disulfure entre le TM7 et la queue N-terminale et empêche la liaison de pE13F à l'ApélineR (Kumar et al., 2016). Or, la Cys-284 est située à deux acides aminés en aval de l'Asp-282 qui interagit avec l'Arg⁴ de pE13F. Donc la contrainte exercée par ce pont disulfure pourrait

permettre, une fois pE13F capté par la partie N-terminale, d'amener le peptide vers l'Asp-282 permettant sa liaison dans le site actif et l'activation de l'ApélineR.

Le modèle tridimensionnel de l'ApélineR fondé sur la structure cristallographique du récepteur CXCR4 pourra être utilisé pour effectuer des campagnes de criblage *in silico* de chimiothèques virtuelles. Ceci dans le but d'identifier des « touches » qui seront validées expérimentalement en étudiant leur capacité de liaison. Les meilleures touches seront ensuite évaluées sur leurs capacités à inhiber la production d'AMPC induite par la FSK, à recruter la β -arrestine par Bioluminescence Resonance Energy Transfert (BRET) et à induire l'internalisation du récepteur. Nous pourrions ainsi déterminer le caractère agoniste ou antagoniste des molécules sélectionnées et définir leurs profils pharmacologiques. Les molécules agonistes seront ensuite optimisées afin d'améliorer dans un premier temps leur affinité et dans un second temps leur biodisponibilité en vue de devenir des candidats médicaments pour le traitement des pathologies cardiovasculaires ou des désordres hyponatrémiques. Le modèle 3D du récepteur de l'apéline sera également utilisé pour optimiser les composés en orientant le développement de molécules et en définissant ainsi les bases moléculaires d'un pharmacophore d'agoniste ou d'antagoniste de l'ApélineR.

pE13F pGlu-Arg²-Pro-Arg⁴-Leu-Ser-His-Lys⁸-Gly-Pro-Met-Pro-Phe¹³

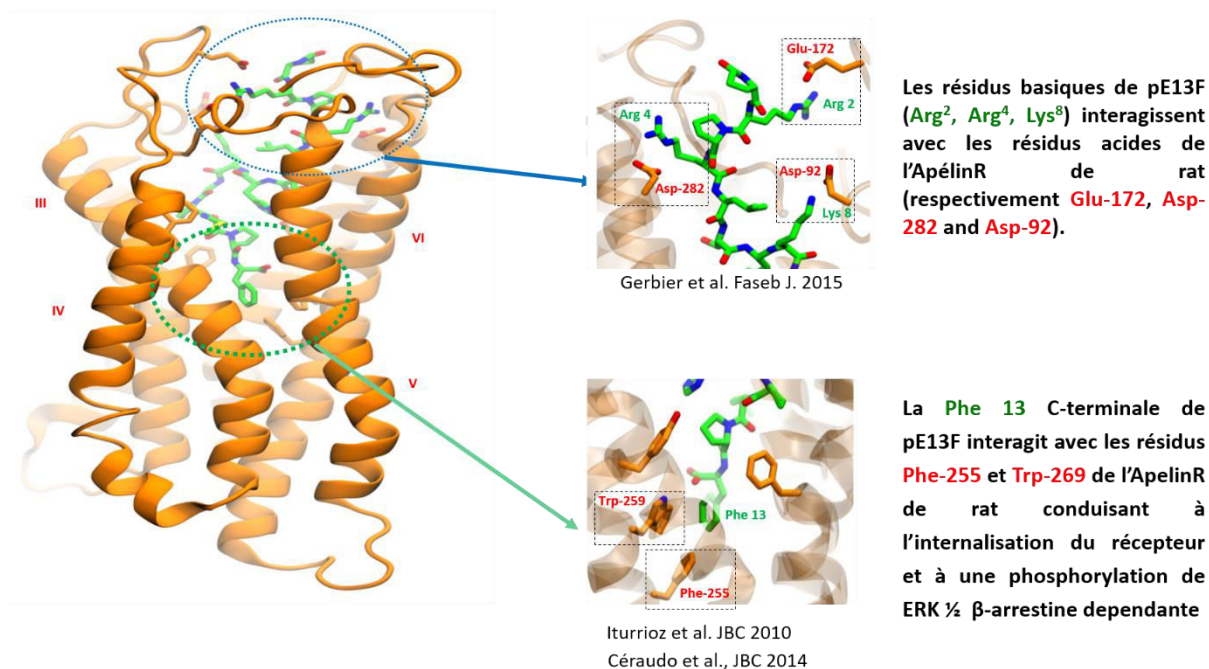


Figure 36 : Modèle tridimensionnel de l'ApélineR de rat fondé sur la structure cristallographique du récepteur aux chimiokines CXCR4 et validé par nos études structures-fonction (Iturrioz et al., 2010b; Gerbier et al., 2015).

V) Article 2 : Développement d'analogues de l'apéline métaboliquement stables

1) Introduction

L'ApelinR constitue une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des pathologies cardiovasculaires comme l'insuffisance cardiaque ou de l'hyponatrémie. Ainsi, le développement de molécules agonistes de l'ApelinR est essentiel pour traiter ces pathologies. Cependant, la demi-vie des différentes formes moléculaires d'apéline est très courte, de l'ordre de la minute, le but de nos travaux a été de développer des analogues de pE13F ou de K17F métaboliquement stables.

Du fait de sa plus grande affinité pour l'ApelinR et de sa plus grande capacité à induire l'internalisation du récepteur médiant l'effet hypotenseur, nous avons axé nos études sur la stabilisation du fragment K17F. Pour ce faire, deux stratégies de stabilisation du peptide ont été utilisées. Tout d'abord, par une approche classique, nous avons substitué chaque résidu de K17F et de pE13F par son énantiomère de la série D ou par un acide aminé synthétique. D'autre part, par une approche originale, nous avons ajouté à l'extrémité N-terminale de K17F une chaîne fluorocarbonée. Chaque peptide issu de ces deux approches a été caractérisé pour sa demi-vie plasmatique, puis pharmacologiquement sur sa capacité à se lier à l'ApelinR et à induire l'activation des voies de signalisation du récepteur (Inhibition de la production d'AMPc induite par la FSK, recrutement de la β -arrestine, internalisation de l'ApelinR et activation de la phosphorylation de ERK ½). Les meilleurs peptides ont été caractérisés *ex vivo* sur leur capacité à induire la vasorelaxation d'anneaux aortiques et d'artères glomérulaires de rat précontractées, respectivement, par la norépinephrine et l'Ang II et sur leur capacité à provoquer un effet inotrope positif sur des cœurs isolés perfusés de rat. Enfin, ces mêmes peptides ont été caractérisés *in vivo* sur leur capacité à inhiber la sécrétion d'AVP suite à leur injection par voie i.c.v chez la souris déshydratée, sur leur capacité à induire une baisse de la pression artérielle suite à leur injection par voie i.v chez le rat WKY normotendu anesthésié et enfin sur leur capacité à induire une diurèse suite à leur injection par voie i.v chez des rattes Sprague-Dawley anesthésiées.

2) Discussion

Les différentes formes moléculaires d'apéline ont des effets aquarétique, hypotenseur et inotrope positif, suggérant que l'ApélineR constitue une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des maladies cardiovasculaires et des rétentions hydriques. Cependant, la demi-vie de ces peptides *in vivo* est de l'ordre de la minute, ce qui limite leur utilisation. Ainsi, le développement d'analogues métaboliquement stables de l'apéline, à la fois spécifiques et sélectifs de l'ApelinR est essentiel pour explorer le rôle de l'apéline dans les pathologies précédemment citées et pour potentiellement traiter lesdites pathologies. Ainsi par deux approches, nous avons développé deux puissants analogues de K17F métaboliquement stables ayant un fort potentiel et un analogue métaboliquement stable de pE13F dont les effets *in vivo* sont moins convaincants.

Tout d'abord, par une approche de substitution systématique des résidus de pE13F et de K17F par leur énantiomère de la série D ou par un acide aminé synthétique, nous avons pu déterminer quels résidus de pE13F ou de K17F pouvaient être substitués afin d'augmenter la demi-vie du peptide sans modifier ses propriétés pharmacologiques. Puis, par une approche originale, nous avons ajouté à l'extrémité N-terminale de K17F une chaîne fluorocarbonée et caractérisé les peptides correspondants et sélectionné celui présentant la plus grande demi-vie plasmatique tout en conservant les propriétés pharmacologiques similaires à K17F.

Ainsi, par l'approche classique, un analogue de K17F, le P92 (H-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH), et un analogue de pE13F, le P26 (N-Acetyl-Arg-Pro-Arg-DLeu-Ser-Aib-Lys-DAla-ProNle-Pro(4-Br)Phe-OH), ont été développés. L'approche originale a permis de développer un analogue de K17F, le LIT01-196 (CF₃(CF₂)₇(CH₂)₂C(O)-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH) (**Tableau VI**). Ces trois peptides ont ensuite été caractérisés pharmacologiquement. L'analyse *in vitro* de la stabilité plasmatique de ces peptides montrent une forte augmentation de leur demi-vie par rapport à pE13F (7,2 min) et K17f (4,6 min) puisque le P26, le P92 et le LIT01-196 présentent, respectivement, une demi-vie plasmatique de 86, 24 et 1440 min. L'analyse des paramètres pharmacologiques de ces peptides montrent qu'ils présentent des caractéristiques similaires aux peptides endogènes. Néanmoins, comme pE13F, le P26 présente la plus faible efficacité à induire le recrutement de la β -arrestine à l'ApélineR, à induire l'internalisation du récepteur et à activer la phosphorylation de ERK ½. Les peptides issus de K17F étant les plus puissants, ils ont donc été étudiés *ex vivo* et *in vivo*.

Tout d'abord, nous avons étudié l'activité vasorelaxante du P92 et du LIT01-196 sur des anneaux aortiques de rat précontractés par la norépinephrine et sur des artéριοles glomérulaires de rat précontractées par l'Ang II. Nous avons montré que les deux analogues entraînaient, comme K17F, une

vasorelaxation dose-dépendante de ces deux préparations. De plus, il a été montré que l'infusion préalable d'un inhibiteur de la NO-synthase, le L-NAME, inhibait de façon significative l'effet vasorelaxant de ces peptides suggérant un mécanisme NO-dépendant, similaire à celui de K17F. Ensuite l'étude de l'effet de P92 sur la contractilité cardiaque a été effectuée sur des cœurs isolés perfusés de rat (modèle de Langendorff) et a montré qu'aucune des modifications introduites dans K17F ne modifiait l'effet inotrope positif de P92 par rapport à K17F.

Puis, ces composés ont été analysés *in vivo* et nous avons étudié si le P92 et le LIT01-196 exerçaient les mêmes effets que K17F sur le système vasopressinergique. Tout d'abord, il a été montré que l'injection par voie i.c.v de ces deux composés chez la souris déshydratée entraînait une diminution dose-dépendante de la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine et ce de façon 6 (pour le P92) à 160 fois (pour le LIT01-196) plus efficace que K17F. Ceci suggère qu'à l'instar de K17F, le P92 et le LIT01-196 atteignent les structures hypothalamiques impliquées dans la sécrétion d'AVP et qu'ils inhibent l'activité électrique phasique des neurones à AVP, empêchant de fait la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine. Egalement, il a été montré que le P92 et le LIT01-196, injectés par voie i.v chez la ratte anesthésiée, stimule la diurèse. Ajouté à l'effet de ces deux composés sur la vasorelaxation des artérioles glomérulaires, il suggère que le P92 et le LIT01-196 ont une action directe au niveau du rein où ils augmentent le flux sanguin rénal et stimulent la diurèse, effet diurétique important pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. De fait, ces deux molécules constituent des outils thérapeutiques potentiels pour le traitement des rétentions hydriques et des désordres hyponatrémiques.

Enfin, il a été montré que le P92 et le LIT01-196 entraînaient une diminution dose-dépendante de la pression artérielle suite à leur injection par voie i.v chez le rat normotendu anesthésié. Nous avons également montré que la baisse de pression artérielle et la durée de cet effet induit par chaque composé sont nettement supérieurs à ceux de K17F. De plus, le P92 et le LIT01-196 injectés par voie i.v chez la souris déshydratée diminuent la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine avec un effet 6 fois et 160 fois, respectivement, plus fort que celui de K17F. Injectés par voie i.v chez la ratte vigile, les deux composés augmentent la diurèse avec un effet nettement plus marqué que celui observé après injection de K17F. Par conséquent, ces deux molécules représentent des candidats potentiels pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Ils pourraient permettre d'améliorer la fonction cardiaque après l'infarctus du myocarde et permettraient de diminuer le stress ventriculaire et les besoins en oxygène du cœur comme il a été montré lors de l'injection aigüe de pE13F chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque (Barnes et al., 2013).

En conclusion, nous avons développé deux analogues de K17F métaboliquement stables. Ils présentent des propriétés pharmacologiques similaires au peptide endogène, néanmoins, leurs effets *in vivo* sont beaucoup plus puissants et plus durables que K17F ce qui en fait de bons candidats thérapeutiques.

Analogue	Publication
Analogues de l'apéline-13 et de pE13F	
Ac-E-R-P-R-(D)L-S-Aib-K-(D)A-P-Nle-P-4Br(F)	Gerbier et al., 2017
Analogues de K17F	
Ac-K-F-(D)R-R-(D)Q-R-P-R-(D)L-S-Aib-K-(D)A-P-Nle-P-4Br(F)	Gerbier et al., 2017
CF ₃ (CF ₂) ₇ (CH ₂) ₂ C(O)-K-F-R-R-Q-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	Gerbier et al., 2017

Tableau VI : Analogues de l'apéline métaboliquement stables issus de nos études structure-activité.

Conclusions et perspectives

Les trois formes moléculaires d'apéline endogènes sont issues de la maturation de la préproapéline. Ces trois neuropeptides sont constitués des 36 (apéline-36), 17 (K17F) et 13 (pE13F) derniers résidus C-terminaux de la préproapéline (Tatemoto et al., 1998; De Mota et al., 2000). Les alignements de séquence de la préproapéline ont montré une stricte conservation des 17 derniers résidus C-terminaux du précurseur. Ces trois neuropeptides lient avec une affinité similaire l'ApelinR et activent d'une part la protéine $G\alpha_i$ couplée au récepteur conduisant à l'inhibition de la production d'AMPC et d'autre part induisent l'internalisation de ce récepteur via le recrutement de la β -arrestine au récepteur (O'Dowd et al., 1993; Tatemoto et al., 1998; De Mota et al., 2000; El Messari et al., 2004; Masri et al., 2006). L'apéline se lie à l'ApélineR au moyen de ses résidus basiques situés dans les 13 derniers résidus C-terminaux du peptide (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003). La Phe C-terminale de K17F et de pE13F est impliquée dans le mécanisme d'internalisation du récepteur en interagissant avec les résidus Phe-255 et Trp-259 constituant une poche aromatique située au fond du site de liaison du peptide (El Messari et al., 2004; Iturrioz et al., 2010b; Ceraudo et al., 2014).

L'apéline et l'ApélineR possèdent plusieurs rôles physiologiques et sont notamment impliqués dans le maintien de l'équilibre hydrique et dans la régulation des fonctions cardiovasculaires. En effet, au niveau cérébral, l'apéline et l'AVP sont colocalisées dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques et l'apéline est capable d'inhiber l'activité électrique phasique de ces neurones pour empêcher la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine provoquant une augmentation de la diurèse aqueuse (Reaux et al., 2001; Reaux-Le Goazigo et al., 2004; De Mota et al., 2004). L'apéline présente une action directe au niveau du rein en augmentant le flux sanguin rénal et en inhibant les effets de l'AVP au niveau du canal collecteur (Hus-Citharel et al., 2008, 2014). L'apéline participe donc au maintien de l'équilibre hydrique en contrebalançant les effets antidiurétiques de l'AVP. Au niveau cardiovasculaire, l'apéline augmente la force contractile du myocarde par un effet inotrope positif tout en diminuant les résistances vasculaires (Szokodi et al., 2002; Chen et al., 2003; Berry et al., 2004). De plus, l'invalidation génique de la préproapéline chez la souris entraîne le développement d'une insuffisance cardiaque chez ces animaux avec l'âge suggérant un rôle protecteur de l'apéline dans le développement de cette pathologie (Kuba et al., 2007). Enfin, l'apéline, en induisant l'internalisation de l'ApélineR conduit à réduire la pression artérielle (El Messari et al., 2004; Brame et al., 2015; Murza et al., 2017). Ainsi, l'ApélineR représente une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des désordres hydriques ou de l'insuffisance cardiaque, justifiant du développement d'agonistes spécifiques et sélectifs de ce récepteur.

Afin de développer de tels composés, il était important de connaître le mode de liaison de l'apéline à son récepteur. En l'absence de structures cristallographiques de l'ApélineR, trois modèles

tridimensionnels de ce récepteur ont été construits par homologie avec soit, le modèle validé du récepteur de la cholécystokinine 8 de type 1, soit la structure cristallographique du récepteur β_2 -adrénergique, soit la structure du récepteur aux chimiokines CXCR4. L'introduction de pE13F dans chacun des trois modèles a permis d'observer différentes interactions possibles entre le peptide et l'ApélineR. En premier lieu, la Phe C-terminale de pE13F, nécessaire à l'internalisation de l'ApélineR et à son effet hypotenseur, s'insère dans une poche aromatique située au fond du site de liaison identique dans les trois modèles ce qui rend leur utilisation cohérente dans l'optique de découvrir le mode de liaison de l'apéline à l'ApélineR. En second lieu, les résidus basiques de pE13F (Arg², Arg⁴ et Lys⁸), jouant un rôle crucial dans la liaison du peptide, interagissent en surface du récepteur avec des résidus acides situés au niveau de ses boucles extracellulaires selon des modes de liaison différents entre les trois modèles. Par des études structure-fonction par mutagenèse dirigée, nous avons montré que les résidus Asp-92, Glu-172 et Asp-282, visualisés uniquement dans le modèle de l'ApélineR fondé sur la structure cristallographique du récepteur CXCR4, jouent un rôle fondamental dans la liaison de l'apéline à son récepteur. Ces résultats représentent une validation de ce modèle de l'ApélineR. Ce modèle sera utilisé pour étudier les mécanismes d'activation de l'ApélineR, pour réaliser des campagnes de criblage *in silico* de chimiothèques virtuelles, ainsi que pour développer un pharmacophore d'agoniste ou d'antagoniste spécifique et sélectif de l'ApélineR.

Toujours dans l'objectif de développer un agoniste de l'ApélineR à fort potentiel thérapeutique, nous avons entrepris d'augmenter la demi-vie de l'apéline, qui est de l'ordre de la minute *in vivo*, en développant des analogues de l'apéline métaboliquement stables. Pour ce faire, nous avons utilisé deux stratégies de développement. L'une classique, en substituant chacun des résidus de pE13F ou de K17F par son énantiomère de la série D ou par un acide aminé synthétique. L'autre originale, en ajoutant à l'extrémité N-terminale de K17F une chaîne fluorocarbonée. Nous avons caractérisé pharmacologiquement chacun des analogues sur leur capacité à se lier à l'ApélineR, à induire l'inhibition de la production d'AMPC induite par la FSK, à induire le recrutement de la β -arrestine à l'ApélineR et à induire l'internalisation du récepteur. Les analogues P92, issu de la stratégie classique et analogue de K17F, et LIT01-196, issu de la stratégie originale, sont les composés les plus puissants (affinité subnanomolaire) agonistes complets de l'ApélineR, qui ont ensuite été caractérisés *ex vivo* et *in vivo*. La stabilité de ces deux analogues a été considérablement accrue par rapport à K17F, 24 min pour le P92 et plus de 1440 min pour le LIT01-196, qui de plus se comportent comme de puissants hypotenseurs à effet durable, capables comme K17F, d'exercer un effet inotrope positif, d'augmenter le flux sanguin rénal, inhiber la sécrétion d'AVP dans le sang et augmenter la diurèse. Ainsi ces deux analogues de K17F représentent de bons candidats pour le traitement de pathologies comme l'insuffisance cardiaque ou l'hyponatrémie. Ainsi, l'étude de des effets de ces composés dans des

modèles animaux d'insuffisance cardiaque ou d'hyponatrémie constituerait, s'ils sont concluants, en une preuve de concept de l'utilité de ces composés d'une part, et d'autre part démontrerait le potentiel thérapeutique de l'ApélineR et l'importance de développer des agonistes de ce récepteur. Enfin, la démonstration de l'augmentation de la demi-vie de K17F par l'ajout d'une chaîne fluorocarbonée en position N-terminale de l'apéline pourrait être étendue à d'autres peptides en vue de les protéger de la dégradation enzymatique.

