

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
UFR DE BIOLOGIE**

Année 1998

N° ordre

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Virginie LAURENT



**LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE CHEZ LA
SANGSUE *THEROMYZON TESSULATUM*.**

Présentée le 9 février 1998 devant la commission d'examen :

Président : M^r le Professeur J. Malecha

Directeur de thèse : M^r le Professeur M. Salzet

Rapporteurs : M^r le Docteur J.C. Beauvillain
M^{me} le Docteur L. Schoofs

Examineurs : M^r le Professeur H. Vaudry
M^r le Docteur R.E. Isaac

A Paul, Jeannette, et André.

REMERCIEMENTS

J'exprime tous mes remerciements.

A Monsieur le Professeur M. SALZET,

Michel, tu m'as enseigné la biologie puis communiqué la passion de la recherche et tu m'as fait confiance. Les mots sont parfois vains, Merci.

A Monsieur le Professeur J. MALECHA,

Vous m'avez accueillie au laboratoire, apporté de nombreux conseils et permis de réaliser ce travail contre vents et marées, Merci.

A Monsieur le Docteur J. C. BEAUVILLAIN,

Votre compétence scientifique me rend votre avis précieux. Je vous en suis très reconnaissante, Merci.

A Madame le Docteur L. SCHOOF,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et d'apporter un avis de spécialiste des invertébrés. Je vous en suis très reconnaissante, Merci.

A Monsieur le Professeur H. VAUDRY,

Votre compétence dans le domaine de la Neuroendocrinologie est telle que je suis particulièrement honorée de vous compter parmi mes juges, Merci.

To R.E. ISAAC, PhD.

Your work have always been my references. I am particularly honoured to count you among my judges, Thank you.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
GENERALITES	5
I] Le système Rénine-Angiotensine	6
1-1) L'angiotensinogène	6
1-2) La rénine	6
1-3) L'angiotensine II	7
1-4) L'angiotensine III	8
1-5) L'angiotensine IV	9
1-6) Les récepteurs à l'angiotensine	9
<u>1-6-1) L'AT1</u>	9
<u>1-6-2) L'AT2</u>	10
<u>1-6-3) L'ATIV ou AT4</u>	11
II] L'ACE chez les Vertébrés	12
1) Localisation	13
2) Structure de l'ACE	14
2-1) Les deux formes de l'ACE	14
<u>2-1-1) L'ACE somatique</u>	14
<u>2-1-2) L'ACE germinale</u>	14
2-2) Structure du gène	15
2-3) Structure protéique	16
2-4) Glycosylation de l'enzyme	16
3) Les inhibiteurs de l'ACE	17

4) Rôles des ACE germinale et somatique	18
4-1) L'ACE testiculaire	18
4-2) L'ACE somatique	19
4-3) Rôle d'endopeptidase pour l'ACE somatique	20
5) Les ACEs sous forme soluble	21

III] Le Non-RAS : l'endopeptidase 24.11-CD10-enképhalinase-CALLA-NEP

	22
1) Introduction	22
2) Localisation de l'endopeptidase 24.11	24
<u>-Rôle de la NEP dans l'immunité</u>	25
3) Activité de l'endopeptidase 24.11 de mammifères	25
3-1) Les angiotensines : substrats de l'endopeptidase 24.11	27
<u>-Les autres substrats de l'endopeptidase 24.11</u>	27
3-2) L'ANF : Atrial Natriuretic Factor	28
3-3) La substance P	28
3-4) La bradykinine	29
3-5) La lysylbradykinine	29
3-6) La neurotensine	29
3-7) La CCK8	30
3-8) L'endothéline	30
4) L'endopeptidase 24.11 d'autres espèces non mammaliennes	30
4-1) Les Vertébrés	30
4-2) Les Invertébrés	31
5) Inhibition de l'endopeptidase 24.11 et de l'ACE	31

IV] Le Matériel Biologique	33
V] Le Système nerveux des Hirudinées	35
1) Le Cerveau	35
2) La partie moyenne	35
3) Le ganglion caudal	36
4) Particularités du cerveau de <i>Theromyzon tessulatum</i>	36
RESULTATS	37

Sont présentés les résultats obtenus chez la sangsue *Theromyzon tessulatum* :

Molécule apparentée à l'angiotensine I : 38

Article (1) A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin I-like molecule with forms of vertebrate angiotensinogens : a hormonal system conserved in the course of evolution. Neuroscience Letters, 190 (1995) 175-178.

Molécule apparentée à la rénine : 44

Article (2) Isolation of a Renin-like Enzyme from the Leech *Theromyzon tessulatum*. Peptides, vol. 16, n°8, pp. 1351-1358, 1995.

Molécule apparentée à l'ACE : 55

Article (3) A comparison of the N terminal sequence of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin converting-like enzyme with forms of vertebrate angiotensin converting enzyme. Neuroscience Letters 198, (1995), 60-64.

Article (4) Biochemical Properties of the Angiotensin-Converting-Like Enzyme From the Leech *Theromyzon tessulatum*. Peptides, vol.17, n°5, pp. 737-745, 1996.

73

Article (5) Biochemical identification and ganglionic localization of the leech angiotensin-converting enzymes. Molecular Brain Research, 49 (1997) 229-237.

Molécule apparentée à l'endopeptidase 24.11:

82

Article (6) Isolation of a neuropeptide-degrading endopeptidase from the leech *Theromyzon tessulatum*. Eur. J. Biochem., 223, 186-191, 1995.

Molécule apparentée à l'aminopeptidase neutre :

91

Article (7) Metabolism of enkephalins in head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum* by peptidases : isolation of an enkephalin-degrading aminopeptidase. Regulatory Peptides, 65 (1996) 123-131.

Métabolisme des angiotensines par les peptidases isolées de *T. tessulatum* : 100

Article (8) Metabolism of angiotensins by head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum*. FEBS Letters, 384 (1996) 123-127.

DISCUSSION 107

1) Le RAS 108

2) Molécule apparentée à la rénine : rénine-like 109

3) L'ACE-like de *T. tessulatum* 111

3-1) La structure de l'ACE-like	111
3-2) Aspect phylogénétique	112
3-3) La glycosylation de l'ACE	114
3-4) Forme soluble de l'ACE et sa sécrétase	115
3-5) Activité des ACE-like	118
<u>3-5-1) Propriétés des ACE-like</u>	118
<u>3-5-2) Inhibition naturelle de l'ACE-like</u>	121
4) La molécule apparentée à la Neutral Endopeptidase :	122
NEP-like	
4-1) Structure de la NEP-like	122
4-2) Activité de la NEP et de la NEP-like	124
<u>4-2-1) La NEP-like et le système nerveux</u>	125
<u>4-2-2) La NEP-like et le système immunitaire</u>	127
CONCLUSION	129
BIBLIOGRAPHIE	132
ANNEXES	157

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Chez les mammifères, le système Rénine-Angiotensine (RAS) est connu depuis longtemps pour son rôle dans l'homéostasie ionique et hydrominérale. Dans ce système (Fig. 1), l'angiotensine I (AI) décapeptide inactif, est générée après coupure de l'angiotensinogène (A₀), glycoprotéine de *ca* 60 kDa, précurseur de l'angiotensine II, par la rénine, enzyme synthétisée par le foie et libérée dans la circulation sanguine. Dans un deuxième temps, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Angiotensin Converting Enzyme : ACE) clive la partie C-terminale de l'AI pour donner un peptide actif de huit acides aminés, l'angiotensine II (AII), produit final de ce système. L'angiotensine II, isolée et purifiée à partir du plasma ou des reins (Saavedra, 1992) a, depuis été détectée dans divers organes, notamment le cerveau (Phillips *et al.*, 1991).

Bien que cette molécule ait été identifiée dans toutes les classes de vertébrés (Takei *et al.*, 1993), aucune donnée n'a été rapportée chez les invertébrés sauf chez les Hirudinées (Salzet *et al.*, 1992, 1993b, 1995b). En effet, dans ce groupe zoologique, des études immunohistochimiques réalisées au niveau du système nerveux central (SNC) de la sangsue rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum*, ont montré que des neurones étaient immunoréactifs à un anticorps polyclonal dirigé contre de l'angiotensine II humaine (Verger-Bocquet *et al.*, 1992; Salzet *et al.*, 1992). L'isolement de la molécule apparentée à l'AII a tout d'abord été conduit chez *T. tessulatum*. Chez cette espèce, trois peptides immunoréactifs à l'AII et coéluant en HPLC sur colonne de phase inverse avec l'AII, le fragment (3-8) de l'AII et le fragment (6-8) de l'AII, ont pu être isolés (Salzet *et al.*, 1993b). Cependant, la quantité détectée en ELISA étant trop faible, ces auteurs se sont tournés vers une espèce plus abondante, et plus commune dans nos régions, la sangsue pharyngobdelle *Erpobdella octoculata*. Chez cette dernière, une molécule, l'AII-amide a été isolée et séquencée à partir d'extraits de SNC (Salzet *et al.* 1995b). Ce peptide possède la même séquence que l'AII humaine, mais est amidé du côté C-terminal. Les tests d'injections d'AII-amide de synthèse, *in vivo* à des *T. tessulatum* ont révélé que cette molécule possède un effet diurétique et que ce dernier est 10 à 100 fois supérieur en fonction de la dose injectée, à celui enregistré avec l'AII humaine (Salzet *et al.*, 1995b). L'AII-amide provoque au niveau du tégument de la sangsue médicinale une diminution monophasique du courant Na⁺ amiloride-sensible (Milde, communication personnelle).

Les dosages ELISA et RIA effectués au cours des différentes phases du cycle biologique de *T. tessulatum* permettent de supposer que cette molécule est impliquée dans l'augmentation de l'excrétion urinaire consécutive à la compaction des cellules sanguines dans le tube digestif, après un repas de sang (Salzet *et al.*, 1992).

L'étude préliminaire réalisée pour identifier le précurseur de la molécule apparentée à l'AII au niveau du SNC de *T. tessulatum* a conduit à la mise en évidence d'une protéine de 19 kDa dans les produits de traduction *in vitro* d'ARNm extraits de SNC (Salzet *et al.*, 1993b). Cette molécule diffère de l'A₀ des vertébrés. Outre sa masse de 19 kDa vs 65 kDa pour l'angiotensinogène, elle est immunoréactive à 5 anticorps différents qui reconnaissent des épitopes distincts sur cette protéine *i.e.* AII, AI, ACTH, γ MSH et celui reconnu par le monoclonal Tt159 (Verger-Bocquet *et al.*, 1992 ; Salzet *et al.*, 1993b). Deux de ces 5 épitopes ont été identifiés. Le premier correspond à l'AII (Salzet *et al.*, 1995b), le deuxième à un peptide apparenté à la γ MSH des vertébrés (Salzet *et al.*, 1994a). De plus récemment, le précurseur apparenté à la POMC a été isolé des cellules immunitaires et cloné chez *T. tessulatum* (Salzet *et al.*, 1997a). Ce dernier possède l'AII au sein de sa structure. Cependant celle-ci n'est pas flanquée d'acides aminés dibasiques permettant sa libération directe par des convertases de type « furine » par exemple (Mieczyslaw *et al.*, 1993). En revanche, elle possède les sites de protéolyses aux métalloenzymes de type ACE ou NEP (Salzet *et al.*, 1997a). En effet, récemment Isaac et collaborateurs (Isaac, 1997) ainsi que Salzet et collaborateurs (1997a) ont démontré l'action de ces enzymes dans les processus de maturation des précurseurs de neuropeptides aussi bien chez les insectes que chez les sangsues. Dans ce contexte, l'AII pourrait provenir de l'action de ces enzymes sur le précurseur apparenté à la POMC. Ces résultats singuliers, permettent de supposer l'existence d'au moins deux types de précurseurs pour l'AII chez les Hirudinées et sont en accord avec les résultats obtenus par Phillips *et al.*, (1991) au niveau du cerveau de rat, révélant l'existence d'un peptide de haut poids moléculaire ca. 9 kDa immunoréactif à l'anti-AI et à l'anti-AII, donc différent de l'A₀. De plus, au cours de notre étude sur le SNC de *T. tessulatum*, un peptide (11 kDa) a également été isolé. Sa séquence N terminale présente 100% d'homologie avec l'angiotensine I humaine. Il porte également les sites de protéolyses à la rénine et à l'ACE (Laurent *et al.*, 1995a). Ce peptide pourrait être un produit de dégradation ou de clivage du précurseur de 19 kDa présent dans le SNC (Laurent *et al.*, 1995a).

Compte tenu de ces données, l'objectif de mon travail a été l'isolement et la mise en évidence des enzymes de conversion des angiotensines afin de répondre à la question suivante : existe-t-il une conservation, au cours de l'évolution, du système hormono-enzymatique de

l'AII, alors que son (ou ses) précurseur(s) chez les Hirudinées, est multipéptidique et donc différent de l'angiotensinogène des vertébrés ?. Dans ce but, les enzymes apparentées à la rénine et à l'ACE impliquées dans le métabolisme des angiotensines chez la sangsue, ont été isolées puis leurs caractéristiques biochimiques (K_m , K_{cat} , efficacité catalytique (K_m/K_{cat}), activité spécifique), les conditions optimales de leur activité (pH, température, influence des ions bivalents) et leur spectre d'action ont été précisés. De même, les enzymes impliquées dans la synthèse et le catabolisme de l'AII, différentes de celles impliquées dans le RAS ont été isolées et caractérisées.

GENERALITES

Système Rénine - Angiotensine (RAS) des Vertébrés

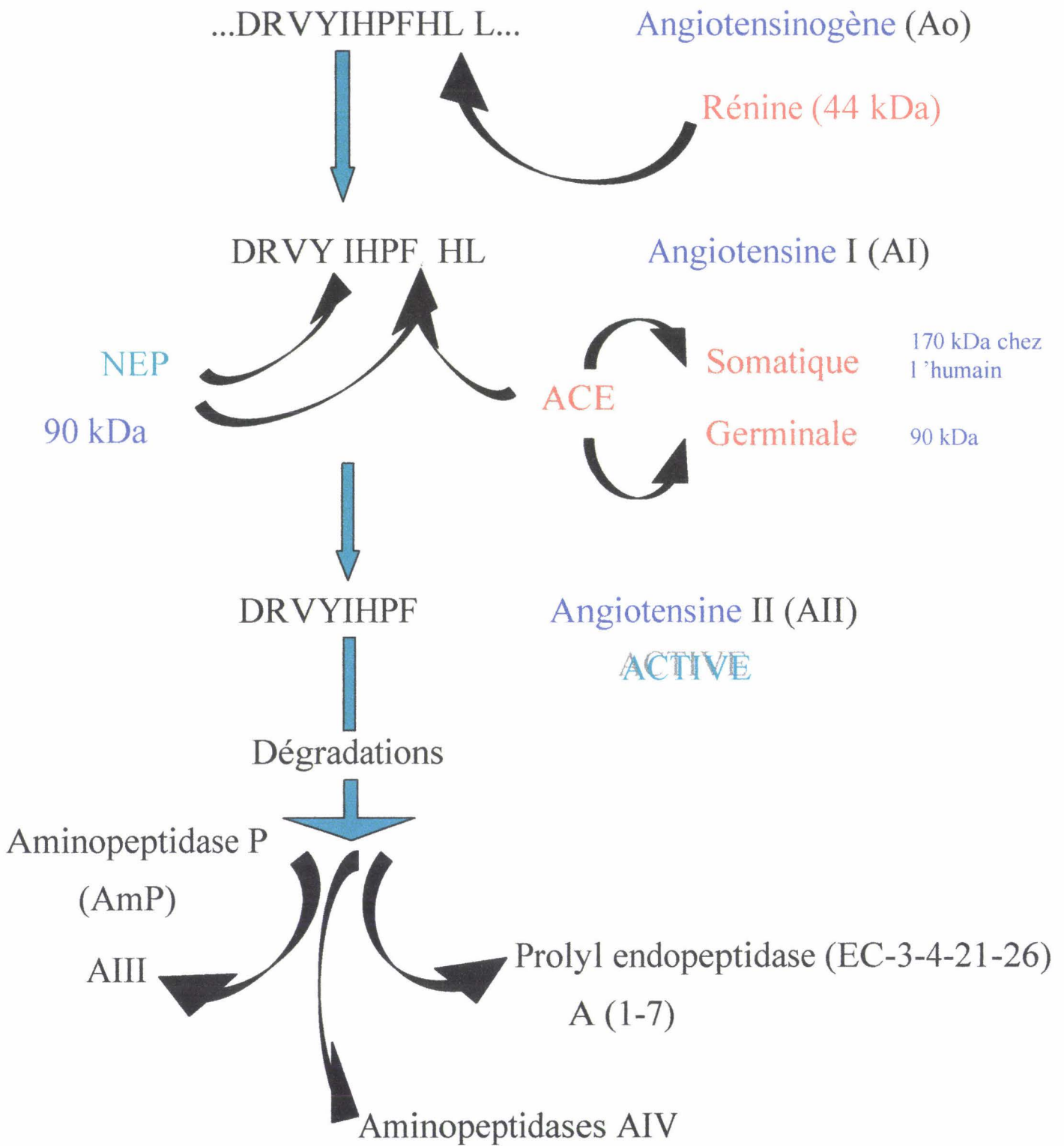


Figure 1:

GENERALITES

I] Le Système Rénine-Angiotensine

1-1) L'angiotensinogène

L'AII a été découverte en 1940 par Page et Helmer. Elle est composée de huit acides aminés et constitue le produit actif du système rénine-angiotensine (Fig.1). Cet octapeptide provient de l'angiotensinogène (A_O), un précurseur protéique de la famille des globulines. L' A_O est une α_2 globuline synthétisée par le foie (Campbell *et al.*, 1995). Elle appartient, chez l'homme, à la superfamille des serpinines.