Annexe: Revue “Role of the vasopressin/apelin balance and potential use of metabolically stable apelin analogs in water metabolism disorders” (En revision)

Bibliographie

Abhold, R.H., Sullivan, M.J., Wright, J.W., Harding, J.W., 1987. Binding, degradation and pressor activity of angiotensins II and III after aminopeptidase inhibition with amastatin and bestatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242, 957–962.

Ahmad, S., Varagic, J., Groban, L., Dell'Italia, L.J., Nagata, S., Kon, N.D., Ferrario, C.M., 2014. Angiotensin-(1-12): a chymase-mediated cellular angiotensin II substrate. *Curr. Hypertens. Rep.* 16, 429. doi:10.1007/s11906-014-0429-9

Ahmad, S., Ward, P.E., 1990. Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 643–650.

Albiston, A.L., McDowall, S.G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F.A., Simpson, R.J., Connolly, L.M., Chai, S.Y., 2001. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 276, 48623–48626. doi:10.1074/jbc.C100512200

Allen, A.M., Chai, S.Y., Clevers, J., McKinley, M.J., Paxinos, G., Mendelsohn, F.A., 1988. Localization and characterization of angiotensin II receptor binding and angiotensin converting enzyme in the human medulla oblongata. *J. Comp. Neurol.* 269, 249–264. doi:10.1002/cne.902690209

Allen, A.M., MacGregor, D.P., Chai, S.Y., Donnan, G.A., Kaczmarczyk, S., Richardson, K., Kalnins, R., Ireton, J., Mendelsohn, F.A., 1992. Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Ann. Neurol.* 32, 339–344. doi:10.1002/ana.410320306

Allen, A.M., Zhuo, J., Mendelsohn, F.A., 2000. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am. J. Hypertens.* 13, 31S–38S.

Alliot, F., Rutin, J., Leenen, P.J., Pessac, B., 1999a. Brain parenchyma vessels and the angiotensin system. *Brain Res.* 830, 101–112.

Alliot, F., Rutin, J., Leenen, P.J., Pessac, B., 1999b. Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. *J. Neurosci. Res.* 58, 367–378.

Aoyagi, T., Nagai, M., Iwabuchi, M., Liaw, W.S., Andoh, T., Umezawa, H., 1978a. Aminopeptidase activities on the surface of mammalian cells and their alterations associated with transformation. *Cancer Res.* 38, 3505–3508.

Aoyagi, T., Tobe, H., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T., Umezawa, H., 1978b. Amastatin, an inhibitor of aminopeptidase A, produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* 31, 636–638.

Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Harada, S., Hachisu, M., Murata, S., Umezawa, H., 1986. Inhibitors of aminopeptidase B suppress the development of hypertension in

spontaneously hypertensive rats. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 4852–4854.

Aoyagi, T., Yoshida, S., Nakamura, Y., Shigihara, Y., Hamada, M., Takeuchi, T., 1990. Probestin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Streptomyces azureus* MH663-2F6. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.* 43, 143–148.

Archer-Lahlou, E., Tikhonova, I., Escrieut, C., Dufresne, M., Seva, C., Pradayrol, L., Moroder, L., Maigret, B., Fourmy, D., 2005. Modeled structure of a G-protein-coupled receptor: the cholecystokinin-1 receptor. *J. Med. Chem.* 48, 180–191. doi:10.1021/jm049886y

Arnold, A.C., Isa, K., Shaltout, H.A., Nautiyal, M., Ferrario, C.M., Chappell, M.C., Diz, D.I., 2010. Angiotensin-(1-12) requires angiotensin converting enzyme and AT1 receptors for cardiovascular actions within the solitary tract nucleus. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299, H763-771. doi:10.1152/ajpheart.00345.2010

Ashley, E.A., Powers, J., Chen, M., Kundu, R., Finsterbach, T., Caffarelli, A., Deng, A., Eichhorn, J., Mahajan, R., Agrawal, R., Greve, J., Robbins, R., Patterson, A.J., Bernstein, D., Quertermous, T., 2005. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc. Res.* 65, 73–82. doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.018

Assmann, K.J., van Son, J.P., Dijkman, H.B., Koene, R.A., 1992. A nephritogenic rat monoclonal antibody to mouse aminopeptidase A. Induction of massive albuminuria after a single intravenous injection. *J. Exp. Med.* 175, 623–635.

Azizi, M., Iturrioz, X., Blanchard, A., Peyrard, S., De Mota, N., Chartrel, N., Vaudry, H., Corvol, P., Llorens-Cortes, C., 2008. Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. - PubMed - NCBI. *Journal of American Society of Nephrology.* doi:10.1681/ASN.2007070816

Azzi, M., Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., Piñeyro, G., 2003. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11406–11411. doi:10.1073/pnas.1936664100

Bai, B., Liu, L., Zhang, N., Wang, C., Jiang, Y., Chen, J., 2014. Heterodimerization of human apelin and bradykinin 1 receptors: novel signal transduction characteristics. *Cell. Signal.* 26, 1549–1559. doi:10.1016/j.cellsig.2014.03.022

Bai, B., Tang, J., Liu, H., Chen, J., Li, Y., Song, W., 2008. Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the Gi2 pathway. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 40, 311–318.

Baker, J.G., Hall, I.P., Hill, S.J., 2003. Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol. Pharmacol.* 64, 1357–1369. doi:10.1124/mol.64.6.1357

Balanescu, S., Kopp, P., Gaskill, M.B., Morgenthaler, N.G., Schindler, C., Rutishauser, J., 2011. Correlation of plasma copeptin and vasopressin concentrations in hypo-, iso-, and

hyperosmolar States. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 1046–1052. doi:10.1210/jc.2010-2499

Balavoine, F., Azizi, M., Bergerot, D., De Mota, N., Patouret, R., Roques, B.P., Llorens-Cortes, C., 2014. Randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating phase I study of QGC001, a centrally acting aminopeptidase a inhibitor prodrug. *Clin Pharmacokinet* 53, 385–395. doi:10.1007/s40262-013-0125-y

Ballesteros, J., Weinstein, H., 1995. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors, in: *Receptor Molecular Biology, Methods in Neurosciences*. pp. 366–428.

Bally, M., Murgier, M., Lazdunski, A., 1984. Cloning and orientation of the gene encoding aminopeptidase N in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 195, 507–510.

Balogh, A., Cadel, S., Foulon, T., Picart, R., Der Garabedian, A., Rousselet, A., Tougard, C., Cohen, P., 1998. Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Cell. Sci.* 111 (Pt 2), 161–169.

Barnes, G.D., Alam, S., Carter, G., Pedersen, C.M., Lee, K.M., Hubbard, T.J., Veitch, S., Jeong, H., White, A., Cruden, N.L., Huson, L., Japp, A.G., Newby, D.E., 2013. Sustained cardiovascular actions of APJ agonism during renin-angiotensin system activation and in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 6, 482–491. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.000077

Bartlett, P.A., Marlowe, C.K., 1987. Possible role for water dissociation in the slow binding of phosphorus-containing transition-state-analogue inhibitors of thermolysin. *Biochemistry* 26, 8553–8561.

Basso, N., Ruiz, P., Mangiarua, E., Taquini, A.C., 1981. Renin-like activity in the rat brain during the development of DOC-salt hypertension. *Hypertension* 3, 11-14-17.

Bathon, J.M., Proud, D., Mizutani, S., Ward, P.E., 1992. Cultured human synovial fibroblasts rapidly metabolize kinins and neuropeptides. *J. Clin. Invest.* 90, 981–991. doi:10.1172/JCI115975

Batt, C.M., Klein, E.W., Harding, J.W., Wright, J.W., 1988. Pressor responses to amastatin, bestatin and Plummer's inhibitors are suppressed by pretreatment with the angiotensin receptor antagonist sarthran. *Brain Res. Bull.* 21, 731–735.

Baumann, U., 1994. Crystal structure of the 50 kDa metallo protease from *Serratia marcescens*. *J. Mol. Biol.* 242, 244–251. doi:10.1006/jmbi.1994.1576

Bausback, H.H., Churchill, L., Ward, P.E., 1988. Angiotensin metabolism by cerebral microvascular aminopeptidase A. *Biochem. Pharmacol.* 37, 155–160.

Bausback, H.H., Ward, P.E., 1986. Degradation of low-molecular-weight opioid peptides by vascular plasma membrane aminopeptidase M. *Biochim. Biophys. Acta* 882, 437–444.

Beaumont, A., O'Donohue, M.J., Paredes, N., Rousselet, N., Assicot, M., Bohuon, C., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 1995. The role of histidine 231 in thermolysin-like enzymes. A site-directed mutagenesis study. *J. Biol. Chem.* 270, 16803–16808.

Belhacene, N., Mari, B., Rossi, B., Auberger, P., 1993. Characterization and purification of T lymphocyte aminopeptidase B: a putative marker of T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 23, 1948–1955. doi:10.1002/eji.1830230833

Benajiba, A., Maroux, S., 1980. Purification and characterization of an aminopeptidase A from hog intestinal brush-border membrane. *Eur. J. Biochem.* 107, 381–388.

Benovic, J.L., Kühn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1987. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8879–8882.

Benovic, J.L., Pike, L.J., Cerione, R.A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1985. Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 260, 7094–7101.

Berry, M.F., Pirololi, T.J., Jayasankar, V., Burdick, J., Morine, K.J., Gardner, T.J., Woo, Y.J., 2004. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 110, II187-193. doi:10.1161/01.CIR.0000138382.57325.5c

Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198–205. doi:10.1038/415198a

Bhagwat, S.V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., Shapiro, L.H., 2001. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97, 652–659.

Binkley, F., Alexander, V., Bell, F.E., Lea, C., 1957. Peptidases and alkaline phosphatases of swine kidney. *J. Biol. Chem.* 228, 559–567.

Blanchard, A., Steichen, O., De Mota, N., Curis, E., Gauci, C., Frank, M., Wuerzner, G., Kamenicky, P., Passeron, A., Azizi, M., Llorens-Cortes, C., 2013. An abnormal apelin/vasopressin balance may contribute to water retention in patients with the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone (SIADH) and heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 2084–2089. doi:10.1210/jc.2012-3794

Blundell, T.L., 1994. Metalloproteinase superfamilies and drug design. *Nat. Struct. Biol.* 1, 73–75.

Bode, W., Gomis-Rüth, F.X., Stöckler, W., 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” *FEBS Lett.* 331, 134–140.

Bodineau, L., Frugière, A., Marc, Y., Inguibert, N., Fassot, C., Balavoine, F., Roques, B., Llorens-Cortes, C., 2008. Orally active aminopeptidase A inhibitors reduce blood pressure: a new strategy for treating hypertension. *Hypertension* 51, 1318–1325.

doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.098772

Bodineau, L., Hus-Citharel, A., Llorens-Cortes, C., 2010. [Contribution of apelin to water balance, blood glucose control, and cardiovascular functions]. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 71, 249–256. doi:10.1016/j.ando.2010.03.004

Bodineau, L., Taveau, C., Lê Quan Sang, H.-H., Osterstock, G., Queguiner, I., Moos, F., Frugière, A., Llorens-Cortes, C., 2011. Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. *Endocrinology* 152, 3492–3503. doi:10.1210/en.2011-0206

Bogdanović, X., Palm, G.J., Schwenteit, J., Singh, R.K., Gudmundsdóttir, B.K., Hinrichs, W., 2016. Structural evidence of intramolecular propeptide inhibition of the aspzincin metalloendopeptidase AsaP1. *FEBS Lett.* 590, 3280–3294. doi:10.1002/1873-3468.12356

Bogenrieder, T., Finstad, C.L., Freeman, R.H., Papandreou, C.N., Scher, H.I., Albino, A.P., Reuter, V.E., Nanus, D.M., 1997. Expression and localization of aminopeptidase A, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV in benign and malignant human prostate tissue. *Prostate* 33, 225–232.

Bornancin, F., Pfister, C., Chabre, M., 1989. The transitory complex between photoexcited rhodopsin and transducin. Reciprocal interaction between the retinal site in rhodopsin and the nucleotide site in transducin. *Eur. J. Biochem.* 184, 687–698.

Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigné, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpéné, C., Audigier, Y., Saulnier-Blache, J.-S., Valet, P., 2005. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146, 1764–1771. doi:10.1210/en.2004-1427

Bouhnik, J., Clauser, E., Strosberg, D., Frenoy, J.P., Menard, J., Corvol, P., 1981. Rat angiotensinogen and des(angiotensin I)angiotensinogen: purification, characterization, and partial sequencing. *Biochemistry* 20, 7010–7015.

Bourne, A., Barnes, K., Taylor, B.A., Turner, A.J., Kenny, A.J., 1989. Membrane peptidases in the pig choroid plexus and on other cell surfaces in contact with the cerebrospinal fluid. *Biochem. J.* 259, 69–80.

Bouvier, M., Hausdorff, W.P., De Blasi, A., O'Dowd, B.F., Kobilka, B.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1988. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333, 370–373. doi:10.1038/333370a0

Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L.M., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1987. Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. II. Effects of agonist occupancy on phosphorylation of alpha 1- and beta 2-adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 262, 3106–3113.

Brailoiu, G.C., Dun, S.L., Yang, J., Ohsawa, M., Chang, J.K., Dun, N.J., 2002. Apelin-immunoreactivity in the rat hypothalamus and pituitary. *Neurosci. Lett.* 327, 193–197.

Brame, A.L., Maguire, J.J., Yang, P., Dyson, A., Torella, R., Cheriyan, J., Singer, M., Glen, R.C., Wilkinson, I.B., Davenport, A.P., 2015. Design, characterization, and first-in-human study of the vascular actions of a novel biased apelin receptor agonist. *Hypertension* 65, 834–840. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05099

Brown, C.K., Madauss, K., Lian, W., Beck, M.R., Tolbert, W.D., Rodgers, D.W., 2001. Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3127–3132. doi:10.1073/pnas.051633198

Brown, J.H., Goldstein, D., 1986. Differences in muscarinic receptor reserve for inhibition of adenylate cyclase and stimulation of phosphoinositide hydrolysis in chick heart cells. *Mol. Pharmacol.* 30, 566–570.

Brownstein, M.J., Russell, J.T., Gainer, H., 1980. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207, 373–378.

Buggy, J., Fink, G.D., Johnson, A.K., Brody, M.J., 1977. Prevention of the development of renal hypertension by anteroventral third ventricular tissue lesions. *Circ. Res.* 40, 1110–117.

Bunnemann, B., Fuxe, K., Metzger, R., Bjelke, B., Ganten, D., 1992. The semi-quantitative distribution and cellular localization of angiotensinogen mRNA in the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* 5, 245–262.

Burch, R.M., Luini, A., Axelrod, J., 1986. Phospholipase A2 and phospholipase C are activated by distinct GTP-binding proteins in response to alpha 1-adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 7201–7205.

Cadel, S., Darmon, C., Pernier, J., Hervé, G., Foulon, T., 2015. The M1 family of vertebrate aminopeptidases: role of evolutionarily conserved tyrosines in the enzymatic mechanism of aminopeptidase B. *Biochimie* 109, 67–77. doi:10.1016/j.biochi.2014.12.009

Cadel, S., Foulon, T., Viron, A., Balogh, A., Midol-Monnet, S., Noël, N., Cohen, P., 1997. Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2963–2968.

Cadel, S., Pierotti, A.R., Foulon, T., Créminon, C., Barré, N., Segrétain, D., Cohen, P., 1995. Aminopeptidase-B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules. *Mol. Cell. Endocrinol.* 110, 149–160.

Cahill, T.J., Thomsen, A.R.B., Tarrasch, J.T., Plouffe, B., Nguyen, A.H., Yang, F., Huang, L.-Y., Kahsai, A.W., Bassoni, D.L., Gavino, B.J., Lamerdin, J.E., Triest, S., Shukla, A.K., Berger, B., Little, J., Antar, A., Blanc, A., Qu, C.-X., Chen, X., Kawakami, K., Inoue, A., Aoki, J., Steyaert, J., Sun, J.-P., Bouvier, M., Skiniotis, G., Lefkowitz, R.J., 2017. Distinct conformations of GPCR- β -arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 2562–2567. doi:10.1073/pnas.1701529114

Cai, X., Bai, B., Zhang, R., Wang, C., Chen, J., 2017. Apelin receptor homodimer-oligomers revealed by single-molecule imaging and novel G protein-dependent signaling. *Sci Rep* 7, 40335. doi:10.1038/srep40335

Castan-Laurell, I., Dray, C., Attané, C., Duparc, T., Knauf, C., Valet, P., 2011. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 40, 1–9. doi:10.1007/s12020-011-9507-9

Castro, M.G., Birch, N.P., Loh, Y.P., 1989. Regulated secretion of pro-opiomelanocortin converting enzyme and an aminopeptidase B-like enzyme from dispersed bovine intermediate lobe pituitary cells. *J. Neurochem.* 52, 1619–1628.

Célérier, J., Cruz, A., Lamandé, N., Gasc, J.-M., Corvol, P., 2002. Angiotensinogen and its cleaved derivatives inhibit angiogenesis. *Hypertension* 39, 224–228.

Ceraudo, E., Galanth, C., Carpentier, E., Banegas-Font, I., Schonegge, A.-M., Alvear-Perez, R., Iturrioz, X., Bouvier, M., Llorens-Cortes, C., 2014. Biased signaling favoring g_i over β -arrestin promoted by an apelin fragment lacking the C-terminal phenylalanine. *J. Biol. Chem.* 289, 24599–24610. doi:10.1074/jbc.M113.541698

Chai, S.Y., Zhuo, J., Mendelsohn, F.A., 1993. Localization of components of the renin-angiotensin system and site of action of inhibitors. *Arzneimittelforschung* 43, 214–221.

Chansel, D., Czekalski, S., Vandermeersch, S., Ruffet, E., Fournié-Zaluski, M.C., Ardaillou, R., 1998. Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 275, F535–542.

Chauvel, E.N., Coric, P., Llorens-Cortès, C., Wilk, S., Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.C., 1994a. Investigation of the active site of aminopeptidase A using a series of new thiol-containing inhibitors. *J. Med. Chem.* 37, 1339–1346.

Chauvel, E.N., Llorens-Cortès, C., Coric, P., Wilk, S., Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.C., 1994b. Differential inhibition of aminopeptidase A and aminopeptidase N by new beta-amino thiols. *J. Med. Chem.* 37, 2950–2957.

Chen, L., Lin, Y.-L., Peng, G., Li, F., 2012. Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17966–17971. doi:10.1073/pnas.1210123109

Chen, M.M., Ashley, E.A., Deng, D.X.F., Tsalenko, A., Deng, A., Tabibiazar, R., Ben-Dor, A., Fenster, B., Yang, E., King, J.Y., Fowler, M., Robbins, R., Johnson, F.L., Bruhn, L., McDonagh, T., Dargie, H., Yakhini, Z., Tsao, P.S., Quertermous, T., 2003. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* 108, 1432–1439. doi:10.1161/01.CIR.0000091235.94914.75

Chen, W.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 3116–3123.

Chen, X., Bai, B., Tian, Y., Du, H., Chen, J., 2014. Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling. *J. Biol. Chem.* 289, 31173–31187. doi:10.1074/jbc.M114.574020

Cheng, X., Cheng, X.S., Pang, C.C.Y., 2003. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* 470, 171–175.

Chin, M.H., Goldman, L., 1996. Correlates of major complications or death in patients admitted to the hospital with congestive heart failure. *Arch. Intern. Med.* 156, 1814–1820.

Chitravanshi, V.C., Proddutur, A., Sapru, H.N., 2012. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-12) in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat are mediated via angiotensin II. *Exp. Physiol.* 97, 1001–1017. doi:10.1113/expphysiol.2011.062471

Chitravanshi, V.C., Sapru, H.N., 2011. Cardiovascular responses elicited by a new endogenous angiotensin in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H230-240. doi:10.1152/ajpheart.00861.2010

Choe, W., Albright, A., Sulcove, J., Jaffer, S., Hesselgesser, J., Lavi, E., Crino, P., Kolson, D.L., 2000. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J. Neurovirol.* 6 Suppl 1, S61-69.

Chong, K.S., Gardner, R.S., Morton, J.J., Ashley, E.A., McDonagh, T.A., 2006. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 8, 355–360. doi:10.1016/j.ejheart.2005.10.007

Christ-Crain, M., Fenske, W., 2016. Copeptin in the diagnosis of vasopressin-dependent disorders of fluid homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 12, 168–176. doi:10.1038/nrendo.2015.224

Christianson, D.W., Alexander, R.S., 1990. Another catalytic triad? *Nature* 346, 225. doi:10.1038/346225b0

Christopoulos, A., Kenakin, T., 2002. G protein-coupled receptor allostery and complexing. *Pharmacol. Rev.* 54, 323–374.

Chun, H.J., Ali, Z.A., Kojima, Y., Kundu, R.K., Sheikh, A.Y., Agrawal, R., Zheng, L., Leeper, N.J., Pearl, N.E., Patterson, A.J., Anderson, J.P., Tsao, P.S., Lenardo, M.J., Ashley, E.A., Quertermous, T., 2008. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 118, 3343–3354. doi:10.1172/JCI34871

Chung, A., Ryan, J.W., Berryer, P., 1983. Inhibition of the formation of angiotensin III. *Adv. Exp. Med. Biol.* 156, 693–701.

Churchill, L., Bausback, H.H., Gerritsen, M.E., Ward, P.E., 1987. Metabolism of opioid peptides by cerebral microvascular aminopeptidase M. *Biochim. Biophys. Acta* 923, 35–41.

Cirilli, M., Gallina, C., Gavuzzo, E., Giordano, C., Gomis-Rüth, F.X., Gorini, B., Kress, L.F., Mazza, F., Paradisi, M.P., Pochetti, G., Politi, V., 1997. 2 angstrom X-ray structure of adamalysin II complexed with a peptide phosphonate inhibitor adopting a retro-binding mode. *FEBS Lett.* 418, 319–322.

Claperon, C., Banegas-Font, I., Iturrioz, X., Rozenfeld, R., Maigret, B., Llorens-Cortes, C., 2009. Identification of threonine 348 as a residue involved in aminopeptidase A substrate specificity.

J. Biol. Chem. 284, 10618–10626. doi:10.1074/jbc.M806783200

Claperon, C., Rozenfeld, R., Iturrioz, X., Inguibert, N., Okada, M., Roques, B., Maigret, B., Llorens-Cortes, C., 2008. Asp218 participates with Asp213 to bind a Ca²⁺ atom into the S1 subsite of aminopeptidase A: a key element for substrate specificity. *Biochem. J.* 416, 37–46. doi:10.1042/BJ20080471

Cockcroft, S., Gomperts, B.D., 1985. Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* 314, 534–536.

Cohen, P., 1987. Proteolytic events in the post-translational processing of polypeptide hormone precursors. *Biochimie* 69, 87–89.

Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G., Sprang, S.R., 1994. Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* 265, 1405–1412.

Colman, P.M., Jansonius, J.N., Matthews, B.W., 1972. The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 70, 701–724.

Congreve, M., Langmead, C.J., Mason, J.S., Marshall, F.H., 2011. Progress in structure based drug design for G protein-coupled receptors. *J. Med. Chem.* 54, 4283–4311. doi:10.1021/jm200371q

Cook, V.I., Wright, J.W., Wright, S.A., Harding, J.W., 1990. Comparison of angiotensin metabolism by brain membranes from SHR and WKY rats. *Brain Res.* 529, 320–323.

Cooper, M.D., Mulvaney, D., Coutinho, A., Cazenave, P.A., 1986. A novel cell surface molecule on early B-lineage cells. *Nature* 321, 616–618. doi:10.1038/321616a0

Costa-Neto, C.M., Parreiras-E-Silva, L.T., Bouvier, M., 2016. A Pluridimensional View of Biased Agonism. *Mol. Pharmacol.* 90, 587–595. doi:10.1124/mol.116.105940

Dai, L., Smith, P.M., Kuksis, M., Ferguson, A.V., 2013. Apelin acts in the subfornical organ to influence neuronal excitability and cardiovascular function. *J. Physiol. (Lond.)* 591, 3421–3432. doi:10.1113/jphysiol.2013.254144

Dai, T., Ramirez-Correa, G., Gao, W.D., 2006. Apelin increases contractility in failing cardiac muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 553, 222–228. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.034

Dalal, S., Ragheb, D.R.T., Schubot, F.D., Klemba, M., 2013. A naturally variable residue in the S1 subsite of M1 family aminopeptidases modulates catalytic properties and promotes functional specialization. *J. Biol. Chem.* 288, 26004–26012. doi:10.1074/jbc.M113.465625

D’Aniello, C., Lonardo, E., Iaconis, S., Guardiola, O., Liguoro, A.M., Liguori, G.L., Autiero, M., Carmeliet, P., Minchiotti, G., 2009. G protein-coupled receptor APJ and its ligand apelin act downstream of Cripto to specify embryonic stem cells toward the cardiac lineage through extracellular signal-regulated kinase/p70S6 kinase signaling pathway. *Circ. Res.* 105, 231–238. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201186

- Danielsen, E.M., Norén, O., Sjöström, H., Ingram, J., Kenny, A.J., 1980. Proteins of the kidney microvillar membrane. Aspartate aminopeptidase: purification by immunoadsorbent chromatography and properties of the detergent- and proteinase-solubilized forms. *Biochem. J.* 189, 591–603.
- David, C., Bischoff, L., Meudal, H., Llorens-Cortes, C., Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.-C., 1997. Characterization and inhibition of aminopeptidase A by α -mercapto- β -amino acyl dipeptides. *Letters in Peptide Science* 4, 411–414. doi:10.1023/A:1008894115205
- David, C., Bischoff, L., Meudal, H., Mothé, A., De Mota, N., DaNascimento, S., Llorens-Cortes, C., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 1999. Investigation of subsite preferences in aminopeptidase A (EC 3.4.11.7) led to the design of the first highly potent and selective inhibitors of this enzyme. *J. Med. Chem.* 42, 5197–5211.
- De Falco, M., De Luca, L., Onori, N., Cavallotti, I., Artigiano, F., Esposito, V., De Luca, B., Laforgia, V., Groeger, A.M., De Luca, A., 2002. Apelin expression in normal human tissues. *In Vivo* 16, 333–336.
- de Graaf, C., Nijmeijer, S., Wolf, S., Ernst, O.P., 2016. 7TM Domain Structure of Adhesion GPCRs. *Handb Exp Pharmacol* 234, 43–66. doi:10.1007/978-3-319-41523-9_3
- de Mota, N., Iturrioz, X., Claperon, C., Bodineau, L., Fassot, C., Roques, B.P., Palkovits, M., Llorens-Cortes, C., 2008. Human brain aminopeptidase A: biochemical properties and distribution in brain nuclei. *J. Neurochem.* 106, 416–428. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05402.x
- De Mota, N., Lenkei, Z., Llorens-Cortès, C., 2000. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 72, 400–407. doi:54609
- De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., Kordon, C., Vaudry, H., Moos, F., Llorens-Cortes, C., 2004. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. - PubMed - NCBI. *PNAS*. doi:10.1073/pnas.0403518101
- Degtyarev, M.Y., Spiegel, A.M., Jones, T.L., 1994. Palmitoylation of a G protein alpha i subunit requires membrane localization not myristoylation. *J. Biol. Chem.* 269, 30898–30903.
- Del Vecchio, P.J., Ryan, J.W., Chung, A., Ryan, U.S., 1980. Capillaries of the adrenal cortex possess aminopeptidase A and angiotensin-converting-enzyme activities. *Biochem. J.* 186, 605–608.
- Deschepper, C.F., Bouhnik, J., Ganong, W.F., 1986. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Res.* 374, 195–198.
- Devault, A., Lazure, C., Nault, C., Le Moual, H., Seidah, N.G., Chrétien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A., 1987. Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J.* 6, 1317–1322.
- Devic, E., Paquereau, L., Vernier, P., Knibiehler, B., Audigier, Y., 1996. Expression of a new G

protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 59, 129–140.

Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Knibiehler, B., Audigier, Y., 1999. Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of *Xenopus* X-msr and human APJ. *Mech. Dev.* 84, 199–203.

Dewey, A.L., Wright, J.W., Hanesworth, J.M., Harding, J.W., 1988. Effects of aminopeptidase inhibition on the half-lives of [125I]angiotensins in the cerebroventricles of the rat. *Brain Res.* 448, 369–372.

Dewey, V.C., Kidder, G.W., 1964. INHIBITION BY PUROMYCIN AND ITS REVERSAL BY PEPTIDES. *Biochem. Pharmacol.* 13, 353–360.

Dive, V., Lucet-Levannier, K., Georgiadis, D., Cotton, J., Vassiliou, S., Cuniasse, P., Yiotakis, A., 2000. Phosphinic peptide inhibitors as tools in the study of the function of zinc metallopeptidases. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 455–460.

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. *Circ. Res.* 87, E1-9.

Doré, A.S., Okrasa, K., Patel, J.C., Serrano-Vega, M., Bennett, K., Cooke, R.M., Errey, J.C., Jazayeri, A., Khan, S., Tehan, B., Weir, M., Wiggin, G.R., Marshall, F.H., 2014. Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature* 511, 557–562. doi:10.1038/nature13396

Dorn, G.W., 2010. Adrenergic signaling polymorphisms and their impact on cardiovascular disease. *Physiol. Rev.* 90, 1013–1062. doi:10.1152/physrev.00001.2010

Duc, N.M., Kim, H.R., Chung, K.Y., 2017. Recent Progress in Understanding the Conformational Mechanism of Heterotrimeric G Protein Activation. *Biomol Ther (Seoul)* 25, 4–11. doi:10.4062/biomolther.2016.169

Duc, N.M., Kim, H.R., Chung, K.Y., 2015. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 763, 214–222. doi:10.1016/j.ejphar.2015.05.016

Dzau, V.J., Ingelfinger, J., Pratt, R.E., Ellison, K.E., 1986. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. *Hypertension* 8, 544–548.

Eason, M.G., Jacinto, M.T., Liggett, S.B., 1994. Contribution of ligand structure to activation of alpha 2-adrenergic receptor subtype coupling to Gs. *Mol. Pharmacol.* 45, 696–702.

Eishngdrelo, H., Kongsamut, S., 2013. Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Curr Chem Genom Transl Med* 7, 9–15. doi:10.2174/2213988501307010009

El Messari, S., Iturrioz, X., Fassot, C., De Mota, N., Roesch, D., Llorens-Cortes, C., 2004.

Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J. Neurochem.* 90, 1290–1301. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02591.x

Ellison, D.H., Berl, T., 2007. Clinical practice. The syndrome of inappropriate antidiuresis. *N. Engl. J. Med.* 356, 2064–2072. doi:10.1056/NEJMcp066837

Erdös, E.G., 1975. Angiotensin I converting enzyme. *Circ. Res.* 36, 247–255.

Eyries, M., Siegfried, G., Ciumas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F., Soubrier, F., 2008. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ. Res.* 103, 432–440. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.179333

Fahlke, C., Kortzak, D., Machtens, J.-P., 2016. Molecular physiology of EAAT anion channels. *Pflugers Arch.* 468, 491–502. doi:10.1007/s00424-015-1768-3

Fan, X., Zhou, N., Zhang, X., Mukhtar, M., Lu, Z., Fang, J., DuBois, G.C., Pomerantz, R.J., 2003. Structural and functional study of the apelin-13 peptide, an endogenous ligand of the HIV-1 coreceptor, APJ. *Biochemistry* 42, 10163–10168. doi:10.1021/bi030049s

Farkasfalvi, K., Stagg, M.A., Coppen, S.R., Siedlecka, U., Lee, J., Soppa, G.K., Marczin, N., Szokodi, I., Yacoub, M.H., Terracciano, C.M.N., 2007. Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 889–895. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.017

Fei, D.T., Coghlan, J.P., Scoggins, B.A., Tresham, J.J., 1982. In vivo conversion of [des-Asp1]-angiotensin I to [des-Asp1]-angiotensin II in conscious sheep. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 7, 41–44.

Felix, D., Schlegel, W., 1978. Angiotensin receptive neurones in the subfornical organ. Structure-activity relations. *Brain Res.* 149, 107–116.

Fenske, W., Störk, S., Blechschmidt, A., Maier, S.G.K., Morgenthaler, N.G., Allolio, B., 2009. Copeptin in the differential diagnosis of hyponatremia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 123–129. doi:10.1210/jc.2008-1426

Feracci, H., Maroux, S., 1980. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim. Biophys. Acta* 599, 448–463.

Ferguson, A.V., 2009. Angiotensinergic regulation of autonomic and neuroendocrine outputs: critical roles for the subfornical organ and paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 89, 370–376. doi:10.1159/000211202

Ferguson, S.S., Barak, L.S., Zhang, J., Caron, M.G., 1996a. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 1095–1110.

Ferguson, S.S., Downey, W.E., Colapietro, A.M., Barak, L.S., Ménard, L., Caron, M.G., 1996b. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271, 363–366.

Fernández, D., Boix, E., Pallarès, I., Avilés, F.X., Vendrell, J., 2010a. Analysis of a new crystal form of procarboxypeptidase B: further insights into the catalytic mechanism. *Biopolymers* 93, 178–185. doi:10.1002/bip.21320

Fernández, D., Testero, S., Vendrell, J., Avilés, F.X., Mobashery, S., 2010b. The X-ray structure of carboxypeptidase A inhibited by a thiirane mechanism-based inhibitor. *Chem Biol Drug Des* 75, 29–34. doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00907.x

Fitts, D.A., Starbuck, E.M., Ruhf, A., 2000. Circumventricular organs and ANG II-induced salt appetite: blood pressure and connectivity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R2277–2286.

Fliers, E., Swaab, D.F., 1983. Activation of vasopressinergic and oxytocinergic neurons during aging in the Wistar rat. *Peptides* 4, 165–170.

Fliers, E., Swaab, D.F., Pool, C.W., Verwer, R.W., 1985. The vasopressin and oxytocin neurons in the human supraoptic and paraventricular nucleus; changes with aging and in senile dementia. *Brain Res.* 342, 45–53.

Földes, G., Horkay, F., Szokodi, I., Vuolteenaho, O., Ilves, M., Lindstedt, K.A., Mäyränpää, M., Sármán, B., Seres, L., Skoumal, R., Lakó-Futó, Z., deChâtel, R., Ruskoaho, H., Tóth, M., 2003. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 480–485.

Foulon, T., Cadel, S., Chesneau, V., Draoui, M., Prat, A., Cohen, P., 1996. Two novel metallopeptidases with a specificity for basic residues: functional properties, structure and cellular distribution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 780, 106–120.

Foulon, T., Cadel, S., Cohen, P., 1999. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 747–750.

Foulon, T., Cadel, S., Prat, A., Chesneau, V., Hospital, V., Segrétain, D., Cohen, P., 1997. NRD convertase and aminopeptidase B: two processing metallopeptidases with a selectivity for basic residues. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 58, 357–364.

Fournié-Zaluski, M.C., Coric, P., Turcaud, S., Bruetschy, L., Lucas, E., Noble, F., Roques, B.P., 1992a. Potent and systemically active aminopeptidase N inhibitors designed from active-site investigation. *J. Med. Chem.* 35, 1259–1266.

Fournié-Zaluski, M.C., Coric, P., Turcaud, S., Lucas, E., Noble, F., Maldonado, R., Roques, B.P., 1992b. “Mixed inhibitor-prodrug” as a new approach toward systemically active inhibitors of enkephalin-degrading enzymes. *J. Med. Chem.* 35, 2473–2481.

Fournie-Zaluski, M.-C., Fassot, C., Valentin, B., Djordjijevic, D., Reaux-Le Goazigo, A., Corvol, P., Roques, B.P., Llorens-Cortes, C., 2004. Brain renin-angiotensin system blockade by systemically active aminopeptidase A inhibitors: a potential treatment of salt-dependent hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 7775–7780. doi:10.1073/pnas.0402312101

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. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256–1272. doi:10.1124/mol.63.6.1256

Frigerio, F., Margarit, I., Nogarotto, R., Grandi, G., Vriend, G., Hardy, F., Veltman, O.R., Venema, G., Eijnsink, V.G., 1997. Model building of a thermolysin-like protease by mutagenesis. *Protein Eng.* 10, 223–230.

Fukasawa, K.M., Hirose, J., Hata, T., Ono, Y., 2006. Aspartic acid 405 contributes to the substrate specificity of aminopeptidase B. *Biochemistry* 45, 11425–11431. doi:10.1021/bi0604577

Gainer, H., Russell, J.T., Loh, Y.P., 1984. An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from beta-lipotropin60-65. *FEBS Lett.* 175, 135–139.

Galanth, C., Hus-Citharel, A., Li, B., Llorens-Cortès, C., 2012. Apelin in the control of body fluid homeostasis and cardiovascular functions. *Curr. Pharm. Des.* 18, 789–798.

Galés, C., Van Durm, J.J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., Bouvier, M., 2006. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 778–786. doi:10.1038/nsmb1134

Galon-Tilleman, H., Yang, H., Bednarek, M.A., Spurlock, S.M., Paavola, K.J., Ko, B., To, C., Luo, J., Tian, H., Jermutus, L., Grimsby, J., Rondinone, C.M., Konkar, A., Kaplan, D.D., 2017. Apelin-36 Modulates Blood Glucose and Body Weight Independently of Canonical APJ Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* 292, 1925–1933. doi:10.1074/jbc.M116.748103

Ganten, D., Hermann, K., Bayer, C., Unger, T., Lang, R.E., 1983. Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. *Science* 221, 869–871.

Ganten, D., Hutchinson, J.S., Schelling, P., Ganten, U., Fischer, H., 1976. The iso-renin angiotensin systems in extrarenal tissue. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 3, 103–126.

Gao, J., Marc, Y., Iturrioz, X., Leroux, V., Balavoine, F., Llorens-Cortes, C., 2014. A new strategy for treating hypertension by blocking the activity of the brain renin-angiotensin system with aminopeptidase A inhibitors. *Clin. Sci.* 127, 135–148. doi:10.1042/CS20130396

Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A.I., Fernandez-Rodriguez, P., Lanciego, J.L., Labandeira-Garcia, J.L., 2017. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. *Brain Struct Funct.* doi:10.1007/s00429-016-1357-z

Garrido-Gil, P., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Lanciego, J.L., Labandeira-Garcia, J.L., 2013. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Struct Funct* 218, 373–388. doi:10.1007/s00429-012-0402-9

Gbahou, F., Rouleau, A., Morisset, S., Parmentier, R., Crochet, S., Lin, J.-S., Ligneau, X., Tardivel-

Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C.R., Schwartz, J.-C., Arrang, J.-M., 2003. Protean agonism at histamine H3 receptors in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11086–11091. doi:10.1073/pnas.1932276100

George, S.G., Kenny, A.J., 1973. Studies on the enzymology of purified preparations of brush border from rabbit kidney. *Biochem J* 134, 43–57.

Georgiadis, D., Vazeux, G., Llorens-Cortes, C., Yiotakis, A., Dive, V., 2000. Potent and selective inhibition of zinc aminopeptidase A (EC 3.4.11.7, APA) by glutamyl aminophosphinic peptides: importance of glutamyl aminophosphinic residue in the P1 position. *Biochemistry* 39, 1152–1155.

Gerbier, R., Alvear-Perez, R., Margathe, J.-F., Flahault, A., Couvineau, P., Gao, J., De Mota, N., Dabire, H., Li, B., Ceraudo, E., Hus-Citharel, A., Esteouille, L., Bisoo, C., Hibert, M., Berdeaux, A., Iturrioz, X., Bonnet, D., Llorens-Cortes, C., 2017. Development of original metabolically stable apelin-17 analogs with diuretic and cardiovascular effects. *FASEB J.* 31, 687–700. doi:10.1096/fj.201600784R

Gerbier, R., Leroux, V., Couvineau, P., Alvear-Perez, R., Maigret, B., Llorens-Cortes, C., Iturrioz, X., 2015. New structural insights into the apelin receptor: identification of key residues for apelin binding. *FASEB J.* 29, 314–322. doi:10.1096/fj.14-256339

Gimpl, G., Fahrenholz, F., 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81, 629–683.

Glenner, G.G., Folk, J.E., 1961. Glutamyl peptidases in rat and guinea pig kidney slices. *Nature* 192, 338–340.

Glenner, G.G., McMILLAN, P.J., Folk, J.E., 1962. A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal alpha-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature* 194, 867.