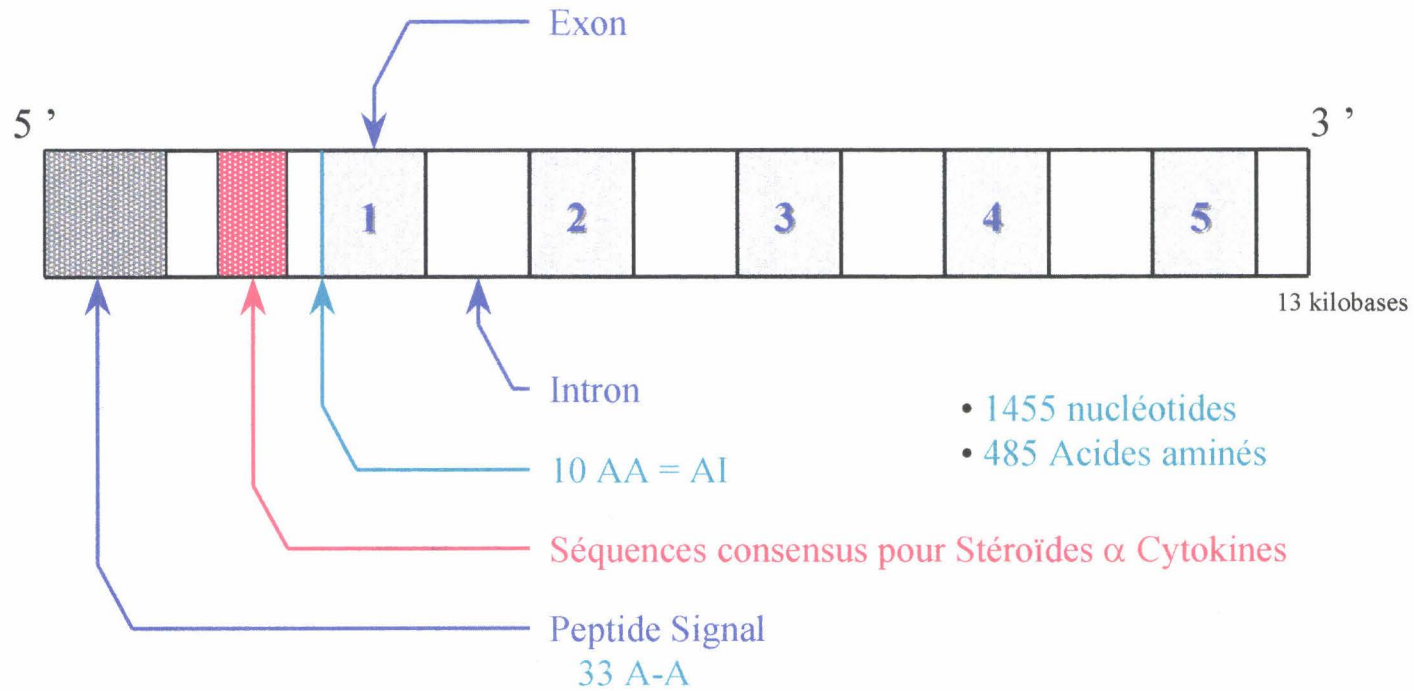
Un seul gène code pour ce précurseur. Il est situé sur le chromosome 1 (1q42.3) très près du locus correspondant au gène de la rénine. Cette colocalisation n'est pas universelle et varie d'une espèce à l'autre (Burton et Quinn, 1988). Chez l'homme, l' A_O est constitué de 5 exons et 4 introns (Fig 2) et a une taille de 13 kilobases. Le cDNA consiste en 1455 nucléotides et code pour 485 acides aminés, dont 33 paraissent représenter un peptide signal. Les 10 premiers acides aminés de la protéine mature correspondent à l'angiotensine I (AI).

Le gène de l'angiotensinogène possède plusieurs séquences consensus dans la région du promoteur en 5' pour les stéroïdes et les cytokines. Ce précurseur des angiotensines est principalement synthétisé dans le foie mais il est également produit par d'autres organes comme le rein, le cœur ou certaines régions du cerveau (Williams *et al.*, 1997). L' A_O est sécrété de façon constitutive. Les taux plasmatiques sont augmentés par les stéroïdes, l'hormone thyroïdienne et l'AII elle-même.

1-2) La Rénine

L'enzyme impliquée dans la maturation de l'angiotensinogène est la rénine (Fig.1). Sa découverte remonte à la fin du siècle dernier. Tigerstedt and Bergman dans un article de 1898, montrent que l'injection intraveineuse d'extraits de rein entraînent un effet sur la pression sanguine. De plus, ils défendent l'hypothèse selon laquelle l'élément responsable de cet effet est une protéine qu'ils nomment rénine. Celle-ci est synthétisée sous forme d'une préproprotéine. Le gène de cette enzyme est situé sur le bras court du chromosome 1 (1q32-

Figure 2:



L'angiotensinogène, une protéine de type α 2 globuline

1q42). Chez la souris, on trouve deux gènes codant pour la rénine, tous deux situés sur le chromosome 1, alors que chez le rat, le gène de la rénine est localisé sur le chromosome 13. Dans chaque espèce, la séquence nucléotidique est approximativement de 12 kilobases avec 10 exons et 9 introns. Le produit de transcription du gène est un mRNA de 1.5 kilobases. L'enzyme issue de la traduction est un membre de la famille des aspartyl protéases (Williams *et al.*, 1997).

Sa séquence protéique est composée de 340 acides aminés, dont les 43 premiers constituent le peptide signal qui est coupé pour donner l'enzyme active. Les parties N et C terminales de la rénine sont similaires, et font de la molécule une enzyme à double domaine. Chaque domaine contient un acide aspartique, essentiel pour son activité catalytique. A l'heure actuelle, l'angiotensinogène est le seul substrat connu de la rénine (Cumin *et al.*, 1987). Des éléments de réponse hormonaux ont été identifiés dans la région 5' du gène de la rénine et incluent des éléments consensus pour l'AMPc et les stéroïdes (l'estrogène, la progestérone et les glucocorticoides).

1-3) L'Angiotensine II

L'AII, élément actif du RAS (Fig.1) induit la contraction des muscles lisses de la paroi vasculaire provoquant une augmentation de la pression sanguine et une diminution du flux sanguin rénal. Ce peptide est également capable d'augmenter la force de contraction du cœur, de stimuler la sécrétion d'aldostérone et de moduler la filtration glomérulaire (Cleland, *et al.*, 1996). L'AII est encore reconnue comme un facteur de croissance pour divers types cellulaires incluant les fibroblastes, les cellules du cortex surrénalien, les myocytes cardiaques et les cellules des muscles lisses vasculaires. L'AII joue finalement un rôle essentiel dans le maintien du volume extracellulaire normal et de la pression sanguine. Elle peut même agir via des récepteurs intracellulaires. En effet, la fixation de l'AII aux noyaux des hépatocytes stimule la transcription des ARNs et la synthèse spécifique des ARNs de la rénine et de l'A₀ (Csikos, *et al.*, 1997). Elle peut également stimuler l'activité du système nerveux sympathique en faisant croître la réponse du système sympathique central, donc en augmentant les décharges de norépinéphrine des terminaisons nerveuses sympathiques.

En dehors du maintien de la pression sanguine, l'AII est impliquée dans d'autres phénomènes, comme une action sur les cellules pituitaires via la sécrétion d'ACTH (adrenocorticotropin hormone), la stimulation de la croissance cellulaire de ses tissus cibles, un rôle possible dans la maturation folliculaire etc. Par ailleurs, la demi vie de l'AII dans la

circulation sanguine est très courte, probablement moins d'une minute. L'AII est rapidement dégradée par des enzymes dans la circulation ou captée dans les cellules grâce à un mécanisme récepteur dépendant. La quantité d'AII présente dans la circulation est en effet, de l'ordre de la picomole. Cependant, l'affinité du peptide pour son récepteur se mesure en nanomoles. Ceci suggère qu'un certain nombre d'effets de l'AII est en partie provoqué par sa production locale. En effet, une étude chez des patients ayant subi une crise cardiaque, amène à la conclusion selon laquelle, une production locale d'AII a lieu dans le cœur grâce à de la rénine prélevée de la circulation sanguine (J Danser, *et al.*, 1997). Tous les effets de l'AII sont compatibles avec un rôle de maintien de la pression artérielle et de conservation du volume sanguin. En revanche, dans du cerveau, l'AII contribue aux fonctions de reproduction via l'axe hypothalamo-hypophysaire-adrénalien en régulant la libération d'hormones comme la prolactine, l'ACTH ou l'ocytocine. Des arguments sont également en faveur de l'effet de l'AII sur la régulation de la température corporelle et en particulier du cerveau.

De plus, un rôle de l'AII dans des événements particuliers de plus en plus étudiés comme l'apoptose, est en train d'émerger (Kajstura, *et al.*, 1997). En effet, les auteurs montrent que l'AII active, *in vitro*, le programme de suicide des myocytes en culture, via son récepteur de type 1 : l'AT1 et une augmentation cytosolique du calcium. De même, la protéine p53, un facteur transcriptionnel impliqué dans la réparation de l'ADN ou le suicide cellulaire, peut stimuler le RAS des myocytes. Il peut également diminuer le rapport Bcl-2/ Bax dans ces cellules, ce qui entraîne leur apoptose. En effet, p53 semble pouvoir diminuer l'expression de Bcl-2 et augmenter celle de Bax, deux protooncogènes dépendants de p53 (Pierzchalski *et al.*, 1997).

1-4) L'Angiotensine III (Fig.1)

L'AII peut être modifiée par l'aminopeptidase A pour former un produit de 7 acides aminés, l'angiotensine III, encore active. L'angiotensine 1-7 ou AIII constitue un des composés biologiques actifs issus de l'AI par l'action d'une prolyl endopeptidase. La fonction de ce peptide n'est pas tout à fait élucidée, on le trouve principalement dans le tissu cardiaque des mammifères. Cependant, l'injection intracérébro-ventriculaire de ce peptide, à un rat, cause une excitation neuronale et la libération de vasopressine. Zini et collaborateurs (1996) parlent même d'un rôle majeur de l'AIII dans le contrôle de la libération de la vasopressine par les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus (Zini *et al.*, 1996).

1-5) L'Angiotensine IV (Fig.1)

Un acide aminé supplémentaire peut être ôté par l'aminopeptidase B de l'AIII pour former l'angiotensine 3-8 (AIV). Ce dernier peptide semble se lier à un récepteur différent de celui de l'AII, et aurait un effet opposé à celui de l'octapeptide (i.e., un effet vasodilatateur) dans la circulation cérébrale et rénale (Bernier et Guillemette, 1996). Cet hexapeptide pourrait améliorer les processus liés à l'apprentissage et à la mémoire. Dans des tests neuro-comportementaux chez le rat, l'AIV augmente l'activité psychotrope. D'autre part, l'administration d'AIV dans le cerveau de lapin augmente la vasodilatation des artérioles cérébrales induite par la L-arginine (Bernier et Guillemette, 1996).

Cependant, les rôles de l'AII, l'AIII, et l'AIV sont assez controversés en ce qui concerne leurs effets respectifs au niveau de la circulation sanguine cérébrale. Il reste également à préciser l'intervention des différents récepteurs sachant que les neuropeptides peuvent s'y fixer avec des affinités variables selon les circonstances.

1-5) Les récepteurs à l'angiotensine

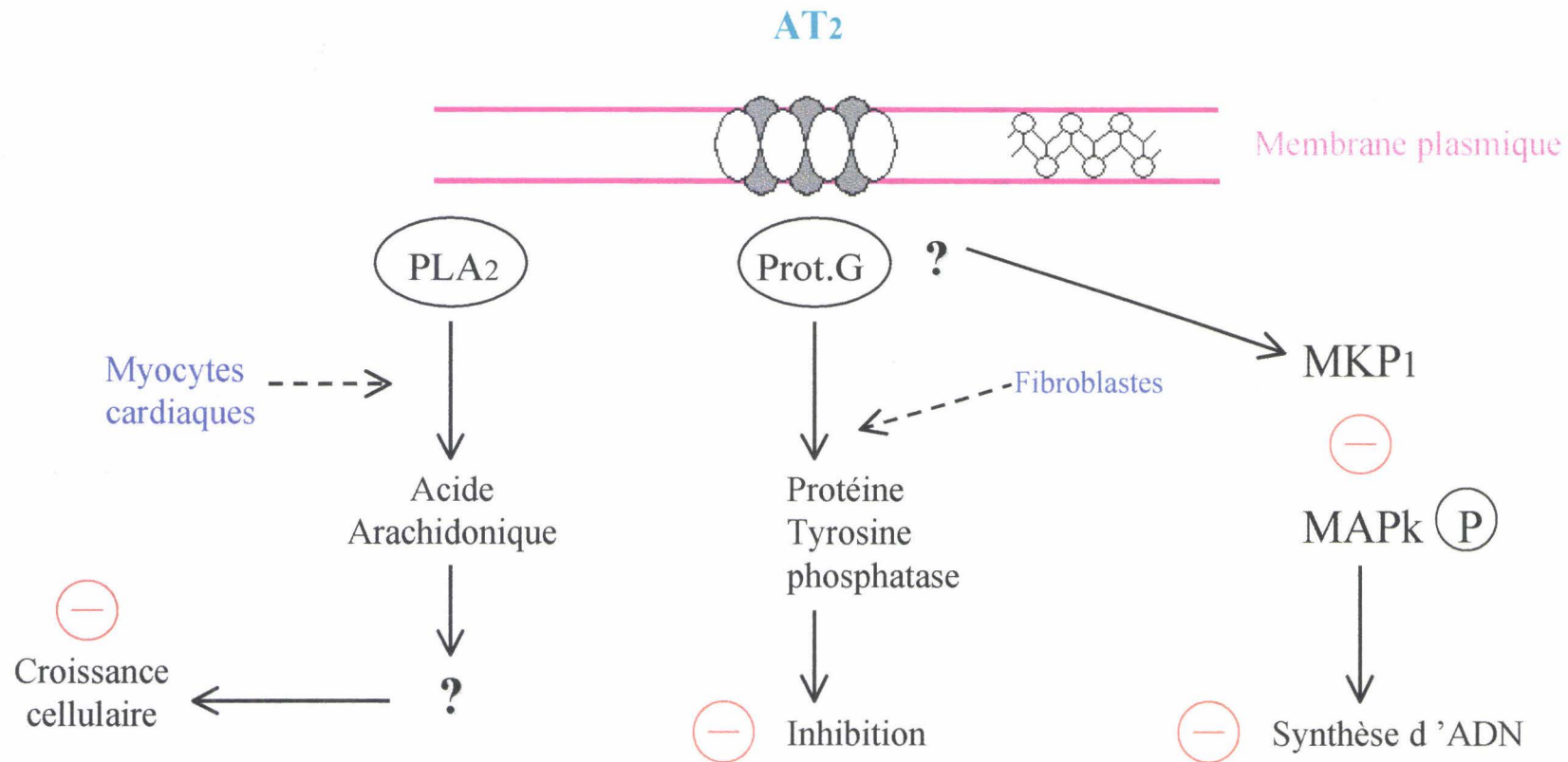
Les récepteurs à l'angiotensine existent sous deux formes, nommées AT1 et AT2. Des études préliminaires suggèrent qu'il y aurait un récepteur séparé pour l'angiotensine IV (Bernier *et al.*, 1996).

1-6-1) L'AT1

L'AT1, protéine de 41 kDa (Takayanagi *et al.*, 1992) est un récepteur classique à 7 domaines transmembranaires codé par un seul gène chez l'homme, avec un pont disulfure qui relie le premier et le quatrième segment extracellulaire (Murphy *et al.*, 1991). Les résidus cystéines présents dans les 4 domaines extracellulaires sont importants pour la formation des ponts disulfures nécessaires à la conformation et à l'affinité du couplage ligand-récepteur.

La masse moléculaire observée est en fait de 65 kDa. Elle serait due à une glycosylation importante. Son mécanisme de transduction est bien connu (Fig. 3). Des travaux plus récents démontrent également que le récepteur AT1 active la MAP (mitogen activated

Figure 4: Le récepteur AT₂, d'après le schéma proposé par CHASSAGNE et *al*, 1996.



. PLA₂ : phospholipase 2 , MKP- 1 : protéine phosphatase à double spécificité: inhibe divers membres de la famille des MAP- kinases.

protein) kinase, la protéine tyrosine kinase Jak₂ et la protéine kinase p70 S6. Ces trois voies de signalisation pourraient être responsables du rôle de l'AII dans la croissance et la différenciation cellulaire. La liaison de l'AII à l'AT1 est suivie de la cascade de transduction suivante : activation via une protéine Gs d'une phospholipase C qui entraîne la libération d'inositol 1,4,5-triphosphate. Cependant, la voie de la tyrosine kinase pourrait également être impliquée. La régulation de l'expression des récepteurs à l'angiotensine est compliquée. Elle dépend des espèces, du tissu, et du sous type de récepteur. Des études ont montré que l'oncogène *mass* codait pour une protéine capable de reproduire certains effets de l'AII (Jackson *et al.*, 1988).

1-6-2) L'AT2

L'AT2 est également un récepteur à 7 domaines transmembranaires, de 363 acides aminés, vraisemblablement couplé à une protéine Gs, mais il pourrait également être couplé à une protéine tyrosine phosphatase (Fig 4) (Chassagne *et al.*, 1996). Les divers degrés de glycosylation de la protéine font varier son poids moléculaire dans les différents tissus ou cellules. L'AT2 se retrouve essentiellement dans la médullosurrénale, l'appareil reproducteur féminin (myomètre, trompes de Fallope et ovaires) et certaines régions du cerveau. Ce récepteur pourrait donc jouer un rôle dans les fonctions cérébrales et reproductrices chez l'adulte. De façon intéressante, le gène de ce récepteur est localisé sur le chromosome X chez l'homme. Ces deux récepteurs lient l'AII avec une affinité élevée de l'ordre de la nanomole.

Figure 5 : Substrats et sites de protéolyse de l'ACE
d'après Welches, W.R., *et al.*, 1993.



n : amidation C terminale.

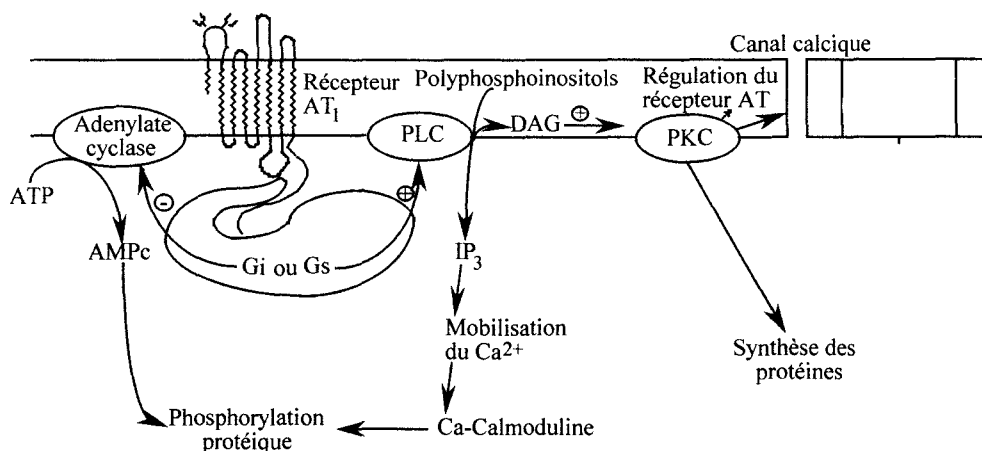


Figure 3 Schéma, proposé par Saavedra (1992), des mécanismes de transduction du récepteur à l'angiotensine II : AT₁. Le récepteur AT₁ peut, soit inhiber l'adénylate cyclase via des protéines de type G inhibitrices (Gi), soit stimuler via des protéines de type G stimulatrices (Gs) une phospholipase C (PLC) via des phosphoinositols conduisant à la formation de 2 seconds messagers : le diacyl glycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP₃). L'IP₃ permet la libération du calcium intracellulaire et de DAG et augmente l'affinité de la phosphokinase C (PKC) au calcium.

1-6-3) Le récepteur à l'AIV ou AT₄

A côté des deux récepteurs classiques : AT₁ et AT₂, on a mis en évidence la présence d'un nouveau site de liaison dans le cortex surrénalien bovin et sur les cellules endothéliales d'aorte de bœuf. Ce récepteur nommé AT₄, n'appartient pas à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (Bernier et Guillemette, 1996). Sa masse moléculaire est par ailleurs très élevée : *ca* 186 kDa. Les auteurs de cette découverte ont suggéré la possibilité de l'appartenance du récepteur AT₄ à la famille des récepteurs des facteurs de croissance ou des cytokines. Les expériences de radiomarquage du ligand ont alors permis de montrer que ce

récepteur est celui de l'AIV (Bernier et Guillemette, 1996). L'AIV est un fragment de l'AII et est présent notamment dans la circulation sanguine. L'AIV peut, comme on l'a suggéré précédemment provenir de l'hydrolyse de l'AIII par les aminopeptidases B ou M situées à la surface des cellules endothéliales ou des cellules musculaires lisses. L'AIV peut également être le produit de l'hydrolyse de l'AII par une peptidyl aminopeptidase III qui retranche le dipeptide Asp-Arg.