Goldsmith, S.R., Francis, G.S., Cowley, A.W., 1986. Arginine vasopressin and the renal response to water loading in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 58, 295–299.

Gomis-Rüth, F.X., Stöcker, W., Huber, R., Zwilling, R., Bode, W., 1993. Refined 1.8 Å X-ray crystal structure of astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus* L. Structure determination, refinement, molecular structure and comparison with thermolysin. *J. Mol. Biol.* 229, 945–968. doi:10.1006/jmbi.1993.1098

Gomolka, R.S., Cudnoch-Jedrzejewska, A., Czarzasta, K., Szczepanska-Sadowska, E., 2015. Reduction of pressor response to stress by centrally acting apelin in spontaneously hypertensive rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 26, 233–236. doi:10.1515/jbcpp-2014-0066

Gordon, E.M., Godfrey, J.D., Delaney, N.G., Asaad, M.M., Von Langen, D., Cushman, D.W., 1988. Design of novel inhibitors of aminopeptidases. Synthesis of peptide-derived diamino thiols and sulfur replacement analogues of bestatin. *J. Med. Chem.* 31, 2199–2211.

Gorvel, J.P., Benajiba, A., Maroux, S., 1980. Purification and characterization of the rabbit intestinal brush-border aminopeptidase A. *Biochim. Biophys. Acta* 615, 271–274.

Gossrau, R., Merker, H.J., Günther, T., Graf, R., Vormann, J., 1987. Enzymatic and morphological response of the thymus to drugs in normal and zinc-deficient pregnant rats and their fetuses. *Histochemistry* 86, 321–329.

Gouzènes, L., Desarménien, M.G., Hussy, N., Richard, P., Moos, F.C., 1998. Vasopressin regularizes the phasic firing pattern of rat hypothalamic magnocellular vasopressin neurons. *J. Neurosci.* 18, 1879–1885.

Grau, E.M., Marathe, G.V., Tate, S.S., 1979. Rapid purification of rat kidney brush borders enriched in gamma-glutamyl transpeptidase. *FEBS Lett.* 98, 91–95.

Gregorc, V., De Braud, F.G., De Pas, T.M., Scalamogna, R., Citterio, G., Milani, A., Boselli, S., Catania, C., Donadoni, G., Rossoni, G., Ghio, D., Spitaleri, G., Ammannati, C., Colombi, S., Caligaris-Cappio, F., Lambiase, A., Bordignon, C., 2011. Phase I study of NGR-hTNF, a selective vascular targeting agent, in combination with cisplatin in refractory solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 17, 1964–1972. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1376

Gregorc, V., Zucali, P.A., Santoro, A., Ceresoli, G.L., Citterio, G., De Pas, T.M., Zilembo, N., De Vincenzo, F., Simonelli, M., Rossoni, G., Spreafico, A., Grazia Viganò, M., Fontana, F., De Braud, F.G., Bajetta, E., Caligaris-Cappio, F., Bruzzi, P., Lambiase, A., Bordignon, C., 2010. Phase II study of asparagine-glycine-arginine-human tumor necrosis factor alpha, a selective vascular targeting agent, in previously treated patients with malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 28, 2604–2611. doi:10.1200/JCO.2009.27.3649

Griffiths, P.R., Lolait, S.J., Harris, L.E., Paton, J.F., O'Carroll, A.-M., 2017. Vasopressin v1a receptors mediate the hypertensive effects of [PyrNaN]apelin-13 in the rat rostral ventrolateral medulla. *J. Physiol. (Lond.)*. doi:10.1113/JP274178

Gros, C., Giros, B., Schwartz, J.C., 1985. Purification of membrane-bound aminopeptidase from rat brain: identification of aminopeptidase M. *Neuropeptides* 5, 485–488.

Gros, C., Giros, B., Schwartz, J.C., Vlaiculescu, A., Costentin, J., Lecomte, J.M., 1988. Potent inhibition of cerebral aminopeptidases by carbaphethiol, a parenterally active compound. *Neuropeptides* 12, 111–118.

Gros, C., Solhonne, B., Giros, B., Pollard, H., Salès, N., Schwartz, J.C., Ronco, P., Verroust, P., 1986. Immunohistochemical and subcellular studies of aminopeptidase M localization in rat brain: microvessels and synaptic membranes. *NIDA Res. Monogr.* 75, 303–306.

Gundry, J., Glenn, R., Alagesan, P., Rajagopal, S., 2017. A Practical Guide to Approaching Biased Agonism at G Protein Coupled Receptors. *Front Neurosci* 11, 17. doi:10.3389/fnins.2017.00017

Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Tatemoto, K., Fujino, M., 1999. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* 1452, 25–35.

Hackenthal, E., Hackenthal, R., Hofbauer, K.G., 1976. Evidence against inhibition of the renin-

angiotensinogen reaction by des-angiotensin substrate in the rat. *Clin Sci Mol Med Suppl* 3, 155s–157s.

Hall, C., Ehrlich, L., Venter, J., O'Brien, A., White, T., Zhou, T., Dang, T., Meng, F., Invernizzi, P., Bernuzzi, F., Alpini, G., Lairmore, T.C., Glaser, S., 2017. Inhibition of the apelin/apelin receptor axis decreases cholangiocarcinoma growth. *Cancer Lett.* 386, 179–188. doi:10.1016/j.canlet.2016.11.025

Hamada, J., Kimura, J., Ishida, J., Kohda, T., Morishita, S., Ichihara, S., Fukamizu, A., 2008. Evaluation of novel cyclic analogues of apelin. *Int. J. Mol. Med.* 22, 547–552.

Hamada, K., Hata, Y., Katsuya, Y., Hiramatsu, H., Fujiwara, T., Katsube, Y., 1996. Crystal structure of Serratia protease, a zinc-dependent proteinase from *Serratia* sp. E-15, containing a beta-sheet coil motif at 2.0 Å resolution. *J. Biochem.* 119, 844–851.

Harding, J.W., Felix, D., 1987a. The effects of the aminopeptidase inhibitors amastatin and bestatin on angiotensin-evoked neuronal activity in rat brain. *Brain Res.* 424, 299–304.

Harding, J.W., Felix, D., 1987b. Angiotensin-sensitive neurons in the rat paraventricular nucleus: relative potencies of angiotensin II and angiotensin III. *Brain Res.* 410, 130–134.

Harding, J.W., Jensen, L.L., Hanesworth, J.M., Roberts, K.A., Page, T.A., Wright, J.W., 1992. Release of angiotensins in paraventricular nucleus of rat in response to physiological and chemical stimuli. *Am. J. Physiol.* 262, F17–23.

Harding, J.W., Yoshida, M.S., Dilts, R.P., Woods, T.M., Wright, J.W., 1986. Cerebroventricular and intravascular metabolism of [¹²⁵I]angiotensins in rat. *J. Neurochem.* 46, 1292–1297.

Härdtner, C., Mörke, C., Walther, R., Wolke, C., Lendeckel, U., 2013. High glucose activates the alternative ACE2/Ang-(1-7)/Mas and APN/Ang IV/IRAP RAS axes in pancreatic β -cells. *Int. J. Mol. Med.* 32, 795–804. doi:10.3892/ijmm.2013.1469

Hashimoto, T., Kihara, M., Ishida, J., Imai, N., Yoshida, S., Toya, Y., Fukamizu, A., Kitamura, H., Umemura, S., 2006. Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1267–1272. doi:10.1161/01.ATV.0000218841.39828.91

Healy, D.P., Printz, M.P., 1984. Distribution of immunoreactive angiotensin II, angiotensin I, angiotensinogen and renin in the central nervous system of intact and nephrectomized rats. *Hypertension* 6, 130–136.

Healy, D.P., Wilk, S., 1993. Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II. *Brain Res.* 606, 295–303.

Herranz, R., Vinuesa, S., Pérez, C., García-López, M.T., De Ceballos, M.L., Murillo, F.M., del Río, J., 1992. Aminopeptidase inhibitory properties and analgesic activity of (2S,3R)-3,7-diamino-2-hydroxy-heptanoic acid containing tripeptide analogues of the N-terminal tripeptide of probestin. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 325, 515–518.

Hersh, L.B., Aboukhair, N., Watson, S., 1987. Immunohistochemical localization of

aminopeptidase M in rat brain and periphery: relationship of enzyme localization and enkephalin metabolism. *Peptides* 8, 523–532.

Herzig, C.M., Schoeppe, W., Scherberich, J.E., 1992. Angiotensinase A (aminopeptidase A): properties of chromatographically purified isoforms from human kidney. *J. Chromatogr.* 625, 73–82.

Hesp, J.R., Hooper, N.M., 1997. Proteolytic fragmentation reveals the oligomeric and domain structure of porcine aminopeptidase A. *Biochemistry* 36, 3000–3007. doi:10.1021/bi962401q

Higgins, J.B., Casey, P.J., 1994. In vitro processing of recombinant G protein gamma subunits. Requirements for assembly of an active beta gamma complex. *J. Biol. Chem.* 269, 9067–9073.

Hildebrandt, J.D., Sekura, R.D., Codina, J., Iyengar, R., Manclark, C.R., Birnbaumer, L., 1983. Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature* 302, 706–709.

Hilgenfeldt, U., 1984. Angiotensinogen in rat cerebrospinal fluid. *Clin Exp Hypertens A* 6, 1815–1824.

Hirose, S., Yokosawa, H., Inagami, T., 1978. Immunochemical identification of renin in rat brain and distinction from acid proteases. *Nature* 274, 392–393.

Hogarty, D.C., Speakman, E.A., Puig, V., Phillips, M.I., 1992. The role of angiotensin, AT1 and AT2 receptors in the pressor, drinking and vasopressin responses to central angiotensin. *Brain Res.* 586, 289–294.

Holden, H.M., Tronrud, D.E., Monzingo, A.F., Weaver, L.H., Matthews, B.W., 1987. Slow- and fast-binding inhibitors of thermolysin display different modes of binding: crystallographic analysis of extended phosphoramidate transition-state analogues. *Biochemistry* 26, 8542–8553.

Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R.K.Y., Doré, A.S., Jazayeri, A., Cooke, R.M., Weir, M., Marshall, F.H., 2013. Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* 499, 438–443. doi:10.1038/nature12357

Holmes, M.A., Matthews, B.W., 1981. Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysin suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis. *Biochemistry* 20, 6912–6920.

Hoogendijk, J.E., Fliers, E., Swaab, D.F., Verwer, R.W., 1985. Activation of vasopressin neurons in the human supraoptic and paraventricular nucleus in senescence and senile dementia. *J. Neurol. Sci.* 69, 291–299.

Hooper, N.M., 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354, 1–6.

Hopsu, V.K., Kantonen, U.M., Glenner, G.G., 1964. A PEPTIDASE FROM RAT TISSUES SELECTIVELY HYDROLYZING N-TERMINAL ARGININE AND LYSINE RESIDUES. *Life Sciences* (1962) 3, 1449–1453.

Hopsu, V.K., Mäkinen, K.K., Glenner, G.G., 1966. Characterization of aminopeptidase B: substrate specificity and effector studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 114, 567–575.

Hori, T., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Nonaka, N., Tanaka, N., Hashimoto, Y., Ueki, U., Takio, K., 2001. Structure of a new “aspzincin” metalloendopeptidase from *Grifola frondosa*: implications for the catalytic mechanism and substrate specificity based on several different crystal forms. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 361–368.

Horn, F., Bettler, E., Oliveira, L., Campagne, F., Cohen, F.E., Vriend, G., 2003. GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 31, 294–297.

Horn, F., Weare, J., Beukers, M.W., Hörsch, S., Bairoch, A., Chen, W., Edvardsen, O., Campagne, F., Vriend, G., 1998. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 26, 275–279.

Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2000. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J. Biol. Chem.* 275, 21061–21067. doi:10.1074/jbc.M908417199

Howl, J., Wheatley, M., 1996. Molecular recognition of peptide and non-peptide ligands by the extracellular domains of neurohypophyseal hormone receptors. *Biochem. J.* 317 (Pt 2), 577–582.

Huang, H., Arnal, J.F., Llorens-Cortes, C., Challah, M., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., Michel, J.B., 1994. Discrepancy between plasma and lung angiotensin-converting enzyme activity in experimental congestive heart failure. A novel aspect of endothelium dysfunction. *Circ. Res.* 75, 454–461.

Hughey, R.P., Rankin, B.B., Elce, J.S., Curthoys, N.P., 1978. Specificity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturic acid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 186, 211–217.

Hurbin, A., Boissin-Agasse, L., Orcel, H., Rabié, A., Joux, N., Desarménien, M.G., Richard, P., Moos, F.C., 1998. The V1a and V1b, but not V2, vasopressin receptor genes are expressed in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus, and the transcripts are essentially colocalized in the vasopressinergic magnocellular neurons. *Endocrinology* 139, 4701–4707. doi:10.1210/endo.139.11.6320

Husain, A., Smeby, R.R., Wilk, D., Dzau, V.J., Bumpus, F.M., 1984. Biochemical and immunological properties of dog brain isorenin. *Endocrinology* 114, 2210–2215. doi:10.1210/endo-114-6-2210

Hus-Citharel, A., Bodineau, L., Frugière, A., Joubert, F., Bouby, N., Llorens-Cortes, C., 2014. Apelin counteracts vasopressin-induced water reabsorption via cross talk between apelin and vasopressin receptor signaling pathways in the rat collecting duct. *Endocrinology* 155, 4483–4493. doi:10.1210/en.2014-1257

Hus-Citharel, A., Bouby, N., Frugière, A., Bodineau, L., Gasc, J.-M., Llorens-Cortes, C., 2008.

Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int.* 74, 486–494. doi:10.1038/ki.2008.199

Hus-Citharel, A., Gasc, J.M., Zini, S., Marchetti, J., Roques, B., Corvol, P., Llorens-Cortes, C., 1999. Aminopeptidase A activity and angiotensin III effects on $[Ca^{2+}]_i$ along the rat nephron. *Kidney Int.* 56, 850–859. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00634.x

Hwang, S.-R., Hook, V., 2008. Zinc regulation of aminopeptidase B involved in neuropeptide production. *FEBS Lett.* 582, 2527–2531. doi:10.1016/j.febslet.2008.06.017

Hwang, S.-R., O'Neill, A., Bark, S., Foulon, T., Hook, V., 2007. Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules. *J. Neurochem.* 100, 1340–1350. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04325.x

Ikeda, N., Nakajima, Y., Tokuhara, T., Hattori, N., Sho, M., Kanehiro, H., Miyake, M., 2003. Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9, 1503–1508.

Inagaki, Y., Tang, W., Zhang, L., Du, G., Xu, W., Kokudo, N., 2010. Novel aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor 24F can suppress invasion of hepatocellular carcinoma cells as well as angiogenesis. *Biosci Trends* 4, 56–60.

Inagami, T., Celio, M.R., Clemens, D.L., Lau, D., Takii, Y., Kasselberg, A.G., Hirose, S., 1980. Renin in rat and mouse brain: immunohistochemical identification and localization. *Clin. Sci.* 59 Suppl 6, 49s–51s.

Inguibert, N., Coric, P., Dhotel, H., Bonnard, E., Llorens-Cortes, C., Mota, N., Fournié-Zaluski, M.-C., Roques, B.-P., 2005. Synthesis and in vitro activities of new non-peptidic APA inhibitors. *J. Pept. Res.* 65, 175–188. doi:10.1111/j.1399-3011.2004.00211.x

Intebi, A.D., Flaxman, M.S., Ganong, W.F., Deschepper, C.F., 1990. Angiotensinogen production by rat astroglial cells in vitro and in vivo. *Neuroscience* 34, 545–554.

Isberg, V., de Graaf, C., Bortolato, A., Cherezov, V., Katritch, V., Marshall, F.H., Mordalski, S., Pin, J.-P., Stevens, R.C., Vriend, G., Gloriam, D.E., 2015. Generic GPCR residue numbers - aligning topology maps while minding the gaps. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 22–31. doi:10.1016/j.tips.2014.11.001

Ishida, J., Hashimoto, T., Hashimoto, Y., Nishiwaki, S., Iguchi, T., Harada, S., Sugaya, T., Matsuzaki, H., Yamamoto, R., Shiota, N., Okunishi, H., Kihara, M., Umemura, S., Sugiyama, F., Yagami, K.-I., Kasuya, Y., Mochizuki, N., Fukamizu, A., 2004. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 26274–26279. doi:10.1074/jbc.M404149200

Isobe, T., Okuyama, T., 1985. Brain micro glutamic acid-rich protein is the C-terminal endpiece of the neurofilament 68-kDa protein as determined by the primary sequence. *FEBS Lett.* 182, 389–392.

Ito, K., Nakajima, Y., Onohara, Y., Takeo, M., Nakashima, K., Matsubara, F., Ito, T., Yoshimoto, T., 2006. Crystal structure of aminopeptidase N (proteobacteria alanyl aminopeptidase) from *Escherichia coli* and conformational change of methionine 260 involved in substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 281, 33664–33676. doi:10.1074/jbc.M605203200

Iturrioz, X., Alvear-Perez, R., De Mota, N., Franchet, C., Guillier, F., Leroux, V., Dabire, H., Le Jouan, M., Chabane, H., Gerbier, R., Bonnet, D., Berdeaux, A., Maigret, B., Galzi, J.-L., Hibert, M., Llorens-Cortes, C., 2010a. Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist. *FASEB J.* 24, 1506–1517. doi:10.1096/fj.09-140715

Iturrioz, X., Gerbier, R., Leroux, V., Alvear-Perez, R., Maigret, B., Llorens-Cortes, C., 2010b. By interacting with the C-terminal Phe of apelin, Phe255 and Trp259 in helix VI of the apelin receptor are critical for internalization. *J. Biol. Chem.* 285, 32627–32637. doi:10.1074/jbc.M110.127167

Iturrioz, X., Rozenfeld, R., Michaud, A., Corvol, P., Llorens-Cortes, C., 2001. Study of asparagine 353 in aminopeptidase A: characterization of a novel motif (GXMEN) implicated in exopeptidase specificity of monozinc aminopeptidases. *Biochemistry* 40, 14440–14448.

Iturrioz, X., Vazeux, G., Célérier, J., Corvol, P., Llorens-Cortès, C., 2000. Histidine 450 plays a critical role in catalysis and, with Ca²⁺, contributes to the substrate specificity of aminopeptidase A. *Biochemistry* 39, 3061–3068.

Iwanaga, Y., Kihara, Y., Takenaka, H., Kita, T., 2006. Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: Possible role of angiotensin II-angiotensin type 1 receptor system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41, 798–806. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.07.004

Japp, A.G., Cruden, N.L., Amer, D.A.B., Li, V.K.Y., Goudie, E.B., Johnston, N.R., Sharma, S., Neilson, I., Webb, D.J., Megson, I.L., Flapan, A.D., Newby, D.E., 2008. Vascular effects of apelin in vivo in man. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 908–913. doi:10.1016/j.jacc.2008.06.013

Japp, A.G., Cruden, N.L., Barnes, G., van Gemenen, N., Mathews, J., Adamson, J., Johnston, N.R., Denvir, M.A., Megson, I.L., Flapan, A.D., Newby, D.E., 2010. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation* 121, 1818–1827. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.911339

Japp, A.G., Newby, D.E., 2008. The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1882–1892. doi:10.1016/j.bcp.2007.12.015

Jarpe, M.B., Knall, C., Mitchell, F.M., Buhl, A.M., Duzic, E., Johnson, G.L., 1998. [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]Substance P acts as a biased agonist toward neuropeptide and chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 3097–3104.

Jensen, L.L., Harding, J.W., Wright, J.W., 1989. Increased blood pressure induced by central application of aminopeptidase inhibitors is angiotensinergic-dependent in normotensive and hypertensive rat strains. *Brain Res.* 490, 48–55.

Jéquier, E., Constant, F., 2010. Water as an essential nutrient: the physiological basis of

hydration. *Eur J Clin Nutr* 64, 115–123. doi:10.1038/ejcn.2009.111

Jia, Y.-X., Pan, C.-S., Zhang, J., Geng, B., Zhao, J., Gerns, H., Yang, J., Chang, J.-K., Tang, C.-S., Qi, Y.-F., 2006. Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Regul. Pept.* 133, 147–154. doi:10.1016/j.regpep.2005.09.033

Jia, Z.Q., Hou, L., Leger, A., Wu, I., Kudej, A.B., Stefano, J., Jiang, C., Pan, C.Q., Akita, G.Y., 2012. Cardiovascular effects of a PEGylated apelin. *Peptides* 38, 181–188. doi:10.1016/j.peptides.2012.09.003

Johnson, A.K., Cunningham, J.T., Thunhorst, R.L., 1996. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23, 183–191.

Jöhren, O., Imboden, H., Häuser, W., Maye, I., Sanvitto, G.L., Saavedra, J.M., 1997. Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes, and vasopressin in the mouse hypothalamus. *Brain Res.* 757, 218–227.

Jones, J.C., Duffy, J.W., Machius, M., Temple, B.R.S., Dohlman, H.G., Jones, A.M., 2011. The crystal structure of a self-activating G protein alpha subunit reveals its distinct mechanism of signal initiation. *Sci Signal* 4, ra8. doi:10.1126/scisignal.2001446

Jongeneel, C.V., Bouvier, J., Bairoch, A., 1989. A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett.* 242, 211–214.

Juhl, C., Els-Heindl, S., Schönauer, R., Redlich, G., Haaf, E., Wunder, F., Riedl, B., Burkhardt, N., Beck-Sickinger, A.G., Bierer, D., 2016. Development of Potent and Metabolically Stable APJ Ligands with High Therapeutic Potential. *ChemMedChem*. doi:10.1002/cmdc.201600307

Julius, S., Schork, N., Schork, A., 1988. Sympathetic hyperactivity in early stages of hypertension: the Ann Arbor data set. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12 Suppl 3, S121-129.

Kadekaro, M., Summy-Long, J.Y., Freeman, S., Harris, J.S., Terrell, M.L., Eisenberg, H.M., 1992. Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats. *Am. J. Physiol.* 262, R310-317.

Kageyama, R., Ohkubo, H., Nakanishi, S., 1984. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry* 23, 3603–3609.

Kagiyama, S., Fukuhara, M., Matsumura, K., Lin, Y., Fujii, K., Iida, M., 2005. Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul. Pept.* 125, 55–59. doi:10.1016/j.regpep.2004.07.033

Kang, Y., Kim, Jongmin, Anderson, J.P., Wu, J., Gleim, S.R., Kundu, R.K., McLean, D.L., Kim, Jungdae, Park, H., Jin, S., Hwa, J., Quertermous, T., Chun, H.J., 2013. Apelin-APJ signaling is a critical regulator of endothelial MEF2 activation in cardiovascular development. *Circ. Res.* 113, 22–31. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301324

Kang, Y., Zhou, X.E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., Barty, A., White, T.A., Yefanov, O., Han, G.W., Xu, Q., de Waal, P.W., Ke, J., Tan, M.H.E., Zhang, C., Moeller, A., West, G.M., Pascal,

B.D., Van Eps, N., Caro, L.N., Vishnivetskiy, S.A., Lee, R.J., Suino-Powell, K.M., Gu, X., Pal, K., Ma, J., Zhi, X., Boutet, S., Williams, G.J., Messerschmidt, M., Gati, C., Zatsepin, N.A., Wang, D., James, D., Basu, S., Roy-Chowdhury, S., Conrad, C.E., Coe, J., Liu, H., Lisova, S., Kupitz, C., Grotjohann, I., Fromme, R., Jiang, Y., Tan, M., Yang, H., Li, J., Wang, M., Zheng, Z., Li, D., Howe, N., Zhao, Y., Standfuss, J., Diederichs, K., Dong, Y., Potter, C.S., Carragher, B., Caffrey, M., Jiang, H., Chapman, H.N., Spence, J.C.H., Fromme, P., Weierstall, U., Ernst, O.P., Katritch, V., Gurevich, V.V., Griffin, P.R., Hubbell, W.L., Stevens, R.C., Cherezov, V., Melcher, K., Xu, H.E., 2015. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature* 523, 561–567. doi:10.1038/nature14656

Katritch, V., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2013. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 531–556. doi:10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923

Katugampola, S.D., Maguire, J.J., Matthewson, S.R., Davenport, A.P., 2001. [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1255–1260. doi:10.1038/sj.bjp.0703939

Katz, A.M., Lorell, B.H., 2000. Regulation of cardiac contraction and relaxation. *Circulation* 102, IV69–74.

Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2001. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta* 1538, 162–171.

Kawamura, J., Shimada, Y., Kitaichi, H., Komoto, I., Hashimoto, Y., Kaganoi, J., Miyake, M., Yamasaki, S., Kondo, K., Imamura, M., 2007. Clinicopathological significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 54, 36–40.

Kehlen, A., Lendeckel, U., Dralle, H., Langner, J., Hoang-Vu, C., 2003. Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 63, 8500–8506.

Kelly, E., Rooney, T.A., Nahorski, S.R., 1985. Pertussis toxin separates two muscarinic receptor-effector mechanisms in the striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 119, 129–130.

Kenakin, T., 1995. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 232–238.

Kenakin, T.P., Morgan, P.H., 1989. Theoretical effects of single and multiple transducer receptor coupling proteins on estimates of the relative potency of agonists. *Mol. Pharmacol.* 35, 214–222.

Khairallah, P.A., Bumpus, F.M., Page, I.H., Smeby, R.R., 1963. Angiotensinase with a high degree of specificity in plasma and red cells. *Science* 140, 672–674.

Khan, P., Maloney, P.R., Hedrick, M., Gosalia, P., Milewski, M., Li, L., Roth, G.P., Sergienko, E., Suyama, E., Sugarman, E., Nguyen, K., Mehta, A., Vasile, S., Su, Y., Shi, S., Stonich, D., Nguyen,

H., Zeng, F.-Y., Novo, A.M., Vicchiarelli, M., Diwan, J., Chung, T.D., Pinkerton, A.B., Smith, L.H., 2010. Functional Agonists of the Apelin (APJ) Receptor, in: Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

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 G $\beta\gamma$ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol. Rev.* 65, 545–577. doi:10.1124/pr.111.005603

Kim, H.M., Shin, D.R., Yoo, O.J., Lee, H., Lee, J.-O., 2003. Crystal structure of *Drosophila* angiotensin I-converting enzyme bound to captopril and lisinopril. *FEBS Lett.* 538, 65–70.

Kleinz, M.J., Davenport, A.P., 2004. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul. Pept.* 118, 119–125. doi:10.1016/j.regpep.2003.11.002

Kleinz, M.J., Skepper, J.N., Davenport, A.P., 2005. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul. Pept.* 126, 233–240. doi:10.1016/j.regpep.2004.10.019

Kohout, T.A., Lin, F.S., Perry, S.J., Conner, D.A., Lefkowitz, R.J., 2001. beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1601–1606. doi:10.1073/pnas.041608198

Kolakowski, L.F., 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept. Channels* 2, 1–7.

Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., Arab, S., Chen, M., Maekawa, Y., Leschnik, M., Leibbrandt, A., Markovic, M., Makovic, M., Schwaighofer, J., Beetz, N., Musialek, R., Neely, G.G., Komnenovic, V., Kolm, U., Metzler, B., Ricci, R., Hara, H., Meixner, A., Nghiem, M., Chen, X., Dawood, F., Wong, K.M., Sarao, R., Cukerman, E., Kimura, A., Hein, L., Thalhammer, J., Liu, P.P., Penninger, J.M., 2007. Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ. Res.* 101, e32–42. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.158659

Kubo, T., Yamaguchi, H., Tsujimura, M., Hagiwara, Y., Fukumori, R., 2000. Blockade of angiotensin receptors in the anterior hypothalamic preoptic area lowers blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 23, 109–118.

Kugler, P., 1982. Amino peptidase A is angiotensinase A. II. Biochemical studies on amino peptidase A and M in rat kidney homogenate. *Histochemistry* 74, 247–261.

Kugler, P., 1981. Localization of amino peptidase A (angiotensinase A) in the rat and mouse kidney. *Histochemistry* 72, 269–278.

Kumar, P., Ashokan, A., Aradhyam, G.K., 2016. Apelin binding to human APJ receptor leads to biased signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 1748–1756. doi:10.1016/j.bbapap.2016.09.012

Kunz, J., Krause, D., Kremer, M., Dermietzel, R., 1994. The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to amino peptidase N. *J. Neurochem.* 62, 2375–2386.

- Kurauchi, O., Mizutani, S., Okano, K., Narita, O., Tomoda, Y., 1986. Purification and characterization of human placental microsomal aminopeptidase: immunological difference between placental microsomal aminopeptidase and pregnancy serum cystyl-aminopeptidase. *Enzyme* 35, 197–205.
- Ladeiras-Lopes, R., Ferreira-Martins, J., Leite-Moreira, A.F., 2008. The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arq. Bras. Cardiol.* 90, 343–349.
- Lalu, K., Lampelo, S., Nummelin-Kortelainen, M., Vanha-Perttula, T., 1984. Purification and partial characterization of aminopeptidase A from the serum of pregnant and non-pregnant women. *Biochim. Biophys. Acta* 789, 324–333.
- Lalu, K., Lampelo, S., Vanha-Perttula, T., 1986. Characterization of three aminopeptidases purified from maternal serum. *Biochim. Biophys. Acta* 873, 190–197.
- Lalu, K., Lampelo, S., Vanha-Perttula, T., 1985. Purification of three aminopeptidases from human maternal serum. *Int. J. Biochem.* 17, 1227–1235.
- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B., 1996. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311–319. doi:10.1038/379311a0
- Langelaan, D.N., Reddy, T., Banks, A.W., Delleire, G., Dupré, D.J., Rainey, J.K., 2013. Structural features of the apelin receptor N-terminal tail and first transmembrane segment implicated in ligand binding and receptor trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1471–1483. doi:10.1016/j.bbame.2013.02.005
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S., Caron, M.G., 2000. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 275, 23120–23126. doi:10.1074/jbc.M002581200
- Lavoie, J.L., Cassell, M.D., Gross, K.W., Sigmund, C.D., 2004. Localization of renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model. *Physiol. Genomics* 16, 240–246. doi:10.1152/physiolgenomics.00131.2003
- Le Moual, H., Devault, A., Roques, B.P., Crine, P., Boileau, G., 1991. Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J. Biol. Chem.* 266, 15670–15674.
- Le Moual, H., Dion, N., Roques, B.P., Crine, P., Boileau, G., 1994. Asp650 is crucial for catalytic activity of neutral endopeptidase 24-11. *Eur. J. Biochem.* 221, 475–480.
- Lee, C.-H., Lü, W., Michel, J.C., Goehring, A., Du, J., Song, X., Gouaux, E., 2014. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* 511, 191–197. doi:10.1038/nature13548
- Lee, D.K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A.P., Liu, Y., Osmond, D.H., George, S.R., O'Dowd, B.F., 2000. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J. Neurochem.* 74, 34–41.

- Lee, D.K., Ferguson, S.S.G., George, S.R., O'Dowd, B.F., 2010. The fate of the internalized apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with beta-arrestin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395, 185–189. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.151
- Lee, D.K., Saldivia, V.R., Nguyen, T., Cheng, R., George, S.R., O'Dowd, B.F., 2005. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 146, 231–236. doi:10.1210/en.2004-0359
- Lee, H.J., Tomioka, M., Takaki, Y., Masumoto, H., Saido, T.C., 2000. Molecular cloning and expression of aminopeptidase A isoforms from rat hippocampus. *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 273–278.
- Lee, M.-H., Appleton, K.M., Strungs, E.G., Kwon, J.Y., Morinelli, T.A., Peterson, Y.K., Laporte, S.A., Luttrell, L.M., 2016. The conformational signature of β -arrestin2 predicts its trafficking and signalling functions. *Nature* 531, 665–668. doi:10.1038/nature17154
- Lee-Kirsch, M.A., Gaudet, F., Cardoso, M.C., Lindpaintner, K., 1999. Distinct renin isoforms generated by tissue-specific transcription initiation and alternative splicing. *Circ. Res.* 84, 240–246.
- Lehmann, D.M., Seneviratne, A.M.P.B., Smrcka, A.V., 2008. Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation. *Mol. Pharmacol.* 73, 410–418. doi:10.1124/mol.107.041780
- Lejczak, B., De Choszczak, M.P., Kafarski, P., 1993. Inhibition of aminopeptidases by phosphonic acid and phosphinic acid analogues of aspartic and glutamic acids. *J. Enzym. Inhib.* 7, 97–103.
- Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P., Llorens-Cortès, C., 1997. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol* 18, 383–439. doi:10.1006/frne.1997.0155
- Li, L., Wang, J., Cooper, M.D., 1993. cDNA cloning and expression of human glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A). *Genomics* 17, 657–664. doi:10.1006/geno.1993.1386
- Li, L., Wu, Q., Barnoski, B.L., Cooper, M.D., 1997. High-resolution genetic map of the human glutamyl aminopeptidase gene (ENPEP). *Genomics* 43, 380–383. doi:10.1006/geno.1997.4823
- Li, Y., Chen, J., Bai, B., Du, H., Liu, Y., Liu, H., 2012. Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: roles in signal transduction. *Cell. Signal.* 24, 991–1001. doi:10.1016/j.cellsig.2011.12.012
- Lijnen, P.J., Petrov, V.V., Turner, M., Fagard, R.H., 2005. Collagen production in cardiac fibroblasts during inhibition of aminopeptidase B. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 6, 69–77. doi:10.3317/jraas.2005.012
- Lind, R.W., Ganten, D., 1990. Neuropeptides in the CNS, in: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam.

- Litosch, I., 2016. Decoding Gαq signaling. *Life Sci.* 152, 99–106. doi:10.1016/j.lfs.2016.03.037
- Llorens-Cortès, C., 2014. [Orally active aminopeptidase A inhibitors reduce blood pressure: a new strategy for treating hypertension]. *Biol Aujourdhui* 208, 217–224. doi:10.1051/jbio/2014010
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547–1550.
- Lojda, Z., Gossrau, R., 1980. Study on aminopeptidase A. *Histochemistry* 67, 267–290.
- Luan, Y., Ma, C., Wang, Y., Fang, H., Xu, W., 2012. The characteristics, functions and inhibitors of three aminopeptidases belonging to the m1 family. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 490–500.
- Lucassen, P.J., Salehi, A., Pool, C.W., Gonatas, N.K., Swaab, D.F., 1994. Activation of vasopressin neurons in aging and Alzheimer's disease. *J. Neuroendocrinol.* 6, 673–679.
- Luciani, N., Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A., Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.C., 1998. Characterization of Glu350 as a critical residue involved in the N-terminal amine binding site of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2): insights into its mechanism of action. *Biochemistry* 37, 686–692. doi:10.1021/bi971705p
- Ludwig, M., 1998. Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J. Neuroendocrinol.* 10, 881–895.
- Lynch, K.R., Hawelu-Johnson, C.L., Guyenet, P.G., 1987. Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry. *Brain Res.* 388, 149–158.
- Ma, Y.C., Huang, X.Y., 2002. Novel regulation and function of Src tyrosine kinase. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 456–462.
- Macaluso, N.J.M., Pitkin, S.L., Maguire, J.J., Davenport, A.P., Glen, R.C., 2011. Discovery of a competitive apelin receptor (APJ) antagonist. *ChemMedChem* 6, 1017–1023. doi:10.1002/cmdc.201100069
- MacGregor, D.P., Murone, C., Song, K., Allen, A.M., Paxinos, G., Mendelsohn, F.A., 1995. Angiotensin II receptor subtypes in the human central nervous system. *Brain Res.* 675, 231–240.
- Maguire, J.J., Kleinz, M.J., Pitkin, S.L., Davenport, A.P., 2009. [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* 54, 598–604. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134619
- Malito, E., Ralat, L.A., Manolopoulou, M., Tsay, J.L., Wadlington, N.L., Tang, W.-J., 2008. Molecular bases for the recognition of short peptide substrates and cysteine-directed modifications of human insulin-degrading enzyme. *Biochemistry* 47, 12822–12834. doi:10.1021/bi801192h
- Maloney, P.R., Khan, P., Hedrick, M., Gosalia, P., Milewski, M., Li, L., Roth, G.P., Sergienko, E., Suyama, E., Sugarman, E., Nguyen, K., Mehta, A., Vasile, S., Su, Y., Stonich, D., Nguyen, H.,

Zeng, F.-Y., Novo, A.M., Vicchiarelli, M., Diwan, J., Chung, T.D.Y., Pinkerton, A.B., Smith, L.H., 2010. Functional antagonists of the Apelin (APJ) receptor, in: Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

Maloney, P.R., Khan, P., Hedrick, M., Gosalia, P., Milewski, M., Li, L., Roth, G.P., Sergienko, E., Suyama, E., Sugarman, E., Nguyen, K., Mehta, A., Vasile, S., Su, Y., Stonich, D., Nguyen, H., Zeng, F.-Y., Novo, A.M., Vicchiarelli, M., Diwan, J., Chung, T.D.Y., Smith, L.H., Pinkerton, A.B., 2012. Discovery of 4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-pyran-3-yl 4-nitrobenzoate (ML221) as a functional antagonist of the apelin (APJ) receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6656–6660. doi:10.1016/j.bmcl.2012.08.105

Mangiapane, M.L., Thrasher, T.N., Keil, L.C., Simpson, J.B., Ganong, W.F., 1984. Role for the subfornical organ in vasopressin release. *Brain Res. Bull.* 13, 43–47.

Manning, M., Lowbridge, J., Haldar, J., Sawyer, W.H., 1977. Design of neurohypophyseal peptides that exhibit selective agonistic and antagonistic properties. *Fed. Proc.* 36, 1848–1852.

Marc, Y., Gao, J., Balavoine, F., Michaud, A., Roques, B.P., Llorens-Cortes, C., 2012. Central antihypertensive effects of orally active aminopeptidase A inhibitors in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 60, 411–418. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.190942

Marc, Y., Llorens-Cortes, C., 2011. The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: implications for new treatment. *Prog. Neurobiol.* 95, 89–103. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.06.006

Marchetti, J., Roseau, S., Alhenc-Gelas, F., 1987. Angiotensin I converting enzyme and kinin-hydrolyzing enzymes along the rabbit nephron. *Kidney Int.* 31, 744–751.

Margathe, J.-F., Iturrioz, X., Alvear-Perez, R., Marsol, C., Riché, S., Chabane, H., Tounsi, N., Kuhry, M., Heissler, D., Hibert, M., Llorens-Cortes, C., Bonnet, D., 2014. Structure-activity relationship studies toward the discovery of selective apelin receptor agonists. *J. Med. Chem.* 57, 2908–2919. doi:10.1021/jm401789v

Marie-Claire, C., Roques, B.P., Beaumont, A., 1998. Intramolecular processing of prothermolysin. *J. Biol. Chem.* 273, 5697–5701.

Marie-Claire, C., Ruffet, E., Antonczak, S., Beaumont, A., O'Donohue, M., Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.C., 1997. Evidence by site-directed mutagenesis that arginine 203 of thermolysin and arginine 717 of neprilysin (neutral endopeptidase) play equivalent critical roles in substrate hydrolysis and inhibitor binding. *Biochemistry* 36, 13938–13945. doi:10.1021/bi9712495

Mascolo, A., Sessa, M., Scavone, C., De Angelis, A., Vitale, C., Berrino, L., Rossi, F., Rosano, G., Capuano, A., 2017. New and old roles of the peripheral and brain renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS): Focus on cardiovascular and neurological diseases. *Int. J. Cardiol.* 227, 734–742. doi:10.1016/j.ijcard.2016.10.069

- Masri, B., Lahlou, H., Mazarguil, H., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2002. Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 539–545. doi:10.1006/bbrc.2001.6230
- Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2004. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J.* 18, 1909–1911. doi:10.1096/fj.04-1930fje
- Masri, B., Morin, N., Pedebornade, L., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2006. The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments. *J. Biol. Chem.* 281, 18317–18326. doi:10.1074/jbc.M600606200
- Masuyama, Y., Tsuda, K., Kuchii, M., Nishio, I., 1986. Peripheral neural mechanism of hypertension in rat models--peripheral sympathetic neurotransmission in hypertension. *J Hypertens Suppl* 4, S189-192.
- Máté, G., Kertész, I., Enyedi, K.N., Mező, G., Angyal, J., Vasas, N., Kis, A., Szabó, É., Emri, M., Bíró, T., Galuska, L., Trencsényi, G., 2015. In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13) receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer (68)Ga-NOTA-c(NGR). *Eur J Pharm Sci* 69, 61–71. doi:10.1016/j.ejps.2015.01.002
- Mathar, I., Kecskes, M., Van der Mieren, G., Jacobs, G., Camacho Londoño, J.E., Uhl, S., Flockerzi, V., Voets, T., Freichel, M., Nilius, B., Herijgers, P., Vennekens, R., 2014. Increased β -adrenergic inotropy in ventricular myocardium from Trpm4^{-/-} mice. *Circ. Res.* 114, 283–294. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302835
- Matsas, R., Stephenson, S.L., Hryszko, J., Kenny, A.J., Turner, A.J., 1985. The metabolism of neuropeptides. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N. *Biochem. J.* 231, 445–449.
- Matthews, B.W., 1988. Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *Accounts of chemical research* 21, 333–340. doi:10.1021/ar00153a003
- Matthews, B.W., Colman, P.M., Jansonius, J.N., Titani, K., Walsh, K.A., Neurath, H., 1972a. Structure of thermolysin. *Nature New Biol.* 238, 41–43.
- Matthews, B.W., Jansonius, J.N., Colman, P.M., Schoenborn, B.P., Dupourque, D., 1972b. Three-dimensional structure of thermolysin. *Nature New Biol.* 238, 37–41.
- Matthews, B.W., Weaver, L.H., Kester, W.R., 1974. The conformation of thermolysin. *J. Biol. Chem.* 249, 8030–8044.
- Mauborgne, A., Bourgoin, S., Benoliel, J.J., Hirsch, M., Berthier, J.L., Hamon, M., Cesselin, F., 1987. Enkephalinase is involved in the degradation of endogenous substance P released from slices of rat substantia nigra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243, 674–680.
- May, L.T., Leach, K., Sexton, P.M., Christopoulos, A., 2007. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 1–51. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105159

McAllen, R.M., Pennington, G.L., McKinley, M.J., 1990. Osmoresponsive units in sheep median preoptic nucleus. *Am. J. Physiol.* 259, R593–600.