La régulation du RAS se fait au niveau de la sécrétion de la rénine par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire qui répondent, soit à une baisse de pression de l'artériole afférente du glomérule rénal, soit à une diminution de la concentration de Na^+ dans le tube distal, ou encore à une stimulation provenant du système nerveux sympathique.

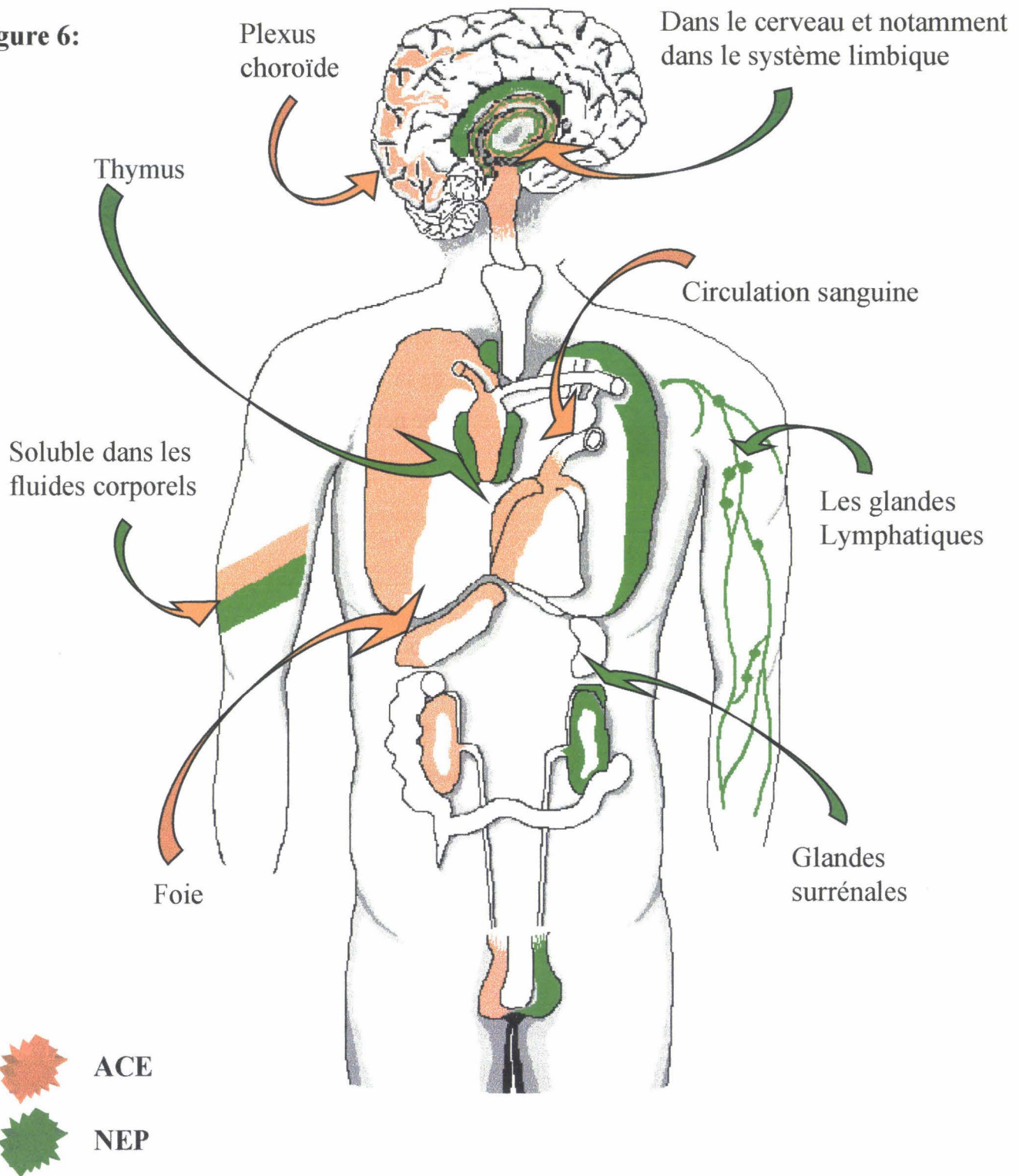
III] L'ACE chez les Vertébrés :

L'Angiotensin Converting Enzyme (ACE, peptidyl dipeptidase A, EC 3.4-15.1) est une métallopeptidase dépendante du zinc, qui joue un rôle important dans le maintien de la pression sanguine. Elle a été découverte en 1956 par Skeggs et collaborateurs. Cette enzyme est capable non seulement de cliver le dipeptide C terminal de l'angiotensine I pour produire l'AII (Fig.1) mais aussi d'inactiver la bradykinine, peptide vasodilatateur (Yang, *et al.*, 1970 ; Erdos, *et al.*, 1987). L'ACE enlève successivement deux dipeptides de l'extrémité C terminale de la bradykinine. Le terme ACE choisi pour nommer cette enzyme se rapporte à sa principale fonction physiologique reconnue dans le RAS (Skidgel, *et al.*, 1993 ; Corvol, *et al.*, 1995).

Le rôle de l'ACE dans le maintien de l'équilibre hydrominéral a été clairement défini en utilisant des inhibiteurs hautement spécifiques de celle-ci. Ces inhibiteurs montrent d'ailleurs une grande efficacité dans le traitement de l'hypertension et dans le cas des attaques cardiaques congestives (Bevilacqua, *et al.*, 1996 ; Villard, *et al.*, 1996).

En plus de son action sur les deux substrats impliqués respectivement dans la régulation de la pression sanguine et le maintien de l'équilibre hydrominéral, l'ACE peut cliver grâce à son activité de carboxypeptidase les dipeptides C terminaux d'oligopeptides variés possédant une extrémité C terminale libre, comme les enképhalines, les neurotensines (Fig 5) et le peptide chimiotactique Formyl-Met-Leu-Phe (Erdos, 1990). Elle possède également un rôle d'endopeptidase sur des substrats amidés du côté C terminal en enlevant le

Figure 6:



➔ L'ACE est également présente dans le placenta chez la femme.

➔ La NEP est la seule enzyme présente au niveau des cellules épithéliales.

LOCALISATION DE L'ACE ET LA NEP CHEZ LES MAMMIFERES

dipeptide C terminal amidé. Cette dipeptidyl carboxypeptidase peut également cliver le tripeptide C-terminal amidé de la substance P (Skidgel, *et al.*, 1984) et de la luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH), puis de façon surprenante, le tripeptide N-terminal de ce dernier substrat (Skidgel, *et al.*, 1985). En fait, cette dipeptidyl carboxypeptidase est dotée d'un large spectre d'action.

1) Localisation (Figure 6)

L'enzyme est concentrée au niveau de la bordure en brosse de l'intestin, des microvillosités des tubules proximaux du rein (Kenny et Ingram, 1987), et du placenta (Skidgel et Erdos, 1993). L'ACE est présente à des taux élevés au niveau du plexus choroidien, dans les organes circumventriculaires et dans le fluide cérébrospinal. En fait, on trouve de l'ACE au niveau de l'endothélium vasculaire de tissus variés dont le cœur et le cerveau (Beldent, *et al.*, 1995). Elle a en effet été observée dans le plasma, les macrophages stimulés, les testicules, le poumon et les couches moyennes et l'adventice des vaisseaux sanguins. L'ACE est présente soit sous forme membranaire, au niveau de la membrane cytoplasmique et dans ce cas, son site actif est orienté de façon extracellulaire, soit dans des vésicules neurosécrétrices où elle est colocalisée avec l'AII. L'enzyme semble concentrée près de sites de production de l'AII mais également d'autres neuropeptides comme les tachykinines au niveau du striatum. L'ACE serait de plus, distribuée de façon hétérogène dans le tissu vasculaire (Johnson, *et al.*, 1977 ; Oparil, *et al.*, 1996 ; Baudin, *et al.*, 1997).

2) Structure de l'ACE (Figure 7)

L'ACE fait partie des ectoenzymes. C'est une glycoprotéine dimérique de 146 kDa (Hooper, *et al.*, 1987 ; Baudin *et al.*, 1988), contenant 17 sites de glycosylation. Cette protéine est constituée d'un domaine N terminal extracellulaire bilobé, d'une région transmembranaire hydrophobe et d'un court domaine C terminal intracellulaire (Soubrier, *et al.*, 1988 ; Meng, *et al.*, 1996). Sa séquence contient un peptide signal N terminal qui est enlevé rapidement au cours de la biosynthèse (Fig.7). L'enzyme de conversion est inhibée par l'EDTA et la 1,10 phénanthroline, ce qui signifie qu'elle a besoin d'un atome métallique pour son activité catalytique (Corvol, *et al.*, 1995). De plus, la réactivation partielle de l'enzyme traitée avec

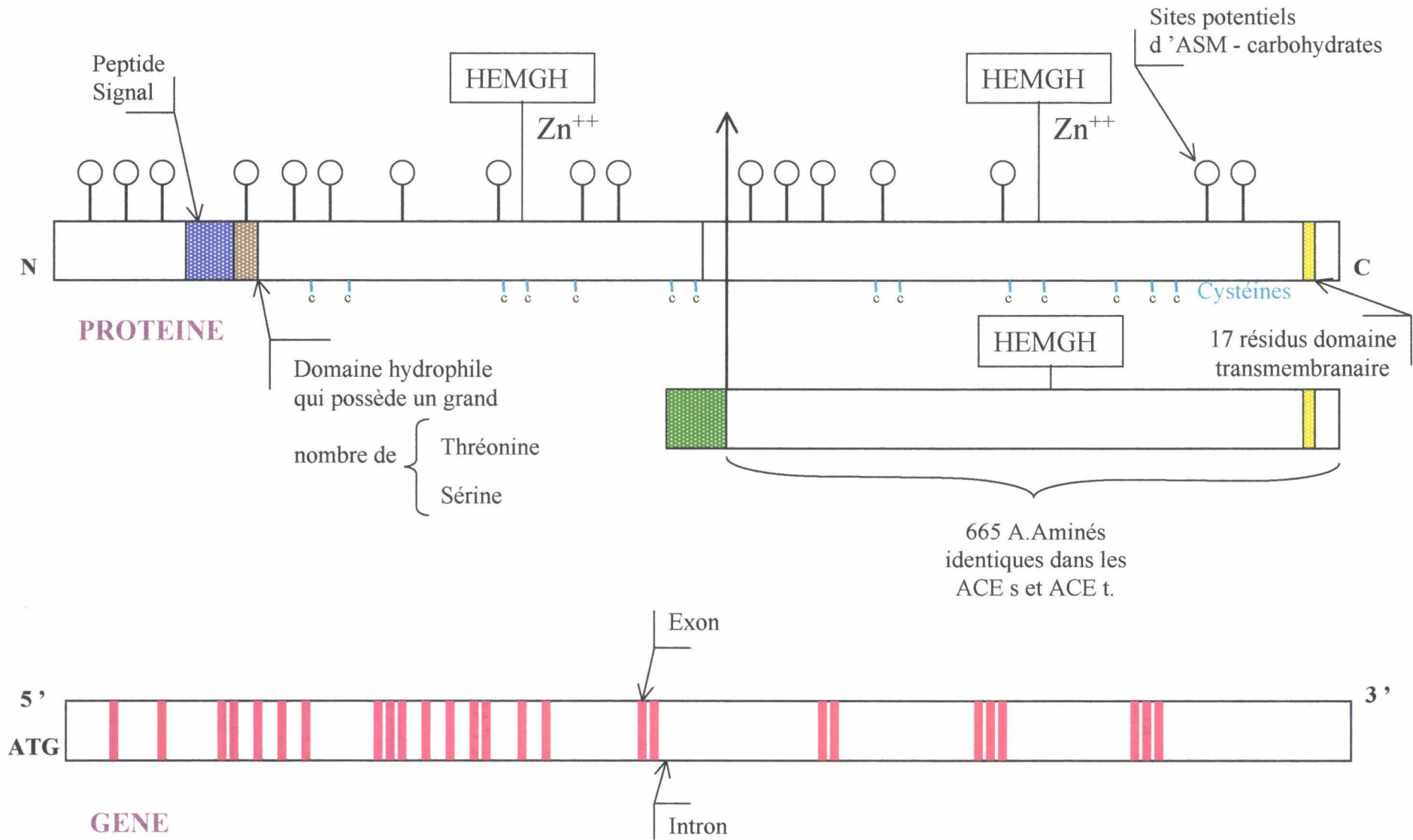


Figure 7: **Structure de l'ACE.**

l'EDTA par le zinc, indique que celui-ci est essentiel au niveau de son site actif (Erdos, *et al.*, 1987 ; Cornell, *et al.*, 1995).

Deux isoformes distinctes de l'ACE ont été identifiées dans les tissus de mammifères, l'une somatique, l'autre germinale. L'extrémité C terminale (625 acides aminés) des deux isoenzymes est identique, alors que leur extrémité N terminale est spécifique (Fig 7). La forme membranaire est ancrée du côté C terminal dans la membrane plasmique par un domaine transmembranaire hydrophobe long de 17 résidus. Ceci suggère que le côté C terminal (30 résidus) constitue la queue cytoplasmique et que le reste de la protéine est extracellulaire (Hooper *et al.*, 1987 ; Bernstein *et al.*, 1988).

2-1) Les deux formes de l'ACE

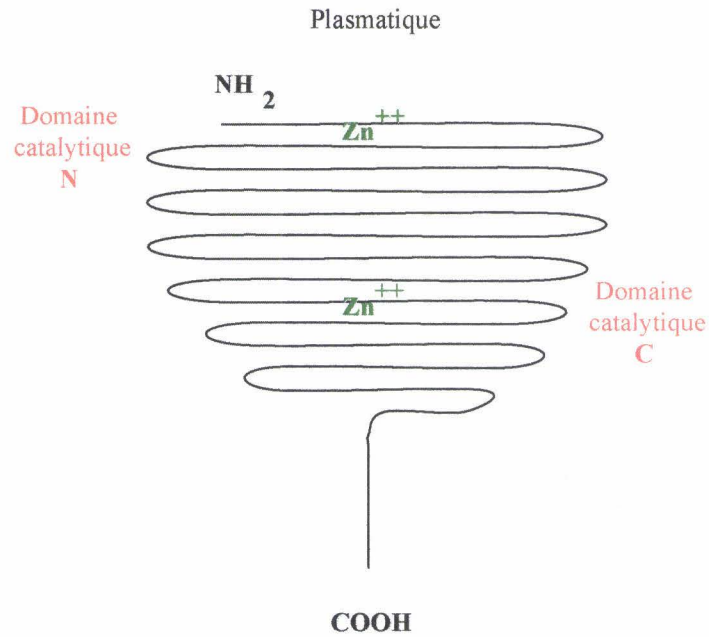
2-1-1) L'ACE somatique :

C'est la plus grande des deux isoenzymes. Sa taille est de 170 kDa chez l'homme. Elle est largement distribuée dans les tissus. Elle est constituée de deux domaines très similaires : N et C nommés ainsi en raison de leur position, respectivement N ou C terminale, dans la protéine constituée d'une seule chaîne (Fig 8).

Chacun de ces domaines possède un site catalytique fonctionnel (Wei, *et al.*, 1991) et un site de fixation au zinc, dont la séquence consensus est : HEXXH (Rawlings et Barrett, 1993 ; Soubrier, *et al.*, 1993 a, b). Cependant, les deux sites actifs possèdent des propriétés enzymatiques différentes. Le domaine C possède une constante de catalyse (K_{cat}) 3 à 10 fois plus élevée que celle du domaine N selon les substrats utilisés et les conditions (Villard, *et al.*, 1996). En effet, le domaine C hydrolyse l'AI et la substance P avec un meilleur rendement que le domaine N. En revanche, le clivage N terminal du LH-RH par le site actif du domaine N, est plus rapide (Jaspard, *et al.*, 1993). Toutes les études s'accordent à montrer d'importantes différences structurales et fonctionnelles entre les deux domaines catalytiques, en dépit de leur forte homologie de séquence et de leur manque apparent de sélectivité pour un substrat en particulier. Cependant, chaque domaine montre une nette préférence catalytique selon le substrat, le site de clivage et la concentration de chlore.

2-1-2) L'ACE germinale :

Forme somatique soluble



Forme somatique membranaire

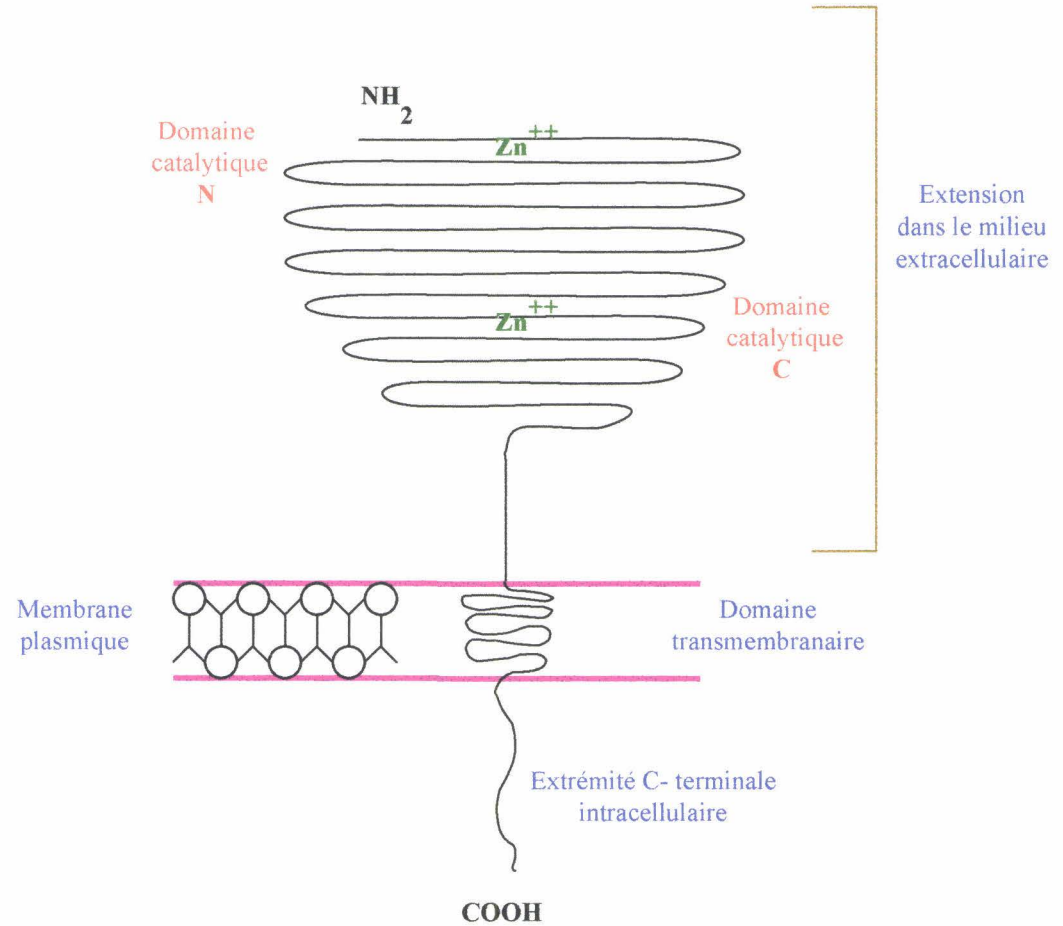


Figure 8: LES ISOFORMES DE L'ACE.

L'autre isoenzyme, l'ACE germinale (100 kDa chez l'homme) est localisée exclusivement dans les testicules et est associée aux cellules germinales mûres (Fig 9).

L'ACE testiculaire est constituée d'un seul domaine avec un site catalytique unique. Elle dérive du même gène que l'ACE somatique. Mais l'ACE testiculaire est sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur intragénique tissu-spécifique (Langford, *et al.*, 1991 ; Thekkumkara, *et al.*, 1992 ; Erickson, *et al.*, 1996).

Cette isoenzyme est plus courte que l'ACE somatique (732 acides aminés contre 1306) et contient uniquement le domaine C, attaché à la membrane cellulaire (Deddish, *et al.*, 1996). Les 67 acides aminés N terminaux de l'ACE germinale ne sont pas présents dans l'enzyme somatique. Cependant, les 665 derniers résidus sont les mêmes que ceux de la portion C terminale de l'ACE somatique (El-Dorry, *et al.*, 1982 ; Ehlers, *et al.*, 1989). L'ACE germinale n'a donc pas de site actif correspondant au domaine N. Elle pourrait être plus stable que le domaine C de l'ACE somatique grâce à ses 63 acides aminés supplémentaires du côté N terminal. En fait, la stabilité plus élevée du domaine catalytique N de l'ACE (par rapport aux domaines C) pourrait également venir de la grande quantité de carbohydrates (Soubrier *et al.*, 1993 a, b) et des différences tridimensionnelles de structure des deux domaines.

2-2) Structure du gène

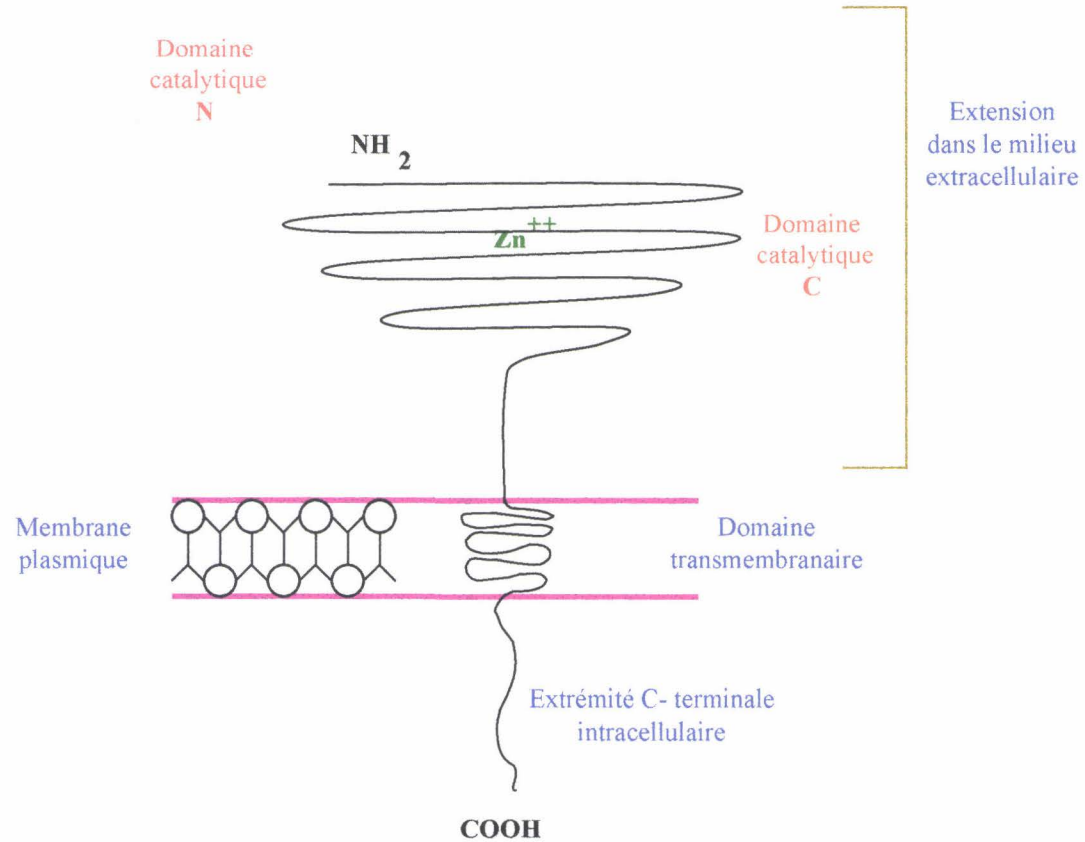
Le clonage moléculaire du cDNA de l'ACE endothéliale humaine a permis d'établir que les enzymes testiculaires et endothéliales sont codées par deux mRNAs de taille différente, respectivement de 3.0 et de 4.3 kilobases, transcrits à partir d'un seul gène (Fig 7). La transcription se fait sous le contrôle d'un promoteur différent pour chacune des isoformes (Breitbart, *et al.*, 1987). La présence de promoteurs alternatifs différents selon les tissus pourrait être à l'origine de variations de la régulation hormonale. L'expression serait tissu-spécifique (Ramchandran, *et al.*, 1996).

Chez l'homme, le gène de l'ACE est situé sur le chromosome 17 (17q23) (Williams, *et al.*, 1997). On ne trouve qu'un seul gène chez l'homme, le rat, la souris, et le lapin. Chez l'homme et la souris, le gène se compose de 26 exons et 25 introns. Le promoteur de l'ACE somatique est localisé en amont du premier exon, alors que le promoteur de l'autre isoforme est en amont du 13^{ème} exon. Ce treizième exon code pour une séquence « leader » spécifique de l'ACE germinale. Les deux mRNAs partagent dans leur région 3', une séquence identique importante qui comprend les derniers 1997 nucléotides de la région codante. Cependant, la

Figure 9:

A.C.E testiculaire

1 seul domaine catalytique C



partie 5' du transcrit diffère entre les deux enzymes. Le mRNA de l'ACE testiculaire contient le codon initiateur ATG suivi d'une séquence de 228 nucléotides qui code pour un peptide signal. Cette séquence ne se retrouve pas dans la partie 5' du cDNA de l'ACE endothéliale, i.e.somatique (Bernstein, *et al.*, 1988).

2-3) Structure protéique

La séquence peptidique qui suit la séquence signal est hydrophile et possède un nombre inhabituel de thréonines et de sérines. De pareilles séquences ont été trouvées dans la partie extracellulaire des protéines membranaires, à côté de la région d'insertion. Les histidines 414, 418 et la glutamine 442 sont probablement les acides aminés qui permettent la liaison de l'atome de zinc à l'enzyme testiculaire. La glutamine 415 et l'histidine 457 seraient impliquées dans la catalyse. Alors que seul le domaine C est exprimé dans l'enzyme testiculaire, elle présente des propriétés apparemment identiques à celles de l'ACE somatique.

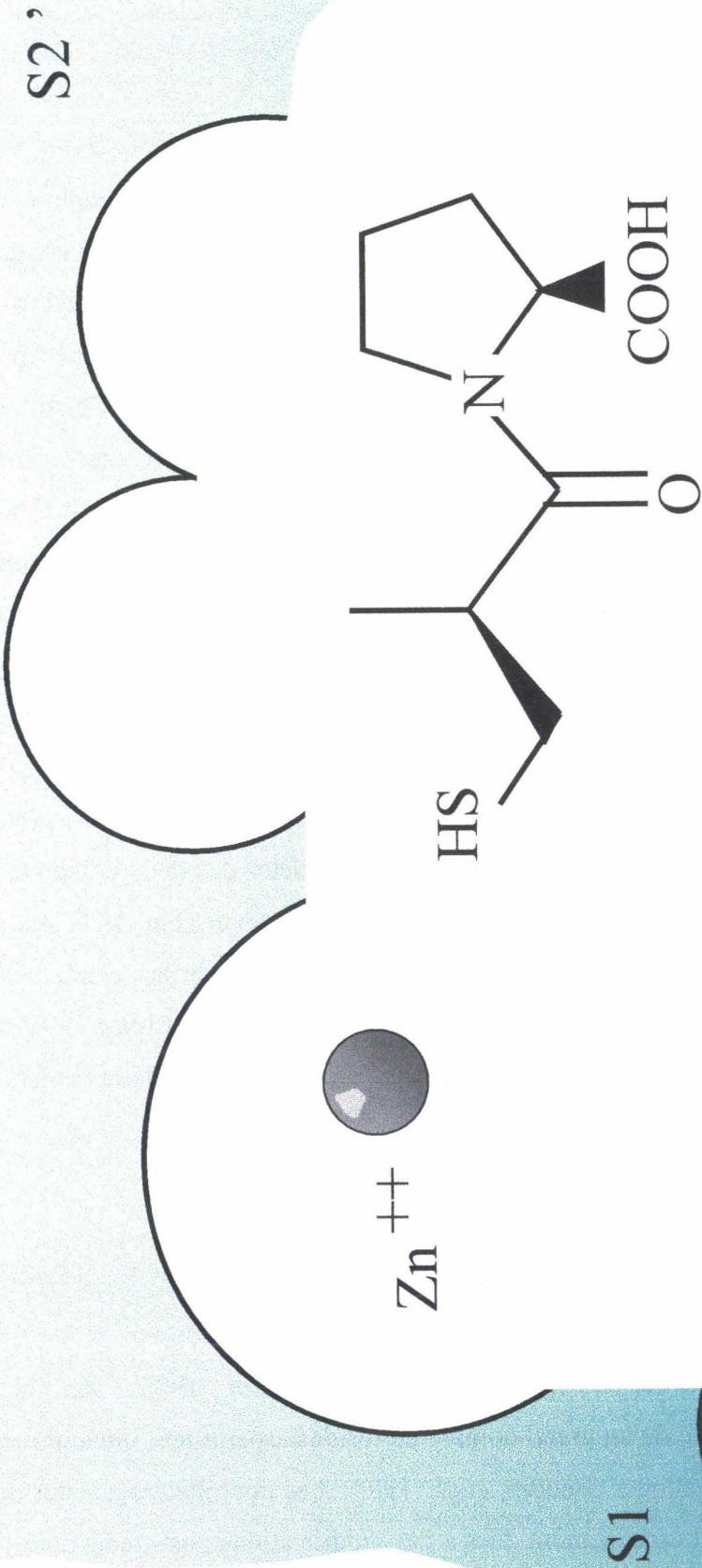
En ce qui concerne le nombre et les positions des cystéines, ce sont les mêmes dans les deux domaines. Il y a 17 sites potentiels de glycosylation (des asparagines) dans la molécule (Saddhukan, R., *et al.*, 1996a, b). La plupart de ces sites sont regroupés dans la région N terminale de la protéine et dans la région de jonction entre les deux domaines homologues (Fig 7). On trouve également dans les deux domaines de l'ACE somatique, une histidine (comme dans la thermolysine) qui stabiliserait l'état de transition par formation d'une liaison hydrogène avec une molécule d'eau. D'après les propriétés des deux domaines recombinants de l'ACE *in vitro*, il semble que le domaine C soit responsable de la majeure partie de l'activité de l'ACE à la surface des cellules endothéliales (Soubrier, *et al.*, 1988 ; Lattion, *et al.*, 1989 ; Wei, *et al.*, 1991 ; Soubrier *et al.* 1993a, b ; Lamango et Isaac 1994). Les structures primaires de ces isoformes ont été déterminées par clonage moléculaire (Ehlers, *et al.*, 1989 ; Sen, *et al.*, 1990 ; Corvol, *et al.*, 1995).

2-4) Glycosylation de l'enzyme:

L'ACE humaine est très hydrophobe (Lanzillo, *et al.*, 1985), son pHi est assez bas (4.5-4.7). Ceci peut être dû au grand nombre de résidus aspartiques, glutamiques mais aussi à la présence d'acides sialiques (Baudin, *et al.*, 1988). Les microhétérogénéités que l'on trouve au niveau des pHi sont certainement dues à des modifications post-traductionnelles, soit dans

Figure 10:

ACE



CAPTOPRIL

la chaîne polypeptidique, soit dans la partie glycanique, qui pourraient caractériser les isoformes (Fig 7) (Lanzillo, *et al.*, 1983). En effet, les sucres constituent 18 à 30 % de la masse moléculaire de l'ACE (Ehlers, *et al.*, 1992).

L'ACE est fortement glycosylée et ces résidus glycosylés pourraient donner un accès différent aux sites enzymatiques. La glycosylation est post-traductionnelle et organe-dépendante. L'absence de O-glycosylation sur les ACE testiculaires humaine et de lapin n'affecte pas leur activité catalytique ni leur stabilité (Kasturi, *et al.*, 1994 ; Kastin, *et al.*, 1994). En revanche, *in vitro*, l'ACE germinale de lapin dépourvue de glycosylation (N et O) est rapidement dégradée. Ceci indique un rôle possible des chaînes oligosaccharidiques dans la protection de l'enzyme vis à vis d'une dégradation protéolytique intracellulaire (Kastin, *et al.*, 1994). L'ACE pulmonaire mature dépourvue d'acides sialiques conserve une activité enzymatique intacte (Conroy, *et al.*, 1978). De même, un mutant ACE t sans O-glycosylation conserve son activité enzymatique (Ehlers, *et al.*, 1992).

Dans certaines expériences, le changement de glycosylation de l'ACE confère des propriétés biochimiques différentes. Chez les insectes et en particulier chez la drosophile, la structure primaire de l'AnCE (ACE de la drosophile) contient la séquence Asn-Xaa-Ser/Thr en 3 exemplaires permettant ainsi, l'addition potentielle de chaînes N-oligosaccharidiques (Cornell *et al.*, 1995 ; Taylor, *et al.*, 1996). Ceci diffère fondamentalement de l'ACE somatique humaine qui possède 17 sites de N-glycosylation, et de l'ACE testiculaire qui en a 8 (Lattion *et al.*, 1989) ainsi que des sites d'O-glycosylation dans la région N terminale. L'ACE nouvellement synthétisée acquiert les deux types de glycosylation (O et N) avant son clivage et sa sécrétion (Kastin, *et al.*, 1994 ; Bénéteau-Burnat, *et al.*, 1994).

3) Les inhibiteurs de l'ACE : (Fig.10)

L'impact du rôle de l'ACE, notamment dans la régulation de fonctions comme le maintien de la pression sanguine, est mesuré essentiellement grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'enzyme. Plus encore, les inhibiteurs sont le « fleuron » du cortège de médicaments prescrits dans les pathologies associées à l'hypertension et les maladies cardiaques en général. La compréhension du mode d'action de ces molécules est donc nécessaire au développement de leur utilisation thérapeutique, mais aussi pour celui des études biochimiques de cette enzyme (Fig 10) (Corvol, *et al.*, 1988 ; Bevilacqua, *et al.*, 1996 ; De Lombaert, *et al.*, 1996).

Le domaine N de l'ACE est le premier site exposé aux substrats et aux inhibiteurs présents dans le sang puisque l'enzyme est ancrée dans la membrane du côté C terminal. Les inhibiteurs se lient aux 2 sites actifs selon leur structure et leur affinité.

Cette affinité varie à cause des différences de taux de dissociation des deux sites actifs (Wei *et al.*, 1992 ; Perich, *et al.*, 1994). Selon le modèle de Perich et collaborateurs (1994), un inhibiteur avec une hydrophobicité élevée et une chaîne latérale volumineuse s'accroche au domaine C terminal avec une plus grande affinité qu'au domaine N. En revanche, un inhibiteur avec une petite chaîne latérale et sans propriétés hydrophobes se lie de préférence au site N terminal. Cependant, les mêmes auteurs expliquent que la capacité du captopril, un inhibiteur peu hydrophobe, à mieux reconnaître le site N, est davantage due à sa propre nature sulfhydrique qu'à la taille de sa chaîne latérale. Les dérivés carboxy-alkylés avec une plus grande chaîne latérale reconnaissent le domaine C avec une plus grande affinité. Les inhibiteurs phosphorylés reconnaissent les deux sites avec la même affinité. Pour le moment, aucun indice de coopération entre les deux domaines n'a été mis en évidence (Barrett, 1996 ; Deddish, *et al.*, 1996).

4) Rôles des ACE germinale et somatique

4-1) L'ACE testiculaire :

La forme testiculaire (ACE t) possède un site actif C homologue à celui de l'ACE somatique (ACE s) (Fig 9). C'est le résultat d'une transcription « alternative » tissu-spécifique intervenant dans le 12^{ème} exon, qui se poursuit et se termine avec les exons « normaux » du côté 3', mais en utilisant différents sites de polyadénylylation (Thekkumkara *et al.*, 1992). L'ACE t aurait un rôle dans la spermatogenèse (Vanha-Pattula, *et al.*, 1985 ; Krege, *et al.*, 1995). Elle est en effet exprimée dans les formes matures des cellules germinales (Cushman, *et al.*, 1971) et est probablement sous le contrôle d'androgènes. A l'heure actuelle, le substrat de cette ACE t au niveau des cellules germinales n'a pas encore été identifié de façon claire. Pourtant, des expériences récentes de « knock out » sur le gène de l'ACE de souris montrent l'implication de l'enzyme dans la fertilité (Velletri, *et al.*, 1985).

4-2) L'ACE somatique :

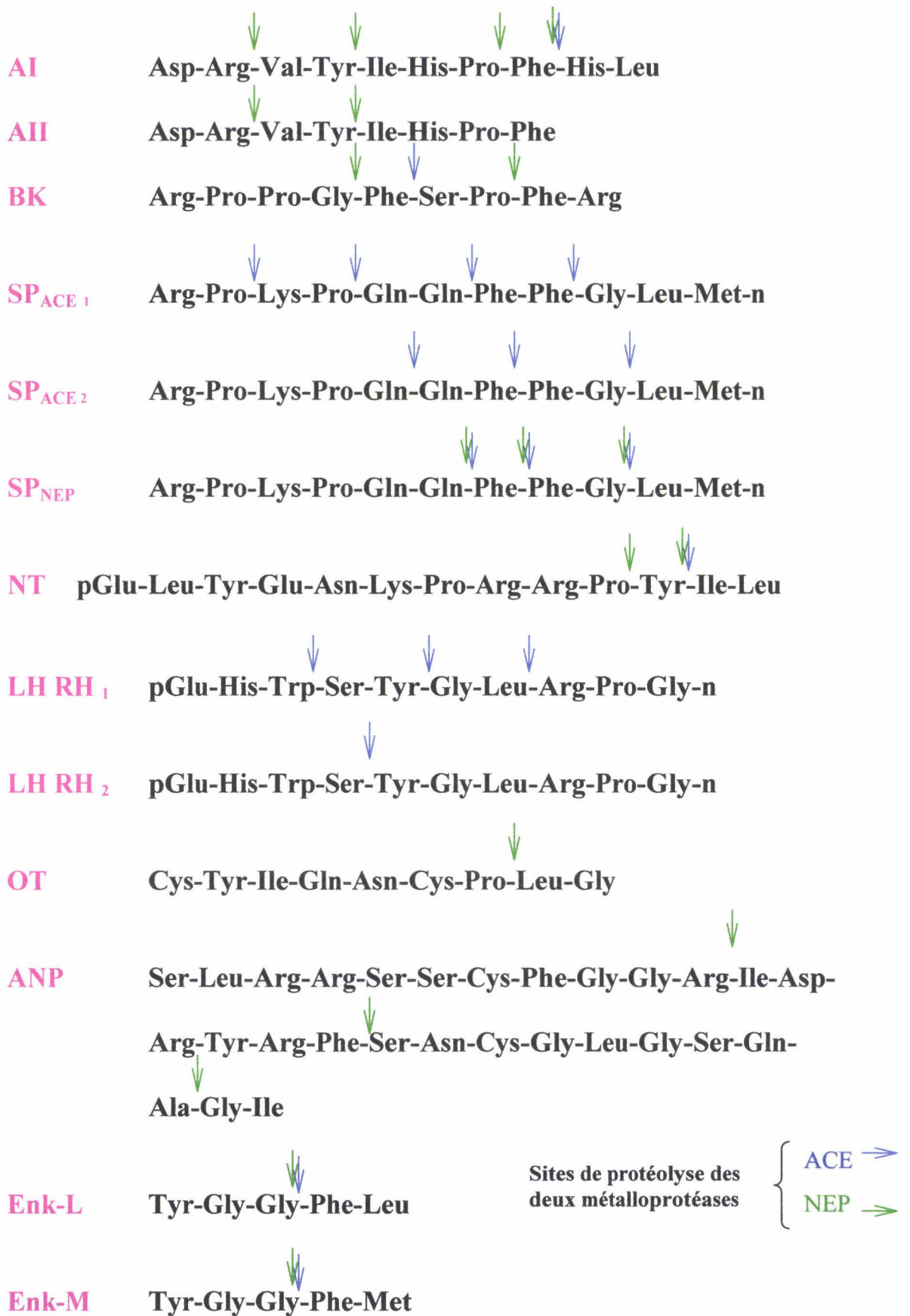
Le rôle des ACEs est multiple, il serait dépendant du tissu et du compartiment cellulaire où elle est contenue. Une revue non exhaustive est présentée ci-dessous.

De nombreuses études montrent de grandes différences du taux d'ACE dans le plasma entre les individus, alors qu'il est stable pour une même personne. Cette observation met en évidence un solide contrôle à long terme du niveau de l'ACE dans le plasma. Il serait d'origine génétique. Le polymorphisme génétique de l'ACE serait directement responsable du taux de l'enzyme dans le sérum. Le locus lui-même (situé au niveau de l'exon 16) serait responsable des variations du contrôle génétique de l'ACE contenue dans le sérum (Cambien, *et al.*, 1992).

Le système RAS est activé localement, en réponse à une augmentation du stress (Chipkin, *et al.*, 1982). En revanche, la présence continue d'AII semble avoir d'importantes conséquences pathophysiologiques. En effet, si cela se produit au niveau intracardiaque, cela entraîne une hypertrophie de myocytes, un remodelage myocardique, de la fibrose, une vasoconstriction des petites artères coronaires, une arythmie et un dysfonctionnement diastolique du aux effets de l'AII sur l'homéostasie calcique (Bevilacqua, *et al.*, 1996). Des effets locaux de l'AII, sur l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules ont été rapportées au niveau des vaisseaux sanguins et du rein.

Par ailleurs, un substrat naturel du domaine N terminal de l'ACE a récemment été identifié, il s'agit du peptide hémorégulateur : N-acétyl-Ser-Asp-Lys-Pro, également connu sous le nom de seraspenide (Bevilacqua, *et al.*, 1996 ; Lamango *et al.*, 1996). Le domaine N de l'ACE clive ce térapeptide plus vite que le domaine C. L'implication de l'ACE dans la régulation du taux de seraspenide a récemment été démontrée dans les études *in vivo* chez l'homme par Corvol *et al.* (1995). La seraspenide est une protéine qui a un rôle régulateur important dans la myélopoïèse. L'inhibition de l'ACE pourrait donc avoir des implications hématologiques mais aussi pourrait jouer un rôle immunologique important (Rousseau, *et al.*, 1995). En effet, les lymphocytes T et les monocytes, sont caractérisés par la présence de mRNA codant l'ACE de façon constitutive et/ou inductible. L'ACE facilite la présentation de certains peptides synthétisés de façon endogène, au CMH-I présent au niveau des lymphocytes T cytotoxiques. Dans ce cas, l'ACE ne semble fonctionner que dans le seul

Figure 11 : Substrats et sites de protéolyse de l'ACE et de la NEP



Légende { SP_{ACE 1} : 1er type de clivage de la substance P par l'ACE et ses sites de protéolyse : ➔
 SP_{ACE 2} : 2^{ème} façon pour l'ACE de cliver ce substrat : ➔
 LH-RH 1, 2 : sites de protéolyse de deux clivages distincts du substrat par l'ACE ➔

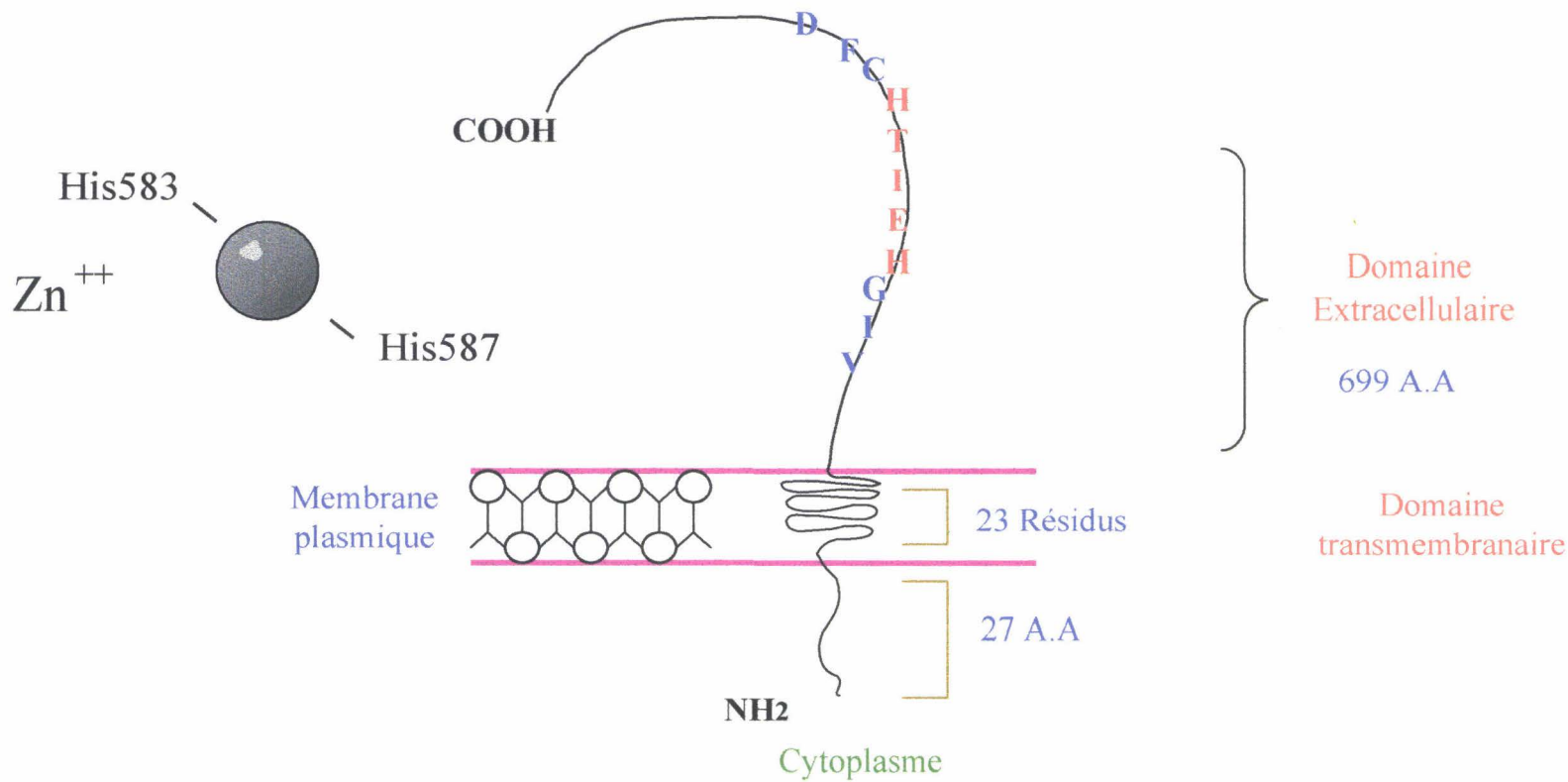
compartiment intracellulaire de sécrétion des cellules présentatrices d'antigènes (Eisenhor, *et al.*, 1992 ; Costerousse, *et al.*, 1993).

D'autre part, la stimulation de la réponse immunitaire par un peptide antigénique de classe I, comme le virus-1 de l'immunodéficience humaine (HIV-1) ou un peptide dérivé de GP-160, nécessite un peptide produit grâce à l'ACE (Kozlowski, *et al.*, 1992). Ainsi, les inhibiteurs de l'ACE peuvent affecter le processus de présentation de l'antigène aux lymphocytes T, et donc influencer la réponse immunitaire (Kozlowski, *et al.*, 1993). L'utilisation du captopril, peut en inhibant l'ACE, aider à neutraliser la fibrose des poumons de rats irradiés, vraisemblablement en bloquant la prolifération de fibroblastes. On observe par ailleurs des niveaux élevés d'ACE dans le plasma de patients atteints de maladies granulomateuses, d'hyperthyroïdisme ou encore chez les personnes diabétiques (Lieberman, 1975). L'ACE intervient de façon indirecte par sa contribution à la formation d'AII et d'AI. L'AII est un facteur de croissance pour le tissu vasculaire et contribue donc potentiellement à la pathophysiologie de plusieurs maladies cardiovasculaires. Saward et Zahradka (1997) ont démontré l'implication de la phosphatidylinositol 3-kinase (P13K) dans la cascade de transduction qui entraîne la croissance de cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins, du moins *in vitro*. Or, il apparaît clairement que le traitement de ces cellules par de l'AII entraîne une stimulation immédiate de la phosphorylation de protéines et de l'expression de gènes, conduisant finalement à la synthèse de DNA et à la division cellulaire. L'ACE interviendrait également de façon indirecte, via l'AII, sur le développement de maladies cardiovasculaires (Saward et Zahradka, 1997).

En ce qui concerne l'AI, elle active *in vivo*, l'expression des canaux ioniques échangeurs de calcium et de sodium, mais également les canaux calciques voltages dépendants de type L (L-VDCC) dans le cœur de rat. Cette activation nécessiterait l'implication de l'AII et des récepteurs AT1. Finalement, le RAS stimulerait à la fois l'activité de l'échangeur Na/Ca et l'expression de ce système de transport dans son action sur le cœur des mammifères. Dans ce cadre, l'ACE joue un rôle important dans la régulation du métabolisme de l'AII et est donc parfois impliquée dans des processus pathogènes (Krizanova, *et al.*, 1997).

4-3) Rôle d'endopeptidase pour l'ACE somatique : Fig.11

L'ACE peut également fonctionner en tant qu'endopeptidase en hydrolysant des dipeptides. En effet, elle est capable de cliver les enképhalines (Hugues, *et al.*, 1975 ; Salzet *et*



- 12 Cystéines impliquées dans des ponts disulfures.
- 5 sites de N-glycosylation.

Figure 12:

Structure de l'Endopeptidase 24-11

al., 1995a) et les dipeptides aminés de la leu5 enképhalinamide et de la met5 enképhalinamide, ou encore un dipeptide amidé puis un tripeptide amidé de la substance P. La codistribution de l'ACE et de la substance P dans certaines régions du cerveau laisse supposer que l'enzyme intervient dans le métabolisme de ce peptide dans le système nerveux central (Barrett, 1996). Elle peut en outre cliver à pH neutre la neurotensine (Skidgel *et al.*, 1984), la β néoendorphine, les dynorphines, et la CCK8 (Skidgel, *et al.*, 1987). Néanmoins, beaucoup de ces substrats ont été hydrolysés par l'enzyme *in vitro* (Fig 11) et il n'y a pour l'instant, pas de démonstrations probantes d'un tel spectre d'action de l'ACE *in vivo*.

5) Les ACEs sous forme soluble :

En culture de tissu, aussi bien qu'*in vivo*, le domaine extracellulaire de l'ACE peut être libéré dans le milieu de culture ou dans les fluides corporels, par un clivage protéolytique régulé au niveau du domaine d'ancrage membranaire (Beldent, *et al.*, 1993). Il est vraisemblable qu'une température élevée et/ou un milieu très alcalin, et certainement d'autres facteurs provoquent un changement de conformation de l'enzyme à l'origine d'un pont reliant les deux domaines, ce qui entraîne sa solubilisation.

Ce phénomène peut aussi bien intervenir dans la voie de synthèse constitutive des molécules que dans celle qui est inductible. La sécrétion ou la solubilisation implique soit une protéase, soit une phospholipase selon le type d'ancrage de la protéine. La sécrétase potentielle de l'ACE pourrait être une métallopeptidase membranaire ancrée dans la membrane plasmique (Hooper, *et al.*, 1997). Différentes études s'accordent à montrer que l'activité de la sécrétase peut être induite par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ou un activateur de la protéine kinase C, ce qui implique l'existence d'un mécanisme cellulaire de régulation de la conversion de l'ACE t membranaire en forme soluble (Ramchandran, *et al.*, 1996). La sécrétion est inhibée de façon efficace par l'inhibiteur appelé composé 3 (Ramchandran, et Sen, 1995). Le site de clivage de la forme soluble de l'ACE est généralement situé près de la membrane de façon à libérer dans le milieu extracellulaire la plus petite forme active. La forme soluble de l'ACE N terminale apparaît plus résistante aux protéases que le domaine C en dépit de leur homologie de séquence (Sadhukhan et Sen, 1996).

L'ACE a par ailleurs été isolée d'autres mammifères (lapin, porc, cochon d'Inde...) et des enzymes apparentées à l'ACE appelées : ACE-like, ont été identifiées chez un certain

nombre d'espèces non mammaliennes telle que l'ACE-like isolée de l'organe électrique du poisson *Torpedo marmorata* (Turner, *et al.*, 1987), du poisson *Carassius auratus* (Okawara, *et al.* 1988), du poulet (Esther, *et al.*, 1997). Chez les invertébrés, une ACE (nommée AnCE) a été identifiée chez la mouche *Musca domestica* (Lamango, *et al.* 1994) ainsi que chez *Drosophila melanogaster* (Takéi *et al.*, 1993 ; Cornell *et al.*, 1995).

III] Le NON RAS : L'endopeptidase 24.11=CD10= =enképhalinase=CALLA=NEP

1) Introduction :

Chez les vertébrés, l'ACE est capable de se comporter soit comme une carboxypeptidyl dipeptidase, soit comme une endopeptidase. Cependant, cette activité est limitée à quelques neuropeptides de type bradykinine ou Atrial Natriuretic Factor (ANF), alors qu'une autre métalloprotéase : l'endopeptidase 24.11 intervient dans le métabolisme de nombreux peptides. Cette enzyme fait preuve d'une spécificité assez large et représente l'activité principale du catabolisme de la plupart des neuropeptides étudiés (Barrett, 1996).

L'endopeptidase 24.11 (E C 3.4.24.11) est une glycoprotéine localisée au niveau de la membrane plasmique de nombreux tissus (Fulcher *et al.*, 1983a ; Fulcher et Kenny, 1983b ; Relton, *et al.*, 1983). Cette enzyme ressemble à la thermolysine (E C 3.4.24.4) par sa spécificité et sa sensibilité au phosphoramidon et au thiorfan (Fulcher *et al.*, 1982). Elle a été clonée par le groupe de Malfroy (Malfroy, *et al.*, 1982).

L'endopeptidase neutre est constituée de 749 acides aminés. Son site actif est en contact avec des fluides biologiques où circulent les peptides messagers, par exemple dans la fente synaptique. Un court fragment de 27 acides aminés est localisé à l'intérieur de la cellule et il est suivi d'un segment hydrophobe de 23 résidus qui ancre la protéine dans la membrane plasmique (Fig 12). Les 699 acides aminés suivants forment le domaine extracellulaire hydrophile qui contient notamment 12 cystéines impliquées dans des ponts disulfures et 5 ou 6 sites de N glycosylation (sites de fixation des sucres) probablement tous substitués, car la masse moléculaire déterminée de façon expérimentale est supérieure (90 kDa) à celle obtenue par le calcul (85.4 kDa). En fait, le poids moléculaire de l'endopeptidase varie de 87 kDaltons à 95 kDaltons selon son origine. Les séquences des endopeptidases du rein, du cerveau de rat

ou de placenta humain ont été déterminées par B. Malfroy (1982). Il semble que les formes de l'endopeptidase. 24.11 contenues dans le rein et dans le cerveau soient des produits du même gène, mais seraient ensuite issus de différents processus post traductionnels dans leurs tissus respectifs. Les résultats montrent en effet, que la NEP peut exister sous de multiples formes moléculaires grâce à des différences de glycosylation et probablement de la chaîne polypeptidique (Vida et Hersh, 1992). En outre, les microvillosités des tubes contournés du rein sont particulièrement riches en endopeptidase 24.11 qui constitue 4% des protéines membranaires (Relton, *et al.*, 1983 ; Fulcher et Kenny, 1983a ; Schwartz, *et al.*, 1986).

Une enzyme avec des caractéristiques similaires est également présente dans le cerveau mammalien, mais en moins grande quantité. Elle inactive les peptides connus sous le nom d'enképhalines en hydrolysant leur liaison Gly³-Phe⁴ (Gorenstein et Snyder, 1979 ; Roques *et al.*, 1980 ; Fulcher *et al.*, 1982). L'enzyme responsable de l'hydrolyse de la liaison Gly³-Phe⁴ des enképhalines a été identifiée par Schwartz et collaborateurs en 1978 et dénommée enképhalinase, puis Gafford et collaborateurs l'ont renommée ensuite neutral metallopeptidase (NEP) (Gafford, *et al.*, 1983 ; Schwartz, *et al.* 1986). Elle s'est avérée très proche ou identique à la protéinase neutre des bordures en brosse rénales encore dénommée : métalloendopeptidase membranaire (E. C. 3.4. 24.11) dont sa présence en dehors des microvillosités rénales et intestinales et sa spécificité biochimique exacte étaient encore ignorées il y a peu de temps (Chipkin, *et al.*, 1988). Vida et collaborateurs (1992) ont mis en évidence l'existence d'endopeptidases de tailles variables, c'est à dire qui possèdent une masse moléculaire plus ou moins importante en fonction du tissu où elles sont produites. Ceci pourrait être dû aux différences de glycosylation, mais également à des différences de charges.

Elle contient en outre 7,2 % de résidus glucidiques. La distribution de l'endopeptidase 24.11 dans le cerveau est hétérogène mais bien corrélée à celle des enképhalines. Cette endopeptidase semble identique (d'un point de vue immunologique) à l'endopeptidase 24.11 du rein et peut hydrolyser un certain nombre de neuropeptides dont la substance P (Matsas *et al.*, 1983), la cholécystokinine (Deschodt-Lanckman et Strosberg, 1983 ; Matsas, *et al.*, 1984), l'ocytocine (Welches, *et al.*, 1993) et la neurotensine (Kitabji, *et al.*, 1992).

2) Localisation de l'endopeptidase 24. 11 : Fig 6

Le striatum est une des sources les plus riches en endopeptidase 24.11 dans le cerveau. On trouve également cette enzyme dans les cellules épendymaires, dans les glandes hypophysaire, surrénales ou salivaires. La NEP clive de nombreux peptides actifs dont les enképhalines au niveau d'acides aminés hydrophobes du côté N terminal. La distribution de la NEP dans les différents tissus est dépendante des espèces (Welches, *et al.*, 1993). La NEP possède une ontogénie similaire à celle des enképhalines (De La Baume *et al.*, 1981). Elle clive des liaisons peptidiques qui impliquent les groupes aminés de résidus hydrophobes (Kerr et Kenny, 1974a, b), mais l'interaction d'autres résidus situés autour du site actif ont également une grande influence sur l'efficacité de l'hydrolyse (Stephenson et Kenny, 1987). Les auteurs proposent l'hypothèse selon laquelle l'endopeptidase 24.11 pourrait jouer un rôle dans l'inactivation de neurotransmetteurs au niveau synaptique (Fulcher *et al.*, 1982 ; Matsas *et al.*, 1983). Dans les microvillosités de l'intestin et du tubule proximal des néphrons, elle couperait les petits peptides des fluides digestif et tubulaire et par conséquent, participerait à la libération des acides aminés transportés ensuite dans la circulation sanguine vers les organes.

Dans d'autres tissus et particulièrement sur les membranes synaptiques du cerveau, elle semble participer à l'inactivation physiologique des neuropeptides libérés à partir des cellules nerveuses, c'est à dire qu'elle fonctionne comme une neuropeptidase. Mais son rôle ne peut être directement extrapolé à partir de considérations purement biochimiques puisqu'elle n'hydrolyse pas toujours les peptides étudiés *in vivo*, alors qu'elle le fait pourtant *in vitro*. La répartition de l'enzyme coïncide en outre avec celle des récepteurs opioïdes de type μ réprimant la douleur, et celle des récepteurs δ influant sur le comportement (Wacksman *et al.*, 1986b ; Roques, 1989). On la trouve dans de nombreux tissus : le système nerveux central, les poumons, les testicules, l'intestin, et même les neutrophiles, les fibroblastes, les cellules épithéliales, c'est d'ailleurs la seule enzyme présente à la surface de ce type cellulaire. La NEP est abondante au niveau des surfaces en contact avec le fluide cérébrospinal (plexus choroïde, cellules épendymaires). Elle est présente sous forme soluble dans l'urine. C'est la kininase majeure de l'urine du rat (Erdos et Skidgel, 1989 ; Casale *et al.*, 1994-1995). L'endopeptidase 24.11 comme l'ACE, est concentrée au niveau de la bordure en brosse des tubules proximaux du rein où elles ont des fonctions similaires, c'est à dire éliminer les peptides qui entrent dans le néphron après la filtration glomérulaire.

Rôle de la NEP dans l'immunité

La NEP est aussi localisée dans les zones du cerveau impliquées dans le contrôle de la douleur. La découverte récente la plus surprenante, reste cependant celle de quantités importantes d'endopeptidase 24.11 à la surface des lymphocytes B chez les malades atteints de leucémie lymphoblastique aigue. La présence d'endopeptidase est transitoire dans les conditions normales. Elle est pérennisée à la surface des lymphocytes B devenus malins parce qu'ils ne se différencient pas en cellules normales (Le Bien et Mac Cormack, 1989). Parmi les cellules immunitaires, les neutrophiles contiennent des quantités significatives d'endopeptidase 24.11 (266 +/- 130 nanomoles par mg de protéine et par heure) alors que l'on observe beaucoup moins d'enzymes dans les lymphocytes T, B et les monocytes. L'endopeptidase 24.11 est par contre présente sur les neutrophiles, les fibroblastes, et les formes cellulaires immatures (blastes) des patients atteints de lymphomes de lignées cellulaires B ou T des tissus thymiques et des tissus non hématopoiétiques. Il a également été prouvé que beaucoup des lymphocytes portant l'endopeptidase appelée dans ce cas CALLA présentent des concentrations élevées en enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). La CALLA (common acute lymphoblastic leukemia antigen) est également appelée CD10 et est présente au niveau des cellules immunitaires.

D'autre part, l'endopeptidase 24.11 attachée à la membrane cellulaire, module la réponse chimiotactique des neutrophiles vis à vis du peptide Formyl-Met-Leu-Phe produit par des bactéries comme *Escherichia coli* (Lesser, *et al.*, 1996).

3) Activité de l'endopeptidase 24.11 de mammifères (Fig. 11)

Stephenson et Kenny (1987) ont montré que l'endopeptidase 24.11 joue un rôle déterminant dans l'attaque initiale de tous les neuropeptides étudiés. Les meilleurs substrats de l'endopeptidase 24.11 semblent être des petits peptides ou des peptides de taille intermédiaire. De plus, l'enzyme est située face à l'espace extracellulaire et peut donc cliver les peptides qui sont libérés de la cellule (Matsas, *et al.*, 1983).

L'enzyme est inhibée de façon spécifique par le phosphoramidon et le thiorfan. Elle est inhibée par l'EDTA (éthylène diamine tétraacétique) et le 1.10-phénanthroline. Elle est dépendante du zinc. La NEP est inhibée par les anions Cl^- et PO_4^{3-} mais également par les réactifs thiols (DTT, β mercaptoéthanol).

Les autres facteurs qui semblent influencer l'activité de l'enzyme sont la concentration locale, la localisation anatomique par rapport aux terminaisons peptidergiques et aux récepteurs post synaptiques correspondants, et la concentration extracellulaire du neuropeptide dans l'espace synaptique. Il faut également prendre en compte les propriétés, les qualités et la localisation d'autres peptidases également capables de couper le neuropeptide (Almenoff et Orłowski, 1984).

Elle peut également hydrolyser et inactiver les peptides de la famille des tachykinines dont la substance P et les neurokinines (A en particulier) (Hooper, *et al.*, 1985). Le clonage du cDNA et des expériences de mutagenèse ont montré qu'un acide glutamique du site actif est fondamental pour la catalyse ainsi que deux histidines responsables de la liaison avec un atome de zinc (cofacteur). De plus, la NEP possède une séquence consensus : VIGHEITHCFD présente dans de nombreuses métallopeptidases (Barrett, 1996).

La NEP peut aussi participer à la régulation de la pression sanguine et à celle de l'équilibre hydrominéral à travers l'inactivation des kinines. L'étude de l'action de la NEP mammalienne sur la bradykinine et l'AII, montre que l'enzyme humaine clive des liaisons adjacentes à la Phe, Leu, Ile, Val, c'est à dire des acides aminés hydrophobes, du côté N terminal (Kerr et Kenny, 1974). Tous ces résultats suggèrent que la qualité principale de l'enzyme est de posséder une activité d'endopeptidase bien qu'elle puisse adopter un rôle de dipeptidyl carboxypeptidase.

La NEP peut aussi cliver l'AI au niveau de Pro⁷-Phe⁸, ce qui ne donne pas une angiotensine active, contrairement à l'action de l'ACE (Yang, *et al.*, 1970). Elle peut également inactiver l'AII au niveau de la liaison Tyr⁴-Ile⁵. Ce clivage conduit à la formation de deux térapeptides N et C terminaux.

La sélectivité des métallopeptidases vis à vis des molécules qu'elles hydrolysent dépend de la nature et de l'encombrement des acides aminés qui encadrent l'atome de zinc et qui occupent les sous sites dits S1, S1' et S2'. Pour que la réaction d'hydrolyse ait lieu, il faut que la géométrie de l'enzyme et celle de la molécule à hydrolyser soient compatibles, c'est à dire que les chaînes latérales de cette dernière puissent s'insérer dans les sous sites S1, S1' et S2' (qui forment le site actif), puis que des liaisons hydrogène s'établissent entre le substrat et la peptidase. Toutes ces métallopeptidases présentent une séquence homologue ou consensus contenant notamment deux histidines et un acide glutamique. Les deux histidines sont liées au zinc, l'acide glutamique est lui impliqué dans la catalyse et permet la polarisation d'une molécule d'eau.

3-1) Les angiotensines, substrats de l'endopeptidase 24.11

L'AI et l'AII sont hydrolysées par la NEP au niveau d'un site commun : la liaison Tyr-Ile. L'apparition du peptide majeur résultant de l'hydrolyse de Pro⁷-Phe⁸ par la NEP est inhibée à 83 % par le phosphoramidon. En revanche, la réaction n'est pas affectée par d'autres inhibiteurs.

En ce qui concerne l'AII, la principale attaque intervenant au niveau de la liaison Tyr⁴-Ile⁵ (qui génère donc deux peptides) est complètement supprimée par le phosphoramidon. La libération du dipeptide His-Leu de l'AI typiquement due à l'action de l'ACE, dépend beaucoup de l'action de l'endopeptidase suivie d'une attaque par une aminopeptidase. L'attaque de l'endopeptidase 24.11 se déroule en 3 points : Glu⁶-Phe⁷, Phe⁷-Phe⁸ et Gly⁹-Leu¹⁰ dans la séquence C terminale (Matsas *et al.*, 1983). L'ACE représente 0.5 à 1 % des protéines membranaires au niveau des microvillosités des tubules proximaux de rein alors que la NEP représente 4 % de ces protéines (Fulcher et Kenny, 1983a). Ceci explique que même à une concentration peptidique assez faible, l'activité de l'endopeptidase 24.11 prédomine sur celle de l'ACE.

Les autres substrats de l'endopeptidase 24.11

Pour tous les neuropeptides, la principale attaque est due à l'endopeptidase 24.11. Celle-ci a lieu initialement au niveau des sites impliquant des résidus hydrophobes puis elle est secondée soit par l'ACE, soit par des aminopeptidases. L'endopeptidase 24.11 a comme substrats les peptides suivants : la bradykinine, la neurotensine (Kitabji, *et al.*, 1992), la substance P (Mauborgne, *et al.*, 1991), l'AVP, l'ocytocine, la LH-RH (Fig 11) (Mac Kelyv et Blumberg, 1986). La NEP a des Km plus élevés et sans grande variation par rapport à l'ACE et la prolyl endopeptidase reflétant une affinité très importante pour l'ensemble des neuropeptides. Elle semble moins sensible aux différences entre les peptides. Le taux d'endopeptidase dans la circulation sanguine augmente lors de certaines maladies. La NEP serait alors responsable de la libération d'angiotensine 1-7 dans l'endothélium vasculaire (Welches, *et al.*, 1993).

L'endopeptidase 24.11 est la seule enzyme capable d'initier l'hydrolyse de l'ocytocine et de l'Arg⁸-vasopressine (Stephenson et Kenny, 1987) mais également l'hydrolyse et l'inactivation de la famille des tachykinines, dont la substance P et la neurokinine A. Les tachykinines partagent la même extrémité C terminale et possèdent des activités biologiques

similaires, comme une action sur la contraction des muscles lisses, la réduction de la pression sanguine et la stimulation de la sécrétion glandulaire. Ces peptides peuvent aussi fonctionner comme neurotransmetteurs dans le cerveau.

3-2) L'ANF : Atrial Natriuretic Factor

L'endopeptidase 24.11 a également un rôle prépondérant dans le métabolisme de l'Atrial Natriuretic Factor (ANF). L'ANF est une hormone qui a été découverte dans l'atrium cardiaque de mammifères. Ce peptide fait partie d'une famille de molécules possédant une puissante activité natriurétique, diurétique et hypotensive. Il est localisé dans des granules de stockage du muscle atrial. Le phosphoramidon inhibe la formation de 80 à 100 % des produits de l'hydrolyse de l'ANF. En revanche, l'ACE n'hydrolyse pas l'ANF. La dégradation de l'ANF est initiée majoritairement par l'endopeptidase 24.11. On peut noter que l'endopeptidase 24.11 clive spécifiquement au niveau de l'alanine (Ala 17). Ceci a été confirmé par des tests sur le substrat Ala-Ala-Ala-Ala. Celui-ci est effectivement hydrolysé en Ala-Ala alors que le tripeptide (Ala-Ala-Ala) n'est pas attaqué. Il est intéressant de voir que dans le cortex surrénalien, l'endopeptidase 24.11 est directement localisée à la surface des cellules glomérulaires où elle peut servir à inactiver l'ANF et d'autres peptides (Stephenson et Kenny, 1987 ; Sonnenberg, *et al.*, 1988). Cette enzyme est donc également impliquée dans l'homéostasie de la balance hydrique et de la pression sanguine. On trouve peu de NEP dans les vaisseaux sanguins par rapport à l'ACE (Roques et Beaumont, 1990).

3-3) La substance P

Par ailleurs, la NEP que l'on soupçonne de participer au métabolisme de la substance P dans le cerveau, intervient également dans le catabolisme pulmonaire de ce peptide. L'endopeptidase neutre peut cliver la substance P en trois points pour donner des fragments inactifs. L'enzyme est présente dans des préparations synaptosomiales enrichies mais a également été détectée au niveau des membranes des cellules gliales (Turner, *et al.*, 1985).

3-4) La bradykinine

L'endopeptidase est capable de cliver des substrats plus grands que ceux de l'ACE. La NEP humaine clive l'avant dernière liaison des enképhalines et de la bradykinine mais elle

hydrolyse aussi des liaisons peptidiques plus distantes du côté C terminal, donc ce n'est pas vraiment une peptidyl dipeptidase mais plutôt une enzyme de type endopeptidase (Gafford, *et al.*, 1983). Ces auteurs rapportent que la NEP ne convertit pas l'AI en AII mais clive l'AI au niveau de Pro⁷-Phe⁸. Ce clivage donne 2 tétrapeptides N et C terminaux. Almenoff et collaborateurs (1981, 1984) ont montré que le clivage de la bradykinine intervient plutôt au niveau de Gly⁴-Phe⁵ qu'au niveau de Pro⁷-Phe⁸. Gafford, J. T. et collaborateurs ont montré que le clivage au niveau de Pro⁷-Phe⁸ est l'étape la plus importante dans l'inactivation de la bradykinine.

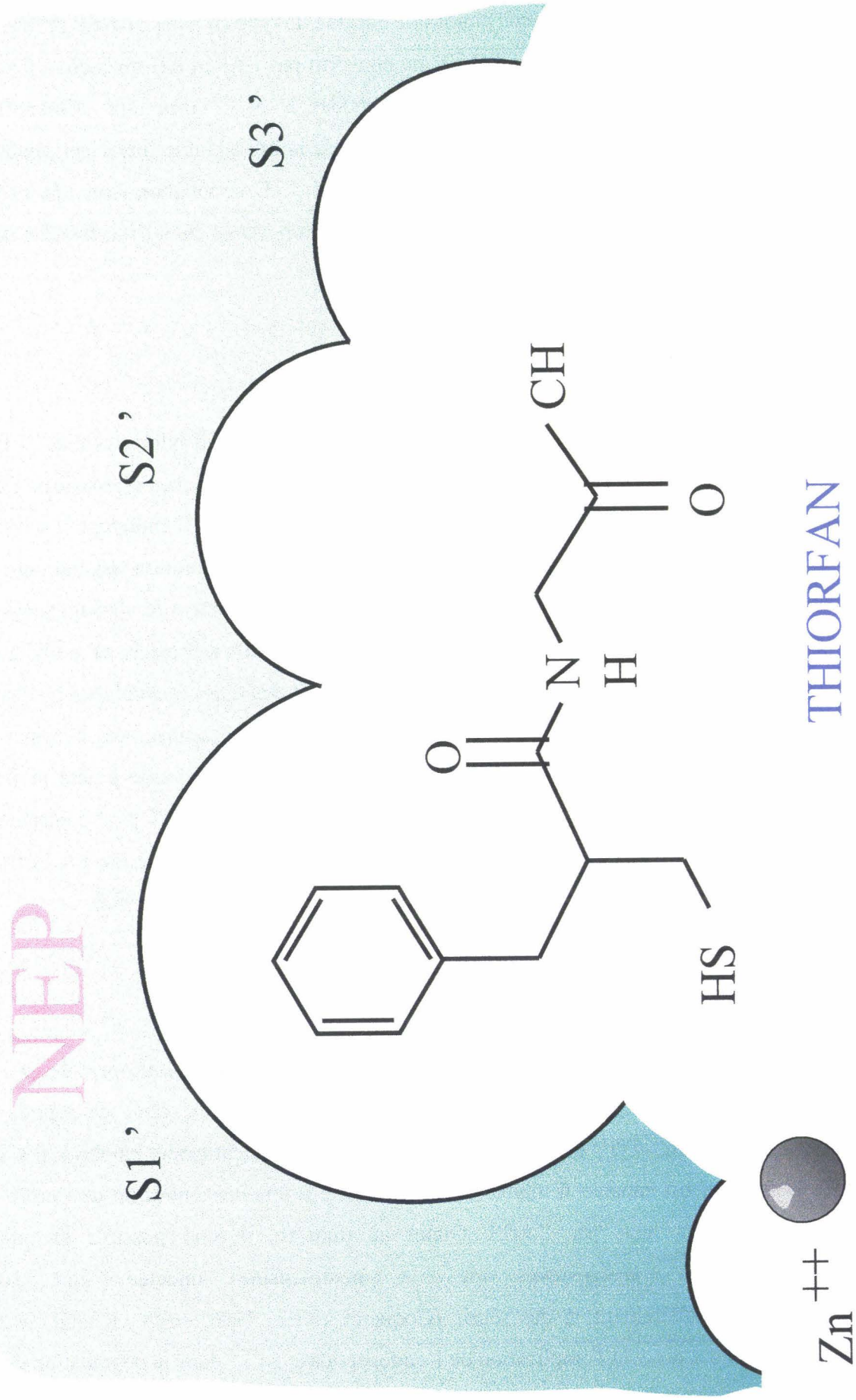
3-5) La lysylbradykinine

L'endopeptidase 24.11 est également capable de cliver la lysylbradykinine (LBK) (Rosenbaum, *et al.*, 1995), puissant peptide actif aux activités biologiques pléiotropes. Cette molécule est la kinine majeure générée dans l'espace extravasculaire. L'endopeptidase 24.11 clive la LBK au niveau de Gly⁵-Phe⁶ et Pro⁸-Phe⁹. La LBK est en fait un bon substrat pour les deux endopeptidases étudiées. La bradykinine comme la LBK entraînent la vasodilatation, la contraction des muscles lisses respiratoires, la stimulation des nerfs sensoriels, et la libération de molécules bioactives des mastocytes, de l'endothélium, et des fibres musculaires de type C associées à la respiration. Dans un but médical, il est possible de localiser ces enzymes au niveau de l'épithélium trachéobronchiale des poumons où la LBK est une kinine majeure produite lors d'une réponse immunitaire accrue. Quand il est actif, le LBK peut contribuer à un œdème, à la bronchoconstriction, à une augmentation de sécrétion muqueuse, et à l'afflux de cellules inflammatoires caractéristiques de l'asthme (Rosenbaum, *et al.*, 1995).

3-6) La neurotensine

L'endopeptidase 24.11 mammalienne participe avec d'autres métallopeptidases à la dégradation de la neurotensine (NT) libérée de façon endogène. Elle clive ce peptide au niveau des liaisons Pro¹⁰-Tyr¹¹ et/ou Tyr¹¹-Ile¹². Un nouvel inhibiteur est ici employé, il s'agit du JMV 390-1 qui est capable d'inhiber l'enképhalinase à une concentration de l'ordre de quelques nanomoles, mais pas l'ACE. Quant au thiorfan, il rend possible les effets hypothermiques et analgésiques de la neurotensine injectée par i.c.v. (intracérébroventriculairement) à des souris (Coquerel, *et al.*, 1986, 1988 ; Kitabji, *et al.*, 1992). Ce qui tend à prouver l'implication de l'endopeptidase 24.11 dans la dégradation de ce

Figure 13:



peptide. Finalement, on peut dire que l'endopeptidase 24.11 prend part à l'inactivation de la NT endogène au niveau du site de libération du peptide.

3-7) La CCK8

L'endopeptidase 24.11 du rein de porc hydrolyse la CCK8 sulfatée au niveau de deux sites distincts : au niveau de la liaison Gly⁴-Trp⁵ et au niveau de Asp⁷-Phe⁸. Ce dernier site de clivage est le principal. La NEP est présente dans le striatum où elle peut également cliver la CCK8 (Deschodt-Lanckman et Strosberg, 1983 ; Matsas, Turner et Kenny, 1984 ; Zuzel, *et al.*, 1985).

3-8) L'endothéline

L'endopeptidase 24.11 est également impliquée dans la dégradation de l'endothéline 1 humaine. Les liaisons coupées impliquent des acides aminés hydrophobes (Ser⁴, Leu⁶, Val¹², Phe¹⁴, His¹⁶, Leu¹⁷, Ile¹⁹). L'endothéline présente dans le plexus choroïde au niveau du cerveau, pourrait avoir d'importants effets sur la circulation sanguine. L'endothéline est inactivée par clivage enzymatique en dix fragments. De façon intéressante, l'endothéline est présente dans le fluide cérébrospinal où elle possède des récepteurs spécifiques. Il en est de même pour la NEP au niveau membranaire (Fagny, *et al.*, 1991).

4) L'endopeptidase 24.11 d'autres espèces non mammaliennes

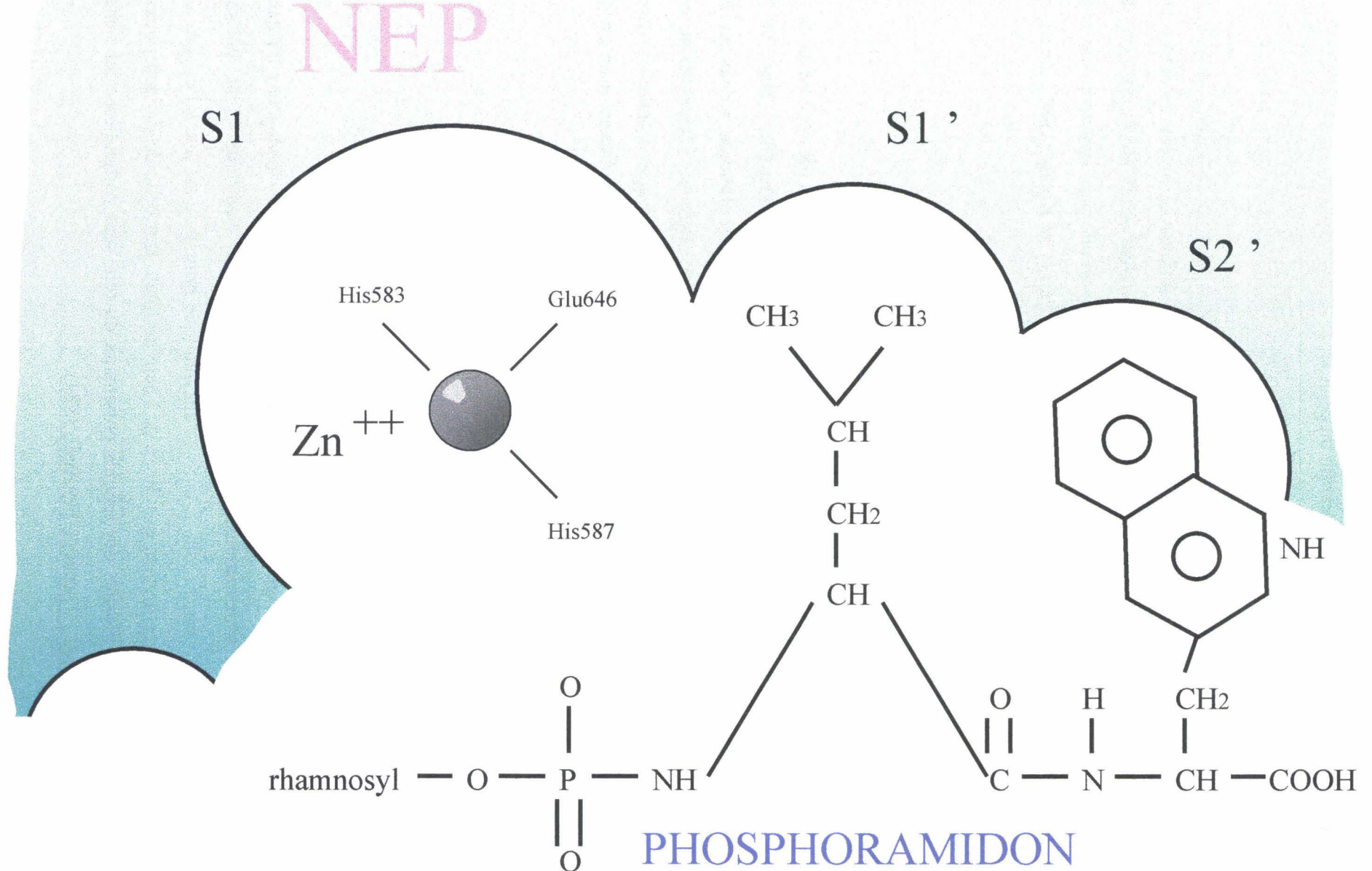
4-1) Les Vertébrés

Les peptidases peuvent intervenir dans l'hydrolyse de peptides endogènes ou dans l'exocytose de neurotransmetteurs au niveau de l'organe électrique d'un poisson cartilagineux : *Torpedo marmorata*. L'activité enzymatique principale est due à l'enzyme de conversion de l'angiotensine bien que 30 % de l'activité totale soit celle de l'endopeptidase 24.11, dont les microvillosités des tubules proximaux du rein sont particulièrement riches (Kenny et Maroux, 1982 ; Turner et Dowdall, 1984).

Figure 14:

ENDOPEPTIDASE-24.11 ACTIVE SITE

NEP



L'enzyme a également besoin d'ions métalliques pour fonctionner (Isaac, 1988). Mauborgne et collaborateurs (1991) ont montré qu'au niveau de la moelle épinière de l'homme, l'activité enzymatique responsable de l'hydrolyse des liaisons peptidiques du côté C terminal de la substance P n'est due ni à l'endopeptidase 24.11 ni à l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

4-2) Les Invertébrés

Une molécule apparentée à l'endopeptidase 24.11 a été mise en évidence chez l'insecte : *Schistocerca gregaria*. Cette endopeptidase intervient dans le catabolisme de l'AKH (hormone adipokinétique : pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-NH₂) avec une activité enzymatique comparable à celle de la NEP de mammifères (Isaac, 1988). L'enzyme possède aussi un rôle physiologique dans le catabolisme de peptides d'insectes au niveau synaptique (Coletti-Previero, *et al.*, 1985). L'endopeptidase 24.11 est capable de s'attaquer à des peptides possédant l'extrémité C terminale bloquée (pGlu). Une molécule apparentée à la NEP a également été isolée de *Mytilus edulis* (Stefano, *et al.*, 1992). Elle est située à la surface membranaire des hémocytes du bivalve marin et participe à la dégradation de peptides tels que la met-enképhaline (Schipp, *et al.*, 1990 ; Stefano, *et al.*, 1992). Elle montre une préférence pour les liaisons peptidiques qui impliquent des acides aminés hydrophobes (Phe, Leu, Trp, Tyr) et en particulier la phénylalanine (Matsas *et al.*, 1984a,b ; Stephenson et Kenny, 1987 a,b). Le phosphoramidon et le thiorfan (à une concentration de 1 µM) sont actifs mais pas très efficaces : cela reflète probablement une différence importante entre les sites de fixation des substrats de l'enzyme d'insecte et de celle des mammifères.

5) Inhibition de l'endopeptidase 24.11 et de l'ACE :

L'inhibition de l'endopeptidase neutre par des inhibiteurs spécifiques est un chapitre essentiel de l'étude de cette enzyme. C'est une stratégie majeure dans la lutte contre certains troubles de la santé provoqués par l'action de cette enzyme (Carretero et Scicli, 1991 ; De Lombaert, *et al.*, 1996). Les inhibiteurs de la NEP sont de nouveaux diurétiques prometteurs (Figures 13 et 14). Ils contrôlent en effet le volume du fluide extracellulaire en induisant une diurèse et une natriurèse significatives chez l'homme, sans augmentation compensatoire de la rénine et de l'aldostérone due aux médicaments diurétiques habituels. Bien que la répartition

de l'endopeptidase soit très étendue et que sa sélectivité soit faible, les seuls autres effets pharmacologiques clairement établis des inhibiteurs concernent son implication dans le métabolisme des enképhalines. C'est également le cas de l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui est ubiquitaire, mais dont l'inhibition se traduit quasi exclusivement par des effets sur la pression artérielle.

Les inhibiteurs d'endopeptidase n'engendrent pratiquement pas de signes de dépendance ou de dépression respiratoire car la libération des peptides endogènes est très faible dans les régions qui contrôlent la respiration. On note également parmi les inhibiteurs efficaces, les acides hydroxamiques d'Ala-Gly-NH₂ (Hudgin, *et al.*, 1981). Les inhibiteurs de l'endopeptidase sont des agents anti-hypertenseurs. Ils agissent sur la balance des peptides vasopresseurs et vasodilatateurs et cela en faveur de ces derniers. Finalement, ils vont permettre une diminution de la pression sanguine.

Les connaissances actuelles supportent l'hypothèse selon laquelle les effets natriurétique et diurétique des inhibiteurs de l'endopeptidase 24.11 sont modulés par une augmentation conjuguée de l'ANF et des kinines du rein qui peuvent agir de façon synergique.

Les effets des inhibiteurs de l'enképhalinase sont plus sélectifs que ceux des opioïdes exogènes puisqu'ils sont actifs sur certains tests d'analgésie mais pas sur d'autres (Lecomte, *et al.*, 1986). Ils provoquent également une augmentation de la vitesse de renouvellement de la dopamine striatale et de la sérotonine corticale, ainsi qu'une chute de celle de la noradrénaline corticale. Le phosphoramidon permet de supprimer l'augmentation de la susceptibilité aux convulsions provoquées par la privation du sommeil paradoxal chez la souris (Malfroy, *et al.*, 1978 ; Schwartz, *et al.*, 1986).

L'endopeptidase 24.11 est en effet impliquée dans beaucoup de processus biologiques qui vont de l'analgésie à l'hypotension (avec l'ANF par exemple) en passant par la diurèse (AII) (Guérin, *et al.*, 1997). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a largement contribué à faire progresser les connaissances concernant cette enzyme. L'inhibiteur spécifique majeur de la NEP est le thiorfan. Le thiorfan (DL-3-mercapto-2-benzyl-propanoyl)-glycine protège les enképhalines de l'action de l'endopeptidase 24.11 *in vitro* à une concentration de l'ordre de la nanomole, et *in vivo* après une injection intracérébroventriculaire ou une administration systémique. De plus, cet inhibiteur présente lui même une activité antinociceptive bloquée par la naloxone, un antagoniste des récepteurs aux opiacés (Roques, *et al.*, 1980). Le thiorfan augmente la réponse motrice du colon lors de la prise de nourriture et diminue la sécrétion

d'acide gastrique. Cependant, les inhibiteurs de l'enképhalinase n'ont apparemment aucun effet cardiovasculaire ou respiratoire néfaste (Yaksh, et Chipkin, 1989).

Les inhibiteurs efficaces peuvent s'associer à l'atome de zinc, cofacteur de l'enzyme. Ils possèdent un groupement phényl hydrophobe ou leucyl en position latérale qui se fixe au niveau du site hydrophobe. Dans le cas du phosphoramidon, son groupement rhamnose pourrait agir en diminuant l'efficacité du groupe « P » qui interagit avec l'atome de zinc (Fig 14). L'endopeptidase 24.11 et plusieurs autres peptidases (comme l'aminopeptidase) sont les protagonistes de l'inactivation des enképhalines. Dans d'autres études, les auteurs montrent que l'augmentation de la concentration en dopamine ou en norépinéphrine accroît la faculté de l'enképhalinase à digérer la Met-enképhaline. L'U.K. 79300, inhibiteur de l'endopeptidase 24.11, augmente l'excrétion de sodium, d'eau, d'ANF et de GMP cyclique (Gros, *et al.*, 1990).

Les inhibiteurs de cette enzyme ou de l'aminopeptidase entraînent une analgésie longue et marquée. Cette méthode thérapeutique est employée pour les patients cancéreux en phase terminale. Néanmoins, les inhibiteurs de l'endopeptidase neutre ont un effet modeste alors qu'un cocktail d'inhibiteurs, dérivés du kétolorphan, est aussi actif que la morphine dans les tests classiques.

IV] Le matériel biologique

Parmi les Annélides, la classe des Hirudinées et celle des Oligochètes constituent la super classe des Clitellates d'origine vraisemblablement monophylétique.

Theromyzon tessulatum est une sangsue Rhynchobdelle, c'est à dire munie d'une trompe. C'est notre modèle d'étude. Parasite des oiseaux aquatiques, elle prélève du sang en s'introduisant dans les fosses nasales. Adulte, elle atteint une masse variant de 150 mg à plus d'un gramme. Elle ne se reproduit qu'une fois au cours de sa vie, puis meurt (Wilkialis, 1970 ; Wilkialis et Davies, 1980a, b). Les grandes étapes de la vie de *T. tessulatum* ont été définies en prenant comme repères les repas de sang (Malecha, 1983) lesquels sont généralement au nombre de trois (Fig 15). Les prises de nourriture définissent donc quatre stades : stade 0, de l'éclosion au premier repas, stades 1, 2, et 3 : respectivement après les premier, deuxième et troisième repas.

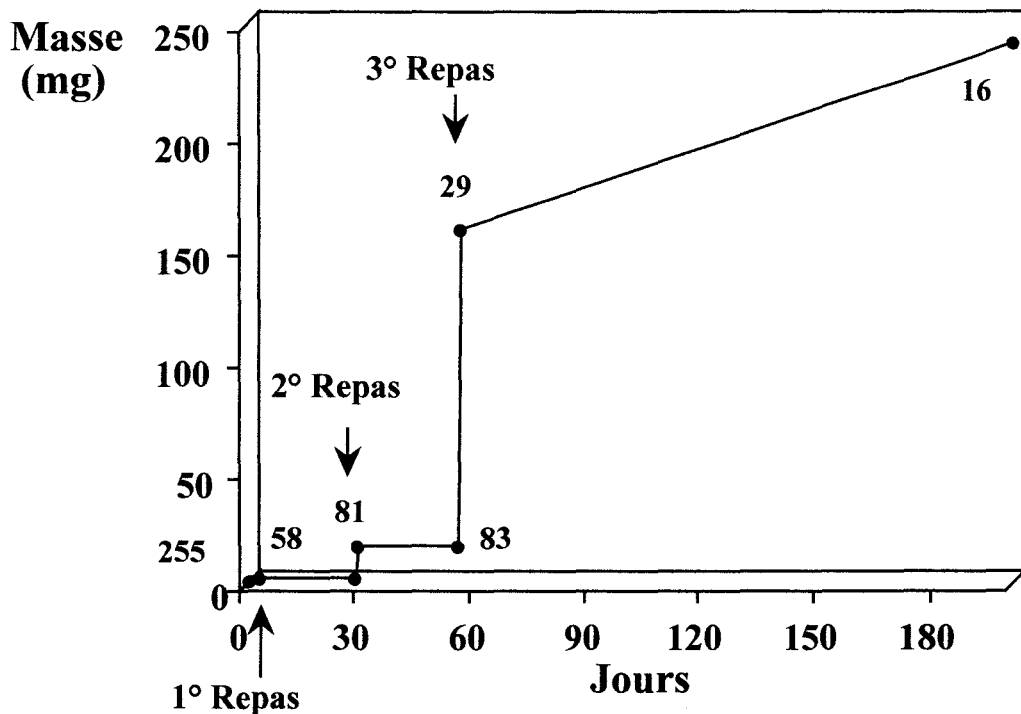


Figure 15-Croissance pondérale de *T. tessulatum* maintenues à la température du laboratoire et au rythme nyctéméral normal. Les chiffres en relief représentent les effectifs ayant servi à l'établissement de la masse moyenne (d'après Malecha, 1979).

A l'issue du troisième repas, la croissance de cette sangsue se caractérise par une augmentation de masse considérable (elle peut doubler) due à une importante rétention d'eau (Fig 15). Le stade 3 est très long et peut durer un an. Il a été subdivisé en prenant en compte les différentes étapes de la reproduction (Fig 15). L'évolution de la spermatogenèse définit les stades 3A et 3B, celle de l'ovogenèse les stades 3C et 3D (Malecha, *et al.*, 1989). La couvaison des cocons caractérise le stade 3E qui est séparé du stade 3D par la ponte d'œufs riches en vitellus. Le transport des sangsues néonates vers leur premier repas définit le stade 3F qui peut durer plus de 5 mois, jusqu'à ce que le parent trouve un hôte favorable pour les jeunes sangsues qu'il porte. L'adulte meurt quelques jours après leur départ (Wilkialis et Davies, 1980b). *T. tessulatum* est élevée au laboratoire, ce qui nous permet de disposer tout au long de l'année d'animaux à différents stades physiologiques.

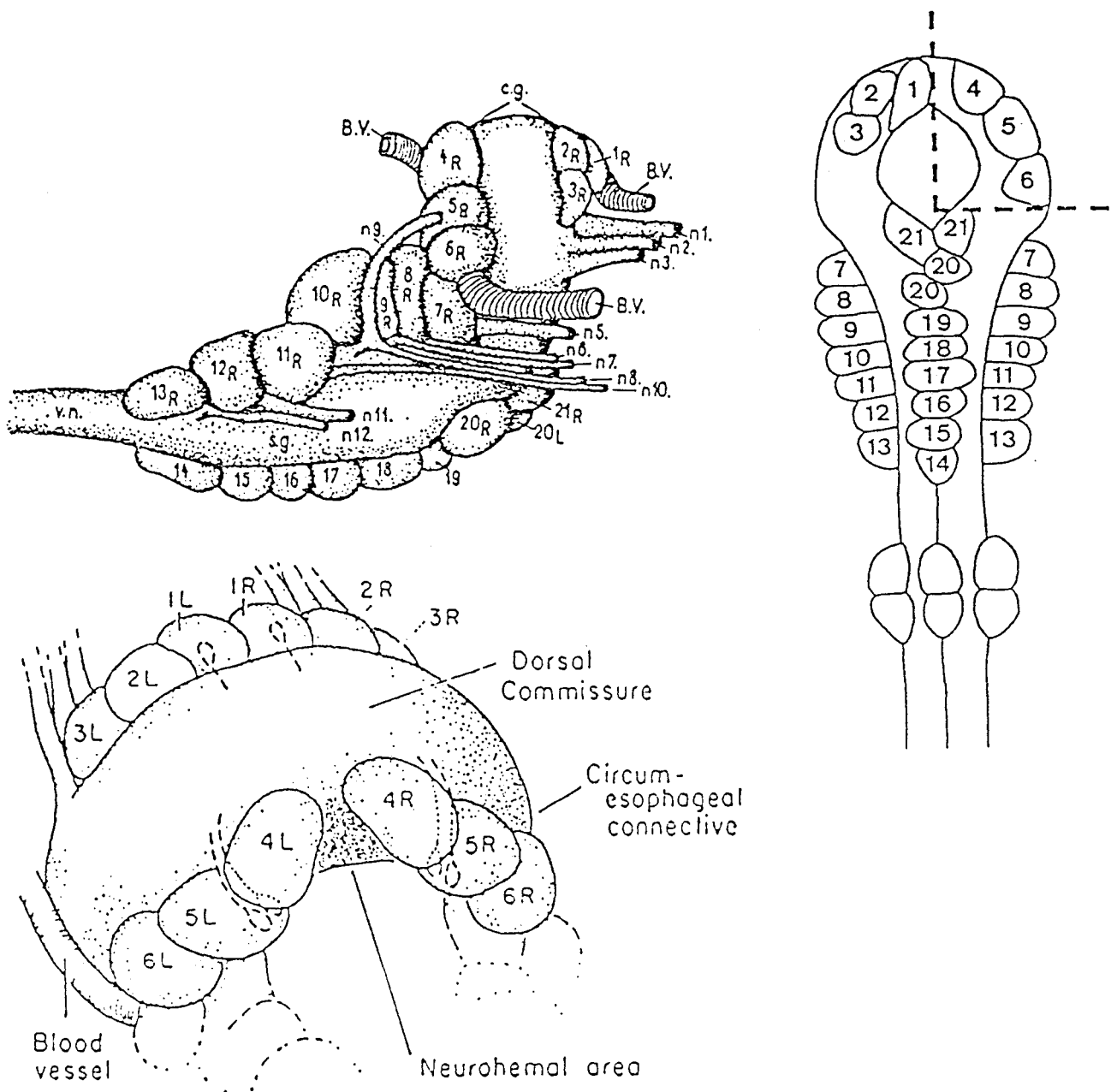


Figure 16 : Schémas du système nerveux central de *Theromyzon*.

A : Schéma du ganglion cérébroïde et de la masse sous-oesophagienne de *T. rude.*, vue de droite. B.V. : vaisseau sanguin ; n1 à n12 : nerfs céphaliques ; R1 à R20 : follicules du ganglion cérébroïde ; V.N. : chaîne nerveuse. (D'après Hagadorn, 1958).

B : Représentation schématique du ganglion cérébroïde de *T. tessulatum*, et numérotation des follicules. 1 à 3 et 7 à 21 : vue ventrale ; 4 à 6 : vue dorsale. (Malecha et al, 1989b).

C : Schéma de la commissure dorsale.

V] Système nerveux des Hirudinées

Le système nerveux central des Hirudinées se subdivise en trois grandes parties :

- une partie antérieure contenant le cerveau, une partie moyenne où les ganglions se répartissent à raison d'un par métamère, une partie caudale ou ganglion caudal.

1. Le cerveau

Le cerveau (Fig 16A) est formé de deux masses nerveuses, l'une supra-œsophagienne (ganglion supra-œsophagien) et l'autre sous-œsophagienne (ganglion sous-œsophagien) formée par la fusion de 4 neuromères. Deux commissures péri-œsophagiennes relient les ganglions supra- et sous-œsophagiens.

Comparées aux connaissances acquises sur les ganglions segmentaires, celles relatives aux neurones cérébraux restent fragmentaires, peut-être en raison du fait que ces derniers contrôlent des fonctions plus complexes. Le cerveau comprend des groupes de neurones ou follicules séparés les uns des autres par des cloisons conjonctives.

2. La partie moyenne

A ce niveau, la chaîne nerveuse contenue dans le sinus sanguin ventral, comprend 21 ganglions segmentaires (segmental ganglia : SG). Les SG, numérotés de SG1 à SG21, sont unis par deux connectifs ou cordons nerveux longitudinaux (Fig 16A). Tout au long de la chaîne, dans le neurilème qui entoure les connectifs, court un cordon nerveux médio-dorsal par rapport aux connectifs et parallèle à ces derniers, c'est le nerf de Faivre. Chaque ganglion renferme environ 400 neurones, avec quelques légères variations de ce nombre d'un ganglion à un autre (Macagno, 1980). Les 5ème et 6ème ganglions (SG5 et SG6) qui innervent les organes sexuels, d'où leur nom de ganglions génitaux (sex SG), sont particuliers. Ils contiennent des cellules surnuméraires, environ 150 dans le cas d'*Erpobdella octoculata* et 35 dans le cas de *Theromyzon tessulatum* (Salzet, *et al.*, 1993c). Les neurones ganglionnaires

sont unipolaires et leur corps cellulaire possède un diamètre compris entre 10 et 60 μm . Ils sont répartis en 6 follicules : 4 latéraux (2 antérieurs et 2 postérieurs) et 2 médio-ventraux (1 antérieur et 1 postérieur). Leurs prolongements axonaux et arborisations terminales sont présents à l'intérieur d'un neuropile central. Une cellule gliale unique enveloppe les neurones dans chaque follicule, deux cellules gliales entourent les axones au niveau du neuropile. De plus, deux cellules gliales sont présentes au niveau des connectifs interganglionnaires (une dans chaque connectif).

3. Le ganglion caudal

Il est formé par la fusion des neuromères des 7 derniers métamères. Sept paires de nerfs provenant de ce ganglion caudal innervent la ventouse caudale.

4. Particularités du cerveau de *T. tessulatum* (Fig 16)

Comme chez *T. rude* (Hagadorn, 1958, 1962), les neurones du cerveau sont groupés en 36 follicules.

La partie supra-œsophagienne du cerveau (ganglion supra-œsophagien) est composée d'une commissure dorsale, au niveau postéro-médian de laquelle se situe une zone neurohémale (Webb, 1980) et de 6 paires de follicules : 3 (N^{os} 1, 2 et 3) sont situées à la bordure antérieure de la commissure, les 3 autres (N^{os} 4, 5 et 6) lui sont postérieures.

La partie sous-œsophagienne du cerveau (ganglion sous-œsophagien) comprend 24 follicules disposés en 3 groupes : 2 dorso-latéraux disposés symétriquement et composés chacun de 7 follicules (N^{os} 7 à 13) et un groupe médio-ventral composé de 6 follicules (N^{os} 14 à 19) auxquels s'ajoutent vers l'extrémité antérieure 2 autres paires (N^{os} 20 et 21).

Deux vaisseaux sanguins sont associés au cerveau : l'un passe sous la commissure dorsale (Fig. 16 C) en relation étroite avec le périneurium, l'autre est situé ventralement par rapport au tube digestif et après s'être dichotomisé, traverse la masse sous-œsophagienne.

RESULTATS

Article (1)
Molécule apparentée à l'AI

Article (2)
Molécule apparentée à la rénine

Molécule apparentée à l'Angiotensine I

Laurent, V., Bulet, P, Salzet, M. A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin-I like molecule with forms of vertebrate angiotensinogens : a hormonal system conserved in the course of evolution ; Neuroscience Letters : 190 (1995) 175-178.

Chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*, une molécule très proche de l'AII humaine a été isolée et séquencée (Salzet, et al., 1993a,b). Les tests d'injections de cette molécule *in vivo*, à des *T. tessulatum* ont montré que ce peptide possède une activité diurétique. Cependant, la quantité de matériel trop peu importante chez *T. tessulatum* a orienté l'étude vers une autre espèce : *Erpobdella octoculata*. Chez cette dernière, une AII-amide a été isolée. L'amidation C terminale semble lui conférer une activité diurétique 100 fois supérieure à l'AII humaine (Salzet, et al., 1993).

Compte tenu de ces données, nous nous sommes posés la question suivante : existe-t-il, chez la sangsue, un précurseur qui possède dans sa séquence, l'AII et les sites de protéolyses pour les enzymes de conversion de celle-ci, *i.e.* la rénine et l'ACE ?

Résultats

Une molécule de 11 kDa a été isolée et séquencée. Elle présente une identité parfaite, sur les 11 premiers résidus, avec l'angiotensine I (AI) humaine et 78.5 % d'homologie, sur les 14 premiers acides aminés, avec l'angiotensinogène (A₀) humain. D'autre part, elle possède les sites de protéolyse aux enzymes intervenant dans le métabolisme des angiotensines : la rénine et l'ACE.

Les travaux antérieurs de Salzet et collaborateurs (1993) avaient mis en évidence une protéine de 19 kDa immunoréactive à l'anti-AII dans les produits de traduction *in vitro* d'ARN messagers, extraits du système nerveux central (SNC). De plus, les résultats immunocytochimiques (Verger-Bocquet, et al., 1992) et biochimiques (Salzet, et al., 1993) avaient montré que cette protéine de 19 kDa porte dans sa séquence peptidique, différents épitopes, *i.e.* AI, AII, γ MSH, ACTH. Ce résultat laissait présager une nature multipéptidique

du précurseur de l'AII chez les Hirudinées, à l'inverse de l'A₀ chez les vertébrés. Le peptide de 11 kDa, que nous avons isolé, pourrait donc être un produit de dégradation de ce précurseur. La présence sur ce peptide des sites de protéolyses à la rénine et à l'ACE permettait de supposer l'existence d'un système rénine-angiotensine (RAS) chez les Hirudinées. Mon travail a donc consisté à confirmer cette hypothèse en isolant et en caractérisant chacune de ces enzymes. L'étude de l'action de ces enzymes sur le précurseur permettra de conclure ce travail.

A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin I-like molecule with forms of vertebrate angiotensinogens: a hormonal system conserved in the course of evolution

Virginie Laurent^a, Philippe Bulet^b, Michel Salzet^{a,*}

^aLaboratoire de Phylogénie moléculaire des Annelides, ER 87 CNRS, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudiniées, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

^bInstitut de Biologie moléculaire et cellulaire, UPR 9022 CNRS, 15 rue Descartes, F-67084 Strasbourg Cédex, France

Received 23 February 1995; revised version received 31 March 1995; accepted 3 April 1995

Abstract

After five steps of purification including gel permeation, anti-angiotensin I affinity column chromatography followed by reverse-phase HPLC, a peptide immunoreactive to two different antisera (anti-angiotensin II and anti-angiotensin I) was purified to homogeneity from extracts of the leech *Theromyzon tessulatum*. The first 14 amino acid residues of the purified peptide (DRVYIHPFHLLXWG) established by automated Edman degradation, reveal the existence in leeches of an angiotensin I-like molecule close to human angiotensin I. The sequence of the purified peptide presents 78.5% of homology with the N-terminal part of human angiotensinogen. Moreover, in its sequence, this peptide presents the cleavage sites of vertebrate angiotensin metabolic enzymes, i.e. the renin and the angiotensin-converting enzyme. This finding constitutes the first biochemical characterization of an angiotensin I in Invertebrates. It also reflects the high conservation of angiotensins in the course of evolution, suggesting a fundamental role of this family in fluid homeostasis.

Keywords: Renin-angiotensin system; Angiotensinogen; Angiotensins; Neuropeptides; Leech

In mammals, the renin-angiotensin system (RAS) has long been known to play a key role in body fluid homeostasis [6]. In this system, renin cleaves the essentially inactive decapeptide angiotensin I (AI) from angiotensinogen (A0), the AII precursor (a glycoprotein of ca. 60 kDa). The further action by the angiotensin-converting enzyme yields a simple 8 amino acid bioactive peptide, angiotensin II (AII), the final product of this system. Angiotensin, which was first isolated and purified from plasma [5] has since been identified in many organs [3].

In Invertebrates, little is known about this family except in Hirudinae. Salzet et al. have isolated in *Theromyzon tessulatum* [10] and sequenced in *Erpobdella octoculata* [8], a peptide related to the angiotensin family: an angiotensin II-amide, differing from vertebrate AII by a carboxy-terminus amidation [8]. Injection in *T. tessulatum* of either AII or AII-amide resulted in a decrease of mass expressing a diuretic effect of these molecules, AII-amide being 100-fold more effective than AII [8].

Although AII-amide is closed to vertebrate AII, its precursor differs from A0. Western blot analyses performed with extracts of *T. tessulatum* central nervous system (CNS) have revealed the existence of an AII-like multiple hormone precursor of ca. 19 kDa [10]. This protein possesses at least three epitopes recognized by two different polyclonal antisera (an anti- γ -MSH and an anti-angiotensin II) and by a monoclonal antibody (Tt159) specific of epitopes contained in *T. tessulatum* supraesophageal ganglia [10]. Two of the three epitopes recognized have been identified. The first corresponds to the AII-amide [8] and the second to a peptide related to the vertebrate γ_1 -MSH [11]. Moreover, two key components of the RAS in Vertebrates, i.e. a renin-like of ca. 32 kDa and an angiotensin converting-like enzyme (ACE) of ca. 120 kDa have been recently isolated and characterized (unpublished data). They present a similar activity to those of Vertebrates. Considering the existence of both the AII-amide and the renin- and ACE-like enzymes, in leeches, we could suspect the existence of a peptide present in the AII-amide precursor, close to angiotensin I and

* Corresponding author, Tel./Fax: +33 20 43 40 54.

Table 1

Purification of immunoreactive peptides to the two antisera (anti-AI and anti-AII) in the leech *Theromyzon tessulatum*

Step	Column material	Elution conditions	Yield (%)
1. Leech extract			100
2. Gel permeation (FPLC)	Superdex G75 (16/60, Pharmacia)	Tris-HCl 20 mM NaCl 200 mM (pH 8.2)	80
3. Affinity column	Anti-AI coupled to BrCn-Sepharose	Propionic acid (pH 3)	33
4. Reversed-phase HPLC	C ₁₈ , Select B (4.6 × 125 mm, Waters)	0–15% (10 min) 15–45% (30 min)	29
5. Reversed-phase HPLC	C ₃ , RP100 (4.6 × 125 mm, Waters)	0–60% (60 min)	25

Experimental details are indicated in the text (FPLC, fast protein liquid chromatography).

possessing in its sequence the processing sites of the metabolic enzymes. The aim of this work was the isolation of such a peptide using two different antisera, i.e. an anti-AI and an anti-AII.

For this study, mature specimens of the rhynchobdellid leech *T. tessulatum*, reared under laboratory conditions as described by Malecha et al. [4] were used. Two polyclonal antisera directed against AII and AI, respectively, were generated in rabbits, using synthetic peptides coupled to human serum albumin via glutaraldehyde. The anti-AI was specific to the C-terminal part of AI and the anti-AII recognized the internal fragment of AII (sequence Val-Tyr-Ile-His) [9]. Dot immunobinding assay (DIA) and enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) based on the protocols of Salzet et al. [7,12] were used to follow the immunoreactivity to the two different antisera during purification procedures. For the two types of immunoassays, antisera were employed at a dilution of 1:1000.

For the purification, five steps were needed. Step I consisted of the proteins tissue extraction. After anesthesia of the animals in 0.01% chloretone, head parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. Five hundred head parts were homogenized and extracted with 5 ml of Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM containing 200 mM NaCl (TBS) at 4°C. After centrifugation at 12 000 rev./min for 30 min on a Sigma 2K15 rotor at 4°C, the pellet was re-extracted six-fold. The supernatants were filtered on nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size, Millipore). In the second step, the extract was applied onto a column of Superdex G75 (Pharmacia), pre-equilibrated with TBS at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by absorbance at 280 nm. All column fractions were assayed in DIA with the two antisera, i.e. anti-AI and anti-AII. Then, the fractions immunoreactive to the two antisera were concentrated 20-fold in a

vacuum centrifuge (Savant) before being applied to an anti-AI affinity column, according to the procedure of Salzet et al. [10]. The eluted fractions were then concentrated 20-fold in a vacuum centrifuge (Savant) before being separated on a C₁₈ Select B column (125 mm × 4.6 mm, Waters), equilibrated in water acidified with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Elution was performed with a discontinuous linear gradient of acetonitrile in acidified water over 0–15% for 10 min and over 15–45% for 30 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by absorbance at 226 nm and the presence of immunoreactive peptides was detected in DIA. Finally, fractions that contained the immunoreactive material were further applied to a C₃ Lichrosphere Rp100 column (125 mm × 4.6 mm), equilibrated in acidified water. Elution was performed with a linear gradient of acetonitrile in acidified water over 0–60% for 60 min at a flow rate of 1 ml/min. All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a photodiode array detector Beckman 168.

The structure of the isolated peptide was determined by an automated Edman degradation. Detection of phenylthiohydantoin (PTH-Xaa) derivatives was performed on a pulse liquid automatic sequentator (Applied Biosystems, model 473A).

Purification summaries are shown Table 1. After a saline buffer extraction, filtered supernatants were subjected to gel permeation chromatography on a fast protein liquid chromatography system (FPLC) with a Superdex G75 column (Fig. 1). Three immunoreactive zones to the two antisera were detected in DIA at a retention time of respectively 5–10 min (Z1), 60–65 min (Z2) and 70–75 min (Z3) corresponding to proteins larger than 45 kDa for Z1, between 20 and 14.4 kDa for Z2 and less than 10 kDa for Z3 (Fig. 1). We focused our interest specifically on pep-

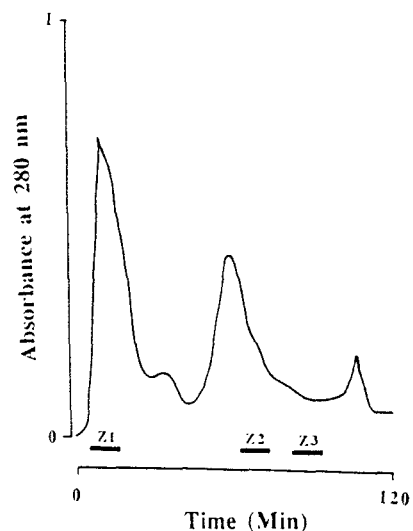


Fig. 1. Elution profile of immunoreactive material to two antisera (anti-AI and anti-AII) from the Superdex G75 column. The solid bars indicate fractions containing the immunoreactive material.

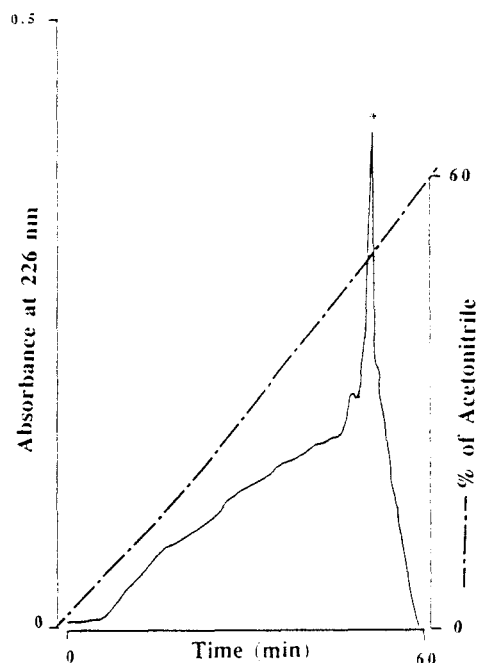


Fig. 2. Elution profile at the final step of purification of the immunoreactive peptide on C_8 reversed-phase column. The asterisk indicates the peak containing the purified peptide which was subjected to an automatic Edman degradation.

tides contained in Z3. Peptides in Z3 were then applied to an anti-angiotensin I affinity column. Eluted fractions were then fractionated on a C_{18} Select B reversed-phase HPLC column with a discontinuous linear gradient of acetonitrile in acidified water. An immunoreactive zone (Z4) to the two antisera in DIA was resolved at a retention time of 34–35 min (corresponding to 40–41% of acetonitrile). Immunoreactive material contained in Z4 was then applied on a C_8 Lichrosphere column with a linear