McIntire, W.E., MacCleery, G., Garrison, J.C., 2001. The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 15801–15809. doi:10.1074/jbc.M011233200

McKay, D.B., Thayer, M.M., Flaherty, K.M., Pley, H., Benvegna, D., 1992. Crystallographic structures of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Matrix Suppl* 1, 112–115.

McKinnie, S.M.K., Fischer, C., Tran, K.M.H., Wang, W., Mosquera, F., Oudit, G.Y., Vederas, J.C., 2016. The Metalloprotease Neprilysin Degrades and Inactivates Apelin Peptides. *Chembiochem* 17, 1495–1498. doi:10.1002/cbic.201600244

Medhurst, A.D., Jennings, C.A., Robbins, M.J., Davis, R.P., Ellis, C., Winborn, K.Y., Lawrie, K.W.M., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J.E., Herrity, N.C., Murdock, P., Darker, J.G., 2003. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J. Neurochem.* 84, 1162–1172.

Medina, J.F., Wetterholm, A., Rådmark, O., Shapiro, R., Haeggström, J.Z., Vallee, B.L., Samuelsson, B., 1991. Leukotriene A4 hydrolase: determination of the three zinc-binding ligands by site-directed mutagenesis and zinc analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7620–7624.

Meinzel, T., Blanquet, S., Dardel, F., 1996. A new subclass of the zinc metalloproteases superfamily revealed by the solution structure of peptide deformylase. *J. Mol. Biol.* 262, 375–386. doi:10.1006/jmbi.1996.0521

Meinzel, T., Lazennec, C., Blanquet, S., 1995. Mapping of the active site zinc ligands of peptide deformylase. *J. Mol. Biol.* 254, 175–183. doi:10.1006/jmbi.1995.0609

Menani, J.V., Colombari, D.S., Beltz, T.G., Thunhorst, R.L., Johnson, A.K., 1998. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. *Brain Res.* 801, 29–35.

Ménard, J., Bouhnik, J., Clauser, E., Richoux, J.P., Corvol, P., 1983. Biochemistry and regulation of angiotensinogen. *Clin Exp Hypertens A* 5, 1005–1019.

Mendelsohn, F.A., 1984. Localization of angiotensin converting enzyme in rat forebrain and other tissues by in vitro autoradiography using 125I-labelled MK351A. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 11, 431–435.

Mendelsohn, F.A., Chai, S.Y., Dunbar, M., 1984. In vitro autoradiographic localization of angiotensin-converting enzyme in rat brain using 125I-labelled MK351A. *J Hypertens Suppl* 2, S41–44.

Mentzel, S., Dijkman, H.B., Van Son, J.P., Koene, R.A., Assmann, K.J., 1996. Organ distribution of aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV in normal mice. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 445–461.

Meyer, J.M., Felten, D.L., Weyhenmeyer, J.A., 1989. Levels of immunoreactive angiotensin II in microdissected nuclei from adult WKY and SH rat brain. *Clin Exp Hypertens A* 11, 103–117.

Migaud, M., Durieux, C., Viereck, J., Soroca-Lucas, E., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 1996. The in vivo metabolism of cholecystokinin (CCK-8) is essentially ensured by aminopeptidase A. *Peptides* 17, 601–607.

Millan, M.A., Jacobowitz, D.M., Aguilera, G., Catt, K.J., 1991. Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 11440–11444.

Minshall, R.D., Tiruppathi, C., Vogel, S.M., Malik, A.B., 2002. Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem. Cell Biol.* 117, 105–112. doi:10.1007/s00418-001-0367-x

Modgil, A., Guo, L., O'Rourke, S.T., Sun, C., 2013. Apelin-13 inhibits large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in cerebral artery smooth muscle cells via a PI3-kinase dependent mechanism. *PLoS ONE* 8, e83051. doi:10.1371/journal.pone.0083051

Monzingo, A.F., Matthews, B.W., 1984. Binding of N-carboxymethyl dipeptide inhibitors to thermolysin determined by X-ray crystallography: a novel class of transition-state analogues for zinc peptidases. *Biochemistry* 23, 5724–5729.

Morgenthaler, N.G., Struck, J., Jochberger, S., Dünser, M.W., 2008. Copeptin: clinical use of a new biomarker. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 43–49. doi:10.1016/j.tem.2007.11.001

Morris, B.J., Reid, I.A., 1978. The distribution of angiotensinogen in dog brain studied by cell fractionation. *Endocrinology* 103, 492–500. doi:10.1210/endo-103-2-492

Murayama, T., Ui, M., 1985. Receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase and stimulation of arachidonic acid release in 3T3 fibroblasts. Selective susceptibility to islet-activating protein, pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 260, 7226–7233.

Murza, A., Belleville, K., Longpré, J.-M., Sarret, P., Marsault, É., 2014. Stability and degradation patterns of chemically modified analogs of apelin-13 in plasma and cerebrospinal fluid. *Biopolymers* 102, 297–303. doi:10.1002/bip.22498

Murza, A., Besserer-Offroy, É., Côté, J., Bérubé, P., Longpré, J.-M., Dumaine, R., Lesur, O., Auger-Messier, M., Leduc, R., Sarret, P., Marsault, É., 2015. C-Terminal modifications of apelin-13 significantly change ligand binding, receptor signaling, and hypotensive action. *J. Med. Chem.* 58, 2431–2440. doi:10.1021/jm501916k

Murza, A., Parent, A., Besserer-Offroy, E., Tremblay, H., Karadereye, F., Beaudet, N., Leduc, R., Sarret, P., Marsault, É., 2012. Elucidation of the structure-activity relationships of apelin: influence of unnatural amino acids on binding, signaling, and plasma stability. *ChemMedChem* 7, 318–325. doi:10.1002/cmdc.201100492

Murza, A., Sainsily, X., Coquerel, D., Côté, J., Marx, P., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.-M., Lainé, J., Reversade, B., Salvail, D., Leduc, R., Dumaine, R., Lesur, O., Auger-Messier, M., Sarret,

P., Marsault, É., 2016. Discovery and Structure-Activity Relationship of a Bioactive Fragment of ELABELA that Modulates Vascular and Cardiac Functions. *J. Med. Chem.* 59, 2962–2972. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01549

Murza, A., Sainsily, X., Côté, J., Bruneau-Cossette, L., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.-M., Leduc, R., Dumaine, R., Lesur, O., Auger-Messier, M., Sarret, P., Marsault, É., 2017. Structure-activity relationship of novel macrocyclic biased apelin receptor agonists. *Org. Biomol. Chem.* 15, 449–458. doi:10.1039/c6ob02247b

Nagano, K., Ishida, J., Unno, M., Matsukura, T., Fukamizu, A., 2013. Apelin elevates blood pressure in ICR mice with L-NAME-induced endothelial dysfunction. *Mol Med Rep* 7, 1371–1375. doi:10.3892/mmr.2013.1378

Nagata, S., Kato, J., Sasaki, K., Minamino, N., Eto, T., Kitamura, K., 2006. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 1026–1031. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.146

Nagatsu, I., Nagatsu, T., Yamamoto, T., Glenner, G.G., Mehl, J.W., 1970. Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 198, 255–270.

Nakagawa, T., Akaki, J., Satou, R., Takaya, M., Iwata, H., Katsurada, A., Nishiuchi, K., Ohmura, Y., Suzuki, F., Nakamura, Y., 2007. The His-Pro-Phe motif of angiotensinogen is a crucial determinant of the substrate specificity of renin. *Biol. Chem.* 388, 237–246. doi:10.1515/BC.2007.026

Nakamura, T., Yamazato, M., Ishida, A., Ohya, Y., 2017. Excess of Aminopeptidase A in the Brain Elevates Blood Pressure via the Angiotensin II Type 1 and Bradykinin B2 Receptors without Dipsogenic Effect. *Int J Hypertens* 2017, 3967595. doi:10.1155/2017/3967595

Nambi, P., Peters, J.R., Sibley, D.R., Lefkowitz, R.J., 1985. Desensitization of the turkey erythrocyte beta-adrenergic receptor in a cell-free system. Evidence that multiple protein kinases can phosphorylate and desensitize the receptor. *J. Biol. Chem.* 260, 2165–2171.

Nanus, D.M., Engelstein, D., Gastl, G.A., Gluck, L., Vidal, M.J., Morrison, M., Finstad, C.L., Bander, N.H., Albino, A.P., 1993. Molecular cloning of the human kidney differentiation antigen gp160: human aminopeptidase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7069–7073.

Narayanan, S., Maitra, R., Deschamps, J.R., Bortoff, K., Thomas, J.B., Zhang, Y., Warner, K., Vasukuttan, V., Decker, A., Runyon, S.P., 2016. Discovery of a novel small molecule agonist scaffold for the APJ receptor. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 3758–3770. doi:10.1016/j.bmc.2016.06.018

Natesh, R., Schwager, S.L.U., Sturrock, E.D., Acharya, K.R., 2003. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* 421, 551–554. doi:10.1038/nature01370

Nielsen, S., Chou, C.L., Marples, D., Christensen, E.I., Kishore, B.K., Knepper, M.A., 1995. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation

of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1013–1017.

Nishimura, M., Ohtsuka, K., Sakamoto, M., Nanbu, A., Takahashi, H., Yoshimura, M., 1998. Roles of brain angiotensin II and C-type natriuretic peptide in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension in rats. *J. Hypertens.* 16, 1175–1185.

Noble, F., Banisadr, G., Jardinaud, F., Popovici, T., Lai-Kuen, R., Chen, H., Bischoff, L., Parsadaniantz, S.M., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 2001. First discrete autoradiographic distribution of aminopeptidase N in various structures of rat brain and spinal cord using the selective iodinated inhibitor [125I]RB 129. *Neuroscience* 105, 479–488.

Nohara, S., Kato, K., Fujiwara, D., Sakuragi, N., Yanagihara, K., Iwanuma, Y., Kajiyama, Y., 2016. Aminopeptidase N (APN/CD13) as a target molecule for scirrrous gastric cancer. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 40, 494–503. doi:10.1016/j.clinre.2015.11.003

Ocain, T.D., Rich, D.H., 1988. Synthesis of sulfur-containing analogues of bestatin. Inhibition of aminopeptidases by alpha-thiolbestatin analogues. *J. Med. Chem.* 31, 2193–2199.

Ocain, T.D., Rich, D.H., 1987. L-lysine-thiol: a subnanomolar inhibitor of aminopeptidase B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 1038–1042.

O'Carroll, A.-M., Lolait, S.J., 2003. Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli. *J. Neuroendocrinol.* 15, 661–666.

O'Carroll, A.M., Selby, T.L., Palkovits, M., Lolait, S.J., 2000. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 72–80.

O'Dowd, B.F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H.H., Tsui, L.C., Kennedy, J.L., Shi, X., Petronis, A., George, S.R., Nguyen, T., 1993. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136, 355–360.

Oefner, C., D'Arcy, A., Hennig, M., Winkler, F.K., Dale, G.E., 2000. Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J. Mol. Biol.* 296, 341–349. doi:10.1006/jmbi.1999.3492

Ofner, L.D., Hooper, N.M., 2002. The C-terminal domain, but not the interchain disulphide, is required for the activity and intracellular trafficking of aminopeptidase A. *Biochem. J.* 362, 191–197.

Ogawa, Y., Ohnishi, A., Goto, Y., Sakuma, Y., Watanabe, J., Hattori, A., Tsujimoto, M., 2014. Role of glutamine-169 in the substrate recognition of human aminopeptidase B. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1872–1881. doi:10.1016/j.bbagen.2014.01.002

Ohnishi, A., Watanabe, J., Ogawa, Y., Goto, Y., Hattori, A., Tsujimoto, M., 2015. Involvement of Phenylalanine 297 in the Construction of the Substrate Pocket of Human Aminopeptidase B. *Biochemistry* 54, 6062–6070. doi:10.1021/acs.biochem.5b00964

Okamoto, K., Aoki, K., 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 27, 282–293.

Okuyama, T., Ishiura, S., Nojima, M., Tsukahara, T., Yanagida, M., Sugita, H., 1991. Amino peptidase A in human placenta and pregnant serum. *Clin. Chim. Acta* 196, 207–215.

Oldham, W.M., Hamm, H.E., 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 60–71. doi:10.1038/nrm2299

Ollis, W.D., East, A.J., 1964. The constitution of actinonin. Structural and synthetic studies. Presented at the I.A.M symposia on microbiology. Chemistry of microbial product. The microbial research foundation, Tokyo.

Olsen, J., Cowell, G.M., Kønigshøfer, E., Danielsen, E.M., Møller, J., Laustsen, L., Hansen, O.C., Welinder, K.G., Engberg, J., Hunziker, W., 1988. Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett.* 238, 307–314.

Olson, C.K., Binkley, F., 1950. Metabolism of glutathione. III. Enzymatic hydrolysis of cysteinylglycine. *J. Biol. Chem.* 186, 731–735.

Oparil, S., 2007. Renin inhibitors in the management of hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9, 706–707.

Ostrowski, N.L., Lolait, S.J., Bradley, D.J., O'Carroll, A.M., Brownstein, M.J., Young, W.S., 1992. Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology* 131, 533–535. doi:10.1210/endo.131.1.1535312

Palin, K., Moreau, M.L., Orcel, H., Duvoid-Guillou, A., Rabié, A., Kelley, K.W., Moos, F., 2009. Age-impaired fluid homeostasis depends on the balance of IL-6/IGF-I in the rat supraoptic nuclei. *Neurobiol. Aging* 30, 1677–1692. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.006

Palin, Karine, Moreau, M.L., Sauvant, J., Orcel, H., Nadjar, A., Duvoid-Guillou, A., Dudit, J., Rabié, A., Moos, F., 2009. Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1289–1299. doi:10.1152/ajpendo.90489.2008

Palmieri, F.E., Bausback, H.H., Ward, P.E., 1989. Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. *Biochem. Pharmacol.* 38, 173–180.

Pardridge, W.M., 2007. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* 12, 54–61. doi:10.1016/j.drudis.2006.10.013

Pasqualini, R., Koivunen, E., Ruoslahti, E., 1995. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* 130, 1189–1196.

Paul, M., Printz, M.P., Harms, E., Unger, T., Lang, R.E., Ganten, D., 1985. Localization of renin (EC 3.4.23) and converting enzyme (EC 3.4.15.1) in nerve endings of rat brain. *Brain Res.* 334, 315–324.

Pelogeckina, Y.A., Konovalova, G.G., Pisarenko, O.I., Lankin, V.Z., 2015. Antioxidant Action of Apelin-12 Peptide and Its Structural Analog In Vitro. *Bull. Exp. Biol. Med.* 159, 604–606. doi:10.1007/s10517-015-3024-4

Petrović, S., Vitale, L., 1990. Purification and properties of glutamyl aminopeptidase from chicken egg-white. *Comp. Biochem. Physiol., B* 95, 589–595.

Pham, V.-L., 2007. Aminopeptidase B : modélisation moléculaire et étude du site actif par mutagenèse dirigée. Paris 6.

Pham, V.-L., Cadel, M.-S., Gouzy-Darmon, C., Hanquez, C., Beinfeld, M.C., Nicolas, P., Etchebest, C., Foulon, T., 2007. Aminopeptidase B, a glucagon-processing enzyme: site directed mutagenesis of the Zn²⁺-binding motif and molecular modelling. *BMC Biochem.* 8, 21. doi:10.1186/1471-2091-8-21

Pham, V.-L., Gouzy-Darmon, C., Pernier, J., Hanquez, C., Hook, V., Beinfeld, M.C., Nicolas, P., Etchebest, C., Foulon, T., Cadel, S., 2011. Mutation in the substrate-binding site of aminopeptidase B confers new enzymatic properties. *Biochimie* 93, 730–741. doi:10.1016/j.biochi.2010.12.015

Phillips, M.I., 1987. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 49, 413–435. doi:10.1146/annurev.ph.49.030187.002213

Phillips, M.I., Kimura, B., 1988. Brain angiotensin in the developing spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens.* 6, 607–612.

Phillips, P.A., Rolls, B.J., Ledingham, J.G., Forsling, M.L., Morton, J.J., Crowe, M.J., Wollner, L., 1984. Reduced thirst after water deprivation in healthy elderly men. *N. Engl. J. Med.* 311, 753–759. doi:10.1056/NEJM198409203111202

Pickel, V.M., Chan, J., Ganten, D., 1986. Dual peroxidase and colloidal gold-labeling study of angiotensin converting enzyme and angiotensin-like immunoreactivity in the rat subfornical organ. *J. Neurosci.* 6, 2457–2469.

Piesse, C., Tymms, M., Garrafa, E., Gouzy, C., Lacasa, M., Cadel, S., Cohen, P., Foulon, T., 2002. Human aminopeptidase B (rnpep) on chromosome 1q32.2: complementary DNA, genomic structure and expression. *Gene* 292, 129–140.

Pisarenko, O.I., Shulzhenko, V.S., Pelogeckina, Y.A., Studneva, I.M., 2015. Enhancement of crystalloid cardioplegic protection by structural analogs of apelin-12. *J. Surg. Res.* 194, 18–24. doi:10.1016/j.jss.2014.11.007

Pope, G.R., Roberts, E.M., Lolait, S.J., O'Carroll, A.-M., 2012. Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides* 33, 139–148. doi:10.1016/j.peptides.2011.12.005

Poulain, D.A., Wakerley, J.B., Dyball, R.E., 1977. Electrophysiological differentiation of oxytocin- and vasopressin-secreting neurones. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 196, 367–384.

Preininger, A.M., Hamm, H.E., 2004. G protein signaling: insights from new structures. *Sci.*

STKE 2004, re3. doi:10.1126/stke.2182004re3

Preininger, A.M., Van Eps, N., Yu, N.-J., Medkova, M., Hubbell, W.L., Hamm, H.E., 2003. The myristoylated amino terminus of Galpha(i)(1) plays a critical role in the structure and function of Galpha(i)(1) subunits in solution. *Biochemistry* 42, 7931–7941. doi:10.1021/bi0345438

Premont, R.T., Gainetdinov, R.R., 2007. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 511–534. doi:10.1146/annurev.physiol.69.022405.154731

Raizada, M.K., Lu, D., Tang, W., Kurian, P., Sumners, C., 1993. Increased angiotensin II type-1 receptor gene expression in neuronal cultures from spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 132, 1715–1722. doi:10.1210/endo.132.4.8462471

Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F.X., Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383–387. doi:10.1038/nature06325

Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T.A., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., Kobilka, B.K., 2011. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549–555. doi:10.1038/nature10361

Rastaldo, R., Cappello, S., Folino, A., Losano, G., 2011. Effect of apelin-apelin receptor system in postischaemic myocardial protection: a pharmacological postconditioning tool? *Antioxid. Redox Signal.* 14, 909–922. doi:10.1089/ars.2010.3355

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1995. Evolutionary families of metallopeptidases. *Meth. Enzymol.* 248, 183–228.

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290 (Pt 1), 205–218.

Ray, K., Hines, C.S., Coll-Rodriguez, J., Rodgers, D.W., 2004. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. *J. Biol. Chem.* 279, 20480–20489. doi:10.1074/jbc.M400795200

Read, C., Fitzpatrick, C.M., Yang, P., Kuc, R.E., Maguire, J.J., Glen, R.C., Foster, R.E., Davenport, A.P., 2016. Cardiac action of the first G protein biased small molecule apelin agonist. *Biochem. Pharmacol.* 116, 63–72. doi:10.1016/j.bcp.2016.07.018

Reaux, A., De Mota, N., Skultetyova, I., Lenkei, Z., El Messari, S., Gallatz, K., Corvol, P., Palkovits, M., Llorens-Cortès, C., 2001. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.* 77, 1085–1096.

Réaux, A., de Mota, N., Zini, S., Cadel, S., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Corvol, P., Llorens-Cortès, C., 1999. PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin

release by increasing the half-life of brain angiotensin III. *Neuroendocrinology* 69, 370–376. doi:54439

Reaux, A., Fournie-Zaluski, M.C., David, C., Zini, S., Roques, B.P., Corvol, P., Llorens-Cortes, C., 1999. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13415–13420.

Reaux, A., Gallatz, K., Palkovits, M., Llorens-Cortes, C., 2002. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 113, 653–662.

Reaux-Le Goazigo, A., Morinville, A., Burlet, A., Llorens-Cortes, C., Beaudet, A., 2004. Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* 145, 4392–4400. doi:10.1210/en.2004-0384

Reverter, D., Maskos, K., Tan, F., Skidgel, R.A., Bode, W., 2004. Crystal structure of human carboxypeptidase M, a membrane-bound enzyme that regulates peptide hormone activity. *J. Mol. Biol.* 338, 257–269. doi:10.1016/j.jmb.2004.02.058

Richoux, J.P., Bouhnik, J., Clauser, E., Corvol, P., 1988. The renin-angiotensin system in the rat brain. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in glial cells and neurons. *Histochemistry* 89, 323–331.

Robien, M.A., Nguyen, K.T., Kumar, A., Hirsh, I., Turley, S., Pei, D., Hol, W.G.J., 2004. An improved crystal form of *Plasmodium falciparum* peptide deformylase. *Protein Sci.* 13, 1155–1163. doi:10.1110/ps.03456404

Roman, L.M., Hubbard, A.L., 1984a. A domain-specific marker for the hepatocyte plasma membrane. II. Ultrastructural localization of leucine aminopeptidase to the bile canalicular domain of isolated rat liver plasma membranes. *J. Cell Biol.* 98, 1488–1496.

Roman, L.M., Hubbard, A.L., 1984b. A domain-specific marker for the hepatocyte plasma membrane. III. Isolation of bile canalicular membrane by immunoadsorption. *J. Cell Biol.* 98, 1497–1504.

Ronquist, G., 1988. Zinc ion stimulation of ATP cleavage by prostasomes from human seminal plasma. *Urol. Int.* 43, 334–340.

Roques, B.P., Fournie-Zaluski, M.C., 1986. Enkephalin degrading enzyme inhibitors: a physiological way to new analgesics and psychoactive agents. *NIDA Res. Monogr.* 70, 128–154.

Ross, E.M., Gilman, A.G., 1977. Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase activity: interactions of solubilized components with receptor-replete membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 3715–3719.

Rozenfeld, R., Iturrioz, X., Maigret, B., Llorens-Cortes, C., 2002. Contribution of molecular modeling and site-directed mutagenesis to the identification of two structural residues, Arg-220 and Asp-227, in aminopeptidase A. *J. Biol. Chem.* 277, 29242–29252.

doi:10.1074/jbc.M204406200

Rozenfeld, R., Iturrioz, X., Okada, M., Maigret, B., Llorens-Cortes, C., 2003. Contribution of molecular modeling and site-directed mutagenesis to the identification of a new residue, glutamate 215, involved in the exopeptidase specificity of aminopeptidase A. *Biochemistry* 42, 14785–14793. doi:10.1021/bi034358u

Rozenfeld, R., Muller, L., El Messari, S., Llorens-Cortes, C., 2004. The C-terminal domain of aminopeptidase A is an intramolecular chaperone required for the correct folding, cell surface expression, and activity of this monozinc aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 279, 43285–43295. doi:10.1074/jbc.M404369200

Rudberg, P.C., Tholander, F., Thunnissen, M.M.G.M., Haeggström, J.Z., 2002. Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase. Glutamate 271 is a catalytic residue with specific roles in two distinct enzyme mechanisms. *J. Biol. Chem.* 277, 1398–1404. doi:10.1074/jbc.M106577200

Ryan, M.C., Shen, P.J., Gundlach, A.L., 1997. Angiotensinogen and natriuretic peptide mRNAs in rat brain: localization and differential regulation by adrenal steroids in hypothalamus. *Peptides* 18, 495–504.

Saavedra, J.M., 1992. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr. Rev.* 13, 329–380. doi:10.1210/edrv-13-2-329

Salcedo, A., Garijo, J., Monge, L., Fernández, N., Luis García-Villalón, A., Sánchez Turrión, V., Cuervas-Mons, V., Diéguez, G., 2007. Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids. *Regul. Pept.* 144, 50–55. doi:10.1016/j.regpep.2007.06.005

Sands, J.M., Naruse, M., Baum, M., Jo, I., Hebert, S.C., Brown, E.M., Harris, H.W., 1997. Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J. Clin. Invest.* 99, 1399–1405. doi:10.1172/JCI119299

Santoro, A., Rimassa, L., Sobrero, A.F., Citterio, G., Sclafani, F., Carnaghi, C., Pessino, A., Caprioni, F., Andretta, V., Tronconi, M.C., Finocchiaro, G., Rossoni, G., Zanoni, A., Miggiano, C., Rizzardi, G.-P., Traversari, C., Caligaris-Cappio, F., Lambiase, A., Bordignon, C., 2010. Phase II study of NGR-hTNF, a selective vascular targeting agent, in patients with metastatic colorectal cancer after failure of standard therapy. *Eur. J. Cancer* 46, 2746–2752. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.012

Sanz, B., Perez, I., Beitia, M., Errarte, P., Fernández, A., Blanco, L., Estalella, I., Loizate, A., Irazusta, J., López, J.I., Larrinaga, G., 2015. Aminopeptidase N activity predicts 5-year survival in colorectal cancer patients. *J. Investig. Med.* 63, 740–746. doi:10.1097/JIM.0000000000000199

Sauvant, J., Delpech, J.-C., Palin, K., De Mota, N., Dudit, J., Aubert, A., Orcel, H., Roux, P., Layé, S., Moos, F., Llorens-Cortes, C., Nadjar, A., 2014. Mechanisms involved in dual vasopressin/apelin neuron dysfunction during aging. *PLoS ONE* 9, e87421. doi:10.1371/journal.pone.0087421

Schelling, P., Meyer, D., Loos, H.E., Speck, G., Phillips, M.I., Johnson, A.K., Ganten, D., 1982. A micromethod for the measurement of renin in brain nuclei: its application in spontaneously hypertensive rats. *Neuropharmacology* 21, 455–463.

Scherberich, J.E., Wiemer, J., Herzig, C., Fischer, P., Schoeppe, W., 1990. Isolation and partial characterization of angiotensinase A and aminopeptidase M from urine and human kidney by lectin affinity chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 521, 279–289.

Schiöth, H.B., Fredriksson, R., 2005. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 94–101. doi:10.1016/j.ygcen.2004.12.018

Schmidt, C.J., Thomas, T.C., Levine, M.A., Neer, E.J., 1992. Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J. Biol. Chem.* 267, 13807–13810.

Schnabel, R., Bernstein, H.G., Lupp, H., Lojda, Z., Barth, A., 1992. Aminopeptidases in the circumventricular organs of the mouse brain: a histochemical study. *Neuroscience* 47, 431–438.

Schulz, H., Dale, G.E., Karimi-Nejad, Y., Oefner, C., 2009. Structure of human endothelin-converting enzyme 1 complexed with phosphoramidon. *J. Mol. Biol.* 385, 178–187. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.052

Serpooshan, V., Sivanesan, S., Huang, X., Mahmoudi, M., Malkovskiy, A.V., Zhao, M., Inayathullah, M., Wagh, D., Zhang, X.J., Metzler, S., Bernstein, D., Wu, J.C., Ruiz-Lozano, P., Rajadas, J., 2015. [Pyr1]-Apelin-13 delivery via nano-liposomal encapsulation attenuates pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Biomaterials* 37, 289–298. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.08.045

Seyedabadi, M., Goodchild, A.K., Pilowsky, P.M., 2002. Site-specific effects of apelin-13 in the rat medulla oblongata on arterial pressure and respiration. *Auton Neurosci* 101, 32–38.

Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., 2003. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.* 375, 503–515. doi:10.1042/BJ20031076

Shi, L., Javitch, J.A., 2004. The second extracellular loop of the dopamine D2 receptor lines the binding-site crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 440–445. doi:10.1073/pnas.2237265100

Shimada, K., Takahashi, M., Turner, A.J., Tanzawa, K., 1996. Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* 315 (Pt 3), 863–867.

Shimamura, M., Hazato, T., Hachisu, M., Katayama, T., 1984. Inhibition of a membrane-bound enkephalin-degrading aminopeptidase by bestatin analogs. *J. Neurochem.* 43, 888–890.

Shimizu, T., Rådmark, O., Samuelsson, B., 1984. Enzyme with dual lipoxygenase activities

catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 689–693.

Shin, K., Pandey, A., Liu, X.-Q., Anini, Y., Rainey, J.K., 2013. Preferential apelin-13 production by the proprotein convertase PCSK3 is implicated in obesity. *FEBS Open Bio* 3, 328–333. doi:10.1016/j.fob.2013.08.001

Shukla, A.K., Manglik, A., Kruse, A.C., Xiao, K., Reis, R.I., Tseng, W.-C., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.-Y., Paduch, M., Tripathi-Shukla, P., Koide, A., Koide, S., Weis, W.I., Kossiakoff, A.A., Kobilka, B.K., Lefkowitz, R.J., 2013. Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497, 137–141. doi:10.1038/nature12120

Sica, D.A., 2005. Hyponatremia and heart failure--pathophysiology and implications. *Congest Heart Fail* 11, 274–277.

Siddiquee, K., Hampton, J., McAnally, D., May, L., Smith, L., 2013. The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 168, 1104–1117. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02192.x

Sidorova, M.V., Az'muko, A.A., Pal'keeva, M.E., Molokoedov, A.S., Bushuev, V.N., Dvoriansev, S.N., Shul'zhenko, V.S., Pelogeikina, V.S., Pisarenko, O.I., Bessalova, Z.D., 2012. [Synthesis and cardioprotective properties of apelin-12 and its structural analogs]. *Bioorg. Khim.* 38, 40–51.

Silvaggi, N.R., Anderson, J.W., Brinsmade, S.R., Pratt, R.F., Kelly, J.A., 2003. The crystal structure of phosphonate-inhibited D-Ala-D-Ala peptidase reveals an analogue of a tetrahedral transition state. *Biochemistry* 42, 1199–1208. doi:10.1021/bi0268955

Simon, M.I., Strathmann, M.P., Gautam, N., 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802–808.

Siu, F.Y., He, M., de Graaf, C., Han, G.W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, J.S., Liu, W., Lau, J., Cherezov, V., Katritch, V., Wang, M.-W., Stevens, R.C., 2013. Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* 499, 444–449. doi:10.1038/nature12393

Sladek, C.D., Olschowka, J.A., 1994. Dehydration induces Fos, but not increased vasopressin mRNA in the supraoptic nucleus of aged rats. *Brain Res.* 652, 207–215.

Slater, E.E., Defendini, R., Zimmerman, E.A., 1980. Wide distribution of immunoreactive renin in nerve cells of human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5458–5460.

Solhonne, B., Gros, C., Pollard, H., Schwartz, J.C., 1987. Major localization of aminopeptidase M in rat brain microvessels. *Neuroscience* 22, 225–232.

Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E., Sigler, P.B., 1996. Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379, 369–374. doi:10.1038/379369a0

Song, K., Kurobe, Y., Kanehara, H., Okunishi, H., Wada, T., Inada, Y., Nishikawa, K., Miyazaki, M., 1994. Quantitative localization of angiotensin II receptor subtypes in spontaneously

hypertensive rats. *Blood Press Suppl* 5, 21–26.

Song, L., Wilk, E., Wilk, S., Healy, D.P., 1993. Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. I. Association with cerebral microvessels. *Brain Res.* 606, 286–294.

Song, L., Wilk, S., Healy, D.P., 1997. Aminopeptidase A antiserum inhibits intracerebroventricular angiotensin II-induced dipsogenic and pressor responses. *Brain Res.* 744, 1–6.

Song, L., Ye, M., Troyanovskaya, M., Wilk, E., Wilk, S., Healy, D.P., 1994. Rat kidney glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A): molecular identity and cellular localization. *Am. J. Physiol.* 267, F546-557.

Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., Journot, L., 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365, 170–175. doi:10.1038/365170a0

Stefanovic, V., Vlahovic, P., Ardaillou, N., Ardaillou, R., 1991. Receptor-mediated induction of aminopeptidase A (APA) of human glomerular epithelial cells (HGEC) by glucocorticoids. *FEBS Lett.* 294, 171–174.

Stornetta, R.L., Hawelu-Johnson, C.L., Guyenet, P.G., Lynch, K.R., 1988. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* 242, 1444–1446.

Stragier, B., Demaegdt, H., De Bundel, D., Smolders, I., Sarre, S., Vauquelin, G., Ebinger, G., Michotte, Y., Vanderheyden, P., 2007. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase and/or aminopeptidase N in the angiotensin IV-induced effect on dopamine release in the striatum of the rat. *Brain Res.* 1131, 97–105. doi:10.1016/j.brainres.2006.11.010

Strathmann, M.P., Simon, M.I., 1991. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5582–5586.

Strittmatter, S.M., Lo, M.M., Javitch, J.A., Snyder, S.H., 1984. Autoradiographic visualization of angiotensin-converting enzyme in rat brain with [3H]captopril: localization to a striatonigral pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1599–1603.

Sun, B., Bachhawat, P., Chu, M.L.-H., Wood, M., Ceska, T., Sands, Z.A., Mercier, J., Lebon, F., Kobilka, T.S., Kobilka, B.K., 2017. Crystal structure of the adenosine A2A receptor bound to an antagonist reveals a potential allosteric pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* doi:10.1073/pnas.1621423114

Sun, X., Iida, S., Yoshikawa, A., Senbonmatsu, R., Imanaka, K., Maruyama, K., Nishimura, S., Inagami, T., Senbonmatsu, T., 2011. Non-activated APJ suppresses the angiotensin II type 1 receptor, whereas apelin-activated APJ acts conversely. *Hypertens. Res.* 34, 701–706. doi:10.1038/hr.2011.19

Surendran, P., Drenos, F., Young, R., Warren, H., Cook, J.P., Manning, A.K., Grarup, N., Sim, X., Barnes, D.R., Witkowska, K., Staley, J.R., Tragante, V., Tukiainen, T., Yaghootkar, H., Masca, N.,

Freitag, D.F., Ferreira, T., Giannakopoulou, O., Tinker, A., Harakalova, M., Mihailov, E., Liu, C., Kraja, A.T., Nielsen, S.F., Rasheed, A., Samuel, M., Zhao, W., Bonnycastle, L.L., Jackson, A.U., Narisu, N., Swift, A.J., Southam, L., Marten, J., Huyghe, J.R., Stančáková, A., Fava, C., Ohlsson, T., Matchan, A., Stirrups, K.E., Bork-Jensen, J., Gjesing, A.P., Kontto, J., Perola, M., Shaw-Hawkins, S., Havulinna, A.S., Zhang, H., Donnelly, L.A., Groves, C.J., Rayner, N.W., Neville, M.J., Robertson, N.R., Yiorkas, A.M., Herzig, K.-H., Kajantie, E., Zhang, W., Willems, S.M., Lannfelt, L., Malerba, G., Soranzo, N., Trabetti, E., Verweij, N., Evangelou, E., Moayyeri, A., Vergnaud, A.-C., Nelson, C.P., Poveda, A., Varga, T.V., Caslake, M., de Craen, A.J.M., Trompet, S., Luan, J., 'an, Scott, R.A., Harris, S.E., Liewald, D.C.M., Marioni, R., Menni, C., Farmaki, A.-E., Hallmans, G., Renström, F., Huffman, J.E., Hassinen, M., Burgess, S., Vasan, R.S., Felix, J.F., CHARGE-Heart Failure Consortium, Uria-Nickelsen, M., Malarstig, A., Reilly, D.F., Hoek, M., Vogt, T.F., Lin, H., Lieb, W., EchoGen Consortium, Traylor, M., Markus, H.S., METASTROKE Consortium, Highland, H.M., Justice, A.E., Marouli, E., GIANT Consortium, Lindström, J., Uusitupa, M., Komulainen, P., Lakka, T.A., Rauramaa, R., Polasek, O., Rudan, I., Rolandsson, O., Franks, P.W., Dedoussis, G., Spector, T.D., EPIC-InterAct Consortium, Jousilahti, P., Männistö, S., Deary, I.J., Starr, J.M., Langenberg, C., Wareham, N.J., Brown, M.J., Dominiczak, A.F., Connell, J.M., Jukema, J.W., Sattar, N., Ford, I., Packard, C.J., Esko, T., Mägi, R., Metspalu, A., de Boer, R.A., van der Meer, P., van der Harst, P., Lifelines Cohort Study, Gambaro, G., Ingelsson, E., Lind, L., de Bakker, P.I.W., Numans, M.E., Brandslund, I., Christensen, C., Petersen, E.R.B., Korpi-Hyövälti, E., Oksa, H., Chambers, J.C., Kooner, J.S., Blakemore, A.I.F., Franks, S., Jarvelin, M.-R., Husemoen, L.L., Linneberg, A., Skaaby, T., Thuesen, B., Karpe, F., Tuomilehto, J., Doney, A.S.F., Morris, A.D., Palmer, C.N.A., Holmen, O.L., Hveem, K., Willer, C.J., Tuomi, T., Groop, L., Käräjämäki, A., Palotie, A., Ripatti, S., Salomaa, V., Alam, D.S., Majumder, A.A.S., Di Angelantonio, E., Chowdhury, R., McCarthy, M.I., Poulter, N., Stanton, A.V., Sever, P., Amouyel, P., Arveiler, D., Blankenberg, S., Ferrières, J., Kee, F., Kuulasmaa, K., Müller-Nurasyid, M., Veronesi, G., Virtamo, J., Deloukas, P., Wellcome Trust Case Control Consortium, Elliott, P., Understanding Society Scientific Group, Zeggini, E., Kathiresan, S., Melander, O., Kuusisto, J., Laakso, M., Padmanabhan, S., Porteous, D.J., Hayward, C., Scotland, G., Collins, F.S., Mohlke, K.L., Hansen, T., Pedersen, O., Boehnke, M., Stringham, H.M., EPIC-CVD Consortium, Frossard, P., Newton-Cheh, C., CHARGE+ Exome Chip Blood Pressure Consortium, Tobin, M.D., Nordestgaard, B.G., T2D-GENES Consortium, GoT2DGenes Consortium, ExomeBP Consortium, CHD Exome+ Consortium, Caulfield, M.J., Mahajan, A., Morris, A.P., Tomaszewski, M., Samani, N.J., Saleheen, D., Asselbergs, F.W., Lindgren, C.M., Danesh, J., Wain, L.V., Butterworth, A.S., Howson, J.M.M., Munroe, P.B., 2016. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. *Nat. Genet.* 48, 1151–1161. doi:10.1038/ng.3654

Suzuki, N., Hajicek, N., Kozasa, T., 2009. Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neurosignals* 17, 55–70. doi:10.1159/000186690

Szokodi, I., Tavi, P., Földes, G., Voutilainen-Myllylä, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piuhola, J., Rysä, J., Tóth, M., Ruskoaho, H., 2002. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ. Res.* 91, 434–440.

Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., Fujino, M., 1998. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 471–476. doi:10.1006/bbrc.1998.9489

Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M.X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., Fujimiya, M., 2001. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul. Pept.* 99, 87–92.

Terwel, D., ten Haaf, J.A., Markerink, M., Jolles, J., 1992. Changes in plasma vasopressin concentration and plasma osmolality in relation to age and time of day in the male Wistar rat. *Acta Endocrinol.* 126, 357–362.

Thomsen, A.R.B., Plouffe, B., Cahill, T.J., Shukla, A.K., Tarrasch, J.T., Dosey, A.M., Kahsai, A.W., Strachan, R.T., Pani, B., Mahoney, J.P., Huang, L., Breton, B., Heydenreich, F.M., Sunahara, R.K., Skiniotis, G., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J., 2016. GPCR-G Protein- β -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* 166, 907–919. doi:10.1016/j.cell.2016.07.004

Thorsett, E., Wyvratt, M., 1987. inhibition of zinc peptidases that hydrolyses neuropeptides, in: *Neuropeptides and Their Peptidases*. AJ Turner, New York, pp. 229–292.

Thunnissen, M.M., Nordlund, P., Haeggström, J.Z., 2001. Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat. Struct. Biol.* 8, 131–135. doi:10.1038/84117

Tieku, S., Hooper, N.M., 1992. Inhibition of aminopeptidases N, A and W. A re-evaluation of the actions of bestatin and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1725–1730.

Timofeev, V.I., Kuznetsov, S.A., Akparov, V.K., Chestukhina, G.G., Kuranova, I.P., 2013. Three-dimensional structure of carboxypeptidase T from *Thermoactinomyces vulgaris* in complex with N-BOC-L-leucine. *Biochemistry Mosc.* 78, 252–259. doi:10.1134/S0006297913030061

Timper, K., Fenske, W., Kühn, F., Frech, N., Arici, B., Rutishauser, J., Kopp, P., Allolio, B., Stettler, C., Müller, B., Katan, M., Christ-Crain, M., 2015. Diagnostic Accuracy of Copeptin in the Differential Diagnosis of the Polyuria-polydipsia Syndrome: A Prospective Multicenter Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 2268–2274. doi:10.1210/jc.2014-4507

Titani, K., Hermodson, M.A., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Neurath, H., 1972. Amino-acid sequence of thermolysin. *Nature New Biol.* 238, 35–37.

Tobe, H., Kojima, F., Aoyagi, T., Umezawa, H., 1980. Purification by affinity chromatography using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 613, 459–468.

Tokioka-Terao, M., Hiwada, K., Kokubu, T., 1984. Purification and characterization of aminopeptidase N from human plasma. *Enzyme* 32, 65–75.

Tokuhara, T., Hattori, N., Ishida, H., Hirai, T., Higashiyama, M., Kodama, K., Miyake, M., 2006. Clinical significance of aminopeptidase N in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 3971–3978. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0338

Tonna, S., Dandapani, S.V., Uscinski, A., Appel, G.B., Schlöndorff, J.S., Zhang, K., Denker, B.M., Pollak, M.R., 2008. Functional genetic variation in aminopeptidase A (ENPEP): lack of clear

association with focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS). *Gene* 410, 44–52. doi:10.1016/j.gene.2007.11.014

Towler, P., Staker, B., Prasad, S.G., Menon, S., Tang, J., Parsons, T., Ryan, D., Fisher, M., Williams, D., Dales, N.A., Patane, M.A., Pantoliano, M.W., 2004. ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* 279, 17996–18007. doi:10.1074/jbc.M311191200

Trask, A.J., Jessup, J.A., Chappell, M.C., Ferrario, C.M., 2008. Angiotensin-(1-12) is an alternate substrate for angiotensin peptide production in the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2242-2247. doi:10.1152/ajpheart.00175.2008

Tronrud, D.E., Holden, H.M., Matthews, B.W., 1987. Structures of two thermolysin-inhibitor complexes that differ by a single hydrogen bond. *Science* 235, 571–574.

Tronrud, D.E., Monzingo, A.F., Matthews, B.W., 1986. Crystallographic structural analysis of phosphoramidates as inhibitors and transition-state analogs of thermolysin. *Eur. J. Biochem.* 157, 261–268.

Trojanovskaya, M., Jayaraman, G., Song, L., Healy, D.P., 2000. Aminopeptidase-A. I. CDNA cloning and expression and localization in rat tissues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R413-424.

Uchino, H., Kanai, Y., Kim, D.K., Wempe, M.F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M.W., Endou, H., 2002. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol. Pharmacol.* 61, 729–737.

Umezawa, H., 1976. Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. *Meth. Enzymol.* 45, 678–695.

Urso, C., Brucculeri, S., Caimi, G., 2015. Acid-base and electrolyte abnormalities in heart failure: pathophysiology and implications. *Heart Fail Rev* 20, 493–503. doi:10.1007/s10741-015-9482-y

Urwyler, S.A., Timper, K., Fenske, W., de Mota, N., Blanchard, A., Kühn, F., Frech, N., Arici, B., Rutishauser, J., Kopp, P., Stettler, C., Müller, B., Katan, M., Llorens-Cortes, C., Christ-Crain, M., 2016. Plasma Apelin Concentrations in Patients With Polyuria-Polydipsia Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1917–1923. doi:10.1210/jc.2016-1158

Vallee, B.L., Auld, D.S., 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29, 5647–5659.

Vazeux, G., Iturrioz, X., Corvol, P., Llorens-Cortes, C., 1998. A glutamate residue contributes to the exopeptidase specificity in aminopeptidase A. *Biochem. J.* 334 (Pt 2), 407–413.

Vazeux, G., Iturrioz, X., Corvol, P., Llorens-Cortès, C., 1997. A tyrosine residue essential for catalytic activity in aminopeptidase A. *Biochem. J.* 327 (Pt 3), 883–889.

Vazeux, G., Wang, J., Corvol, P., Llorens-Cortès, C., 1996. Identification of glutamate residues

essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A. *J. Biol. Chem.* 271, 9069–9074.

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, 185–194. doi:10.1038/nature11896

Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., Tummino, P., 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 277, 14838–14843. doi:10.1074/jbc.M200581200

Wacker, D., Wang, S., McCorvy, J.D., Betz, R.M., Venkatakrishnan, A.J., Levit, A., Lansu, K., Schools, Z.L., Che, T., Nichols, D.E., Shoichet, B.K., Dror, R.O., Roth, B.L., 2017. Crystal Structure of an LSD-Bound Human Serotonin Receptor. *Cell* 168, 377–389.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.12.033

Wang, C., Du, J.-F., Wu, F., Wang, H.-C., 2008. Apelin decreases the SR Ca²⁺ content but enhances the amplitude of [Ca²⁺]_i transient and contractions during twitches in isolated rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2540-2546. doi:10.1152/ajpheart.00046.2008

Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G.W., Huang, X.-P., Liu, W., Siu, F.Y., Roth, B.L., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2013. Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature* 497, 338–343. doi:10.1038/nature12167

Wang, J., Cooper, M.D., 1993. Histidine residue in the zinc-binding motif of aminopeptidase A is critical for enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1222–1226.

Wang, J., Walker, H., Lin, Q., Jenkins, N., Copeland, N.G., Watanabe, T., Burrows, P.D., Cooper, M.D., 1996. The mouse BP-1 gene: structure, chromosomal localization, and regulation of expression by type I interferons and interleukin-7. *Genomics* 33, 167–176. doi:10.1006/geno.1996.0180

Wang, L.H., Ahmad, S., Benter, I.F., Chow, A., Mizutani, S., Ward, P.E., 1991. Differential processing of substance P and neurokinin A by plasma dipeptidyl(amino)peptidase IV, aminopeptidase M and angiotensin converting enzyme. *Peptides* 12, 1357–1364.

Wang, L.-Y., Zhang, D.-L., Zheng, J.-F., Zhang, Y., Zhang, Q.-D., Liu, W.-H., 2011. Apelin-13 passes through the ADMA-damaged endothelial barrier and acts on vascular smooth muscle cells. *Peptides* 32, 2436–2443. doi:10.1016/j.peptides.2011.10.001

Wang, W., McKinnie, S.M.K., Farhan, M., Paul, M., McDonald, T., McLean, B., Llorens-Cortes, C., Hazra, S., Murray, A.G., Vederas, J.C., Oudit, G.Y., 2016. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: Physiological Effects in the Cardiovascular System. *Hypertension* 68, 365–377. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06892

Ward, P.E., Benter, I.F., Dick, L., Wilk, S., 1990. Metabolism of vasoactive peptides by plasma

and purified renal aminopeptidase M. *Biochem. Pharmacol.* 40, 1725–1732.

Watermeyer, J.M., Sewell, B.T., Schwager, S.L., Natesh, R., Corradi, H.R., Acharya, K.R., Sturrock, E.D., 2006. Structure of testis ACE glycosylation mutants and evidence for conserved domain movement. *Biochemistry* 45, 12654–12663. doi:10.1021/bi061146z

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10782–10787. doi:10.1073/pnas.1834556100

Wei, Q., Ran, T., Ma, C., He, J., Xu, D., Wang, W., 2016. Crystal Structure and Function of PqqF Protein in the Pyrroloquinoline Quinone Biosynthetic Pathway. *J. Biol. Chem.* 291, 15575–15587. doi:10.1074/jbc.M115.711226

Weissman, J.T., Ma, J.-N., Essex, A., Gao, Y., Burstein, E.S., 2004. G-protein-coupled receptor-mediated activation of rap GTPases: characterization of a novel Galphai regulated pathway. *Oncogene* 23, 241–249. doi:10.1038/sj.onc.1207014

Wetterholm, A., Medina, J.F., Rådmark, O., Shapiro, R., Haeggström, J.Z., Vallee, B.L., Samuelsson, B., 1992. Leukotriene A4 hydrolase: abrogation of the peptidase activity by mutation of glutamic acid-296. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 9141–9145.

Whitham, S.E., Murphy, G., Angel, P., Rahmsdorf, H.J., Smith, B.J., Lyons, A., Harris, T.J., Reynolds, J.J., Herrlich, P., Docherty, A.J., 1986. Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem. J.* 240, 913–916.

Wilk, S., Thurston, L.S., 1990. Inhibition of angiotensin III formation by thiol derivatives of acidic amino acids. *Neuropeptides* 16, 163–168.

Williams, T.A., Corvol, P., Soubrier, F., 1994. Identification of two active site residues in human angiotensin I-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 269, 29430–29434.

Wilson, K.M., Sumners, C., Hathaway, S., Fregly, M.J., 1986. Mineralocorticoids modulate central angiotensin II receptors in rats. *Brain Res.* 382, 87–96.

Wong, A.H.M., Zhou, D., Rini, J.M., 2012. The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J. Biol. Chem.* 287, 36804–36813. doi:10.1074/jbc.M112.398842

Wright, J.W., Amir, H.Z., Murray, C.E., Roberts, K.A., Harding, J.W., Mizutani, S., Ward, P.E., 1991. Use of aminopeptidase M as a hypotensive agent in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res. Bull.* 27, 545–551.

Wright, J.W., Jensen, L.L., Roberts, K.A., Sardinia, M.F., Harding, J.W., 1989. Structure-function analyses of brain angiotensin control of pressor action in rats. *Am. J. Physiol.* 257, R1551–1557.

Wright, J.W., Mizutani, S., Murray, C.E., Amir, H.Z., Harding, J.W., 1990a. Aminopeptidase-induced elevations and reductions in blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens.* 8, 969–974.

Wright, J.W., Morseth, S.L., Abhold, R.H., Harding, J.W., 1985. Pressor action and dipsogenicity induced by angiotensin II and III in rats. *Am. J. Physiol.* 249, R514-521.

Wright, J.W., Roberts, K.A., Cook, V.I., Murray, C.E., Sardinia, M.F., Harding, J.W., 1990b. Intracerebroventricularly infused [D-Arg1]angiotensin III, is superior to [D-Asp1]angiotensin II, as a pressor agent in rats. *Brain Res.* 514, 5–10.

Wright, J.W., Tamura-Myers, E., Wilson, W.L., Roques, B.P., Llorens-Cortes, C., Speth, R.C., Harding, J.W., 2003. Conversion of brain angiotensin II to angiotensin III is critical for pressor response in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R725-733. doi:10.1152/ajpregu.00326.2002

Wu, B., Chien, E.Y.T., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066–1071. doi:10.1126/science.1194396

Wu, Q., Lahti, J.M., Air, G.M., Burrows, P.D., Cooper, M.D., 1990. Molecular cloning of the murine BP-1/6C3 antigen: a member of the zinc-dependent metallopeptidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 993–997.

Xie, F., Liu, W., Feng, F., Li, X., He, L., Lv, D., Qin, X., Li, Lifang, Li, Lanfang, Chen, L., 2015. Apelin-13 promotes cardiomyocyte hypertrophy via PI3K-Akt-ERK1/2-p70S6K and PI3K-induced autophagy. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 47, 969–980. doi:10.1093/abbs/gmv111

Yamada, R., Mizutani, S., Kurauchi, O., Okano, K., Imaizumi, H., Narita, O., Tomoda, Y., 1988. Purification and characterization of human placental aminopeptidase A. *Enzyme* 40, 223–230.

Yamauchi, J., Kaziro, Y., Itoh, H., 1999. Differential regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and 7 (MKK7) by signaling from G protein beta gamma subunit in human embryonal kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 1957–1965.

Yang, G., Gray, T.S., Sigmund, C.D., Cassell, M.D., 1999. The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Res.* 817, 123–131.

Yang, H.Y., Neff, N.H., 1972. Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. *J. Neurochem.* 19, 2443–2450.

Yang, Y., Liu, C., Lin, Y.-L., Li, F., 2013. Structural insights into central hypertension regulation by human aminopeptidase A. *J. Biol. Chem.* 288, 25638–25645. doi:10.1074/jbc.M113.494955

Yasothornsrikul, S., Toneff, T., Hwang, S.R., Hook, V.Y., 1998. Arginine and lysine aminopeptidase activities in chromaffin granules of bovine adrenal medulla: relevance to prohormone processing. *J. Neurochem.* 70, 153–163.

Yongue, B.G., Angulo, J.A., McEwen, B.S., Myers, M.M., 1991. Brain and liver angiotensinogen messenger RNA in genetic hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 17, 485–491.

Yoshida, S., Nakamura, Y., Naganawa, H., Aoyagi, T., Takeuchi, T., 1990. Probestin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Streptomyces azureus* MH663-2F6. II. Structure

determination of probestin. *J. Antibiot.* 43, 149–153.

Zhang, D., Zhao, Q., Wu, B., 2015. Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Cells* 38, 836–842. doi:10.14348/molcells.2015.0263

Zhang, F., Sun, H.-J., Xiong, X.-Q., Chen, Q., Li, Y.-H., Kang, Y.-M., Wang, J.-J., Gao, X.-Y., Zhu, G.-Q., 2014. Apelin-13 and APJ in paraventricular nucleus contribute to hypertension via sympathetic activation and vasopressin release in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol (Oxf)* 212, 17–27. doi:10.1111/apha.12342

Zhang, Q., Wang, J., Zhang, H., Zhao, D., Zhang, Z., Zhang, S., 2015. Expression and clinical significance of aminopeptidase N/CD13 in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Ther* 11, 223–228. doi:10.4103/0973-1482.138007

Zhong, H., Neubig, R.R., 2001. Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 837–845.

Zhong, J.-C., Yu, X.-Y., Huang, Y., Yung, L.-M., Lau, C.-W., Lin, S.-G., 2007. Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc. Res.* 74, 388–395. doi:10.1016/j.cardiores.2007.02.002

Zhou, N., Fan, X., Mukhtar, M., Fang, J., Patel, C.A., DuBois, G.C., Pomerantz, R.J., 2003a. Cell-cell fusion and internalization of the CNS-based, HIV-1 co-receptor, APJ. *Virology* 307, 22–36.

Zhou, N., Zhang, X., Fan, X., Argyris, E., Fang, J., Acheampong, E., DuBois, G.C., Pomerantz, R.J., 2003b. The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology* 317, 84–94.

Zhuo, J., Moeller, I., Jenkins, T., Chai, S.Y., Allen, A.M., Ohishi, M., Mendelsohn, F.A., 1998. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J. Hypertens.* 16, 2027–2037.

Zingg, H.H., Lefebvre, D., Almazan, G., 1986. Regulation of vasopressin gene expression in rat hypothalamic neurons. Response to osmotic stimulation. *J. Biol. Chem.* 261, 12956–12959.

Zini, S., Fournie-Zaluski, M.C., Chauvel, E., Roques, B.P., Corvol, P., Llorens-Cortes, C., 1996. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11968–11973.

Zini, S., Masdehors, P., Lenkei, Z., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Corvol, P., Llorens-Cortes, C., 1997. Aminopeptidase A: distribution in rat brain nuclei and increased activity in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 78, 1187–1193.

RESUME

Ces travaux de thèse s'articulent autour de deux projets : les études structure-fonction de l'aminopeptidase A, d'une part, et celles du récepteur de l'apéline, d'autre part.

I/ L'aminopeptidase A (APA, EC 3.4.11.7) est une aminopeptidase monozinc membranaire qui, dans le cerveau, produit l'angiotensine (Ang) III à partir de l'Ang II. L'Ang III est l'un des principaux peptides effecteurs du système rénine-angiotensine cérébral qui exerce un effet stimulateur tonique sur le contrôle central de la pression artérielle chez le rat hypertendu. Ainsi le blocage de l'APA par un inhibiteur spécifique et sélectif, l'EC33 ou sa prodrogue, le RB150, normalise la pression artérielle dans deux modèles expérimentaux d'hypertension artérielle (HTA). L'APA constitue une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'HTA qui justifie le développement de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme plus puissants et plus sélectifs que l'EC33 et avec un profil pharmacodynamique et pharmacocinétique amélioré par rapport au RB150.

Pour cela, nous avons construit un modèle tridimensionnel (3D) de l'APA sur la base de la structure cristallographique de l'APA humaine récemment publiée. Nous avons ensuite validé ce modèle par des études structure-fonction par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée en démontrant l'implication, d'un résidu du sous-site S1 dans la spécificité de substrat acide de l'APA et de deux résidus formant le sous-site S2' interagissant avec le résidu P2' acide d'inhibiteurs tripeptidiques précédemment développés dans le laboratoire.

II/ L'apéline est le ligand naturel du récepteur orphelin humain APJ (ApélineR), un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G. L'apéline et son récepteur sont impliqués dans le maintien de l'équilibre hydrique et des fonctions cardiovasculaires. L'ApélineR constitue une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et des rétentions hydriques. Etant donné que la demi-vie de l'apéline dans la circulation sanguine est de l'ordre de la minute, l'objectif est de développer des analogues de l'apéline métaboliquement stables.

Pour développer de tels composés, nous avons entrepris de comprendre comment l'apéline se lie à son récepteur et comment elle l'active. Dans ce but, nous avons construit un modèle 3D de l'ApélineR basé sur la structure cristallographique du récepteur aux chimiokines, CXCR4. Nous avons validé ce modèle par des études structure-fonction par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée. Nous avons identifié à la surface du récepteur, les résidus acides des boucles extracellulaires qui interagissent avec les résidus basiques de l'apéline. Nous avons ensuite développé des analogues de l'apéline-17 (K17F) métaboliquement stables par deux stratégies différentes. Premièrement, nous avons substitué chacun des résidus de l'apéline par son énantiomère de la série D ou par un acide aminé synthétique. Deuxièmement, nous avons ajouté une chaîne fluoroalkyle à l'extrémité N-terminale de l'apéline. Ces deux stratégies ont permis d'obtenir plusieurs composés dont les plus actifs sont le P92 et le LIT01-196 qui conservent des propriétés pharmacologiques identiques à celles de K17F et qui présentent une demi-vie plasmatique largement supérieure à celle du peptide endogène. Ces deux analogues se sont révélés particulièrement actifs *in vivo* avec une capacité à diminuer la pression artérielle et à réduire la sécrétion de vasopressine dans le sang conduisant à une augmentation de la diurèse aqueuse.

Les modèles 3D validés de l'APA et de l'ApélineR seront utilisés pour des campagnes de criblage *in silico* de chimiothèques virtuelles afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'APA et des agonistes de l'ApélineR qui pourraient conduire à terme à de nouveaux candidats-médicaments. Ces composés pourraient être utiles pour le traitement de l'HTA et de l'insuffisance cardiaque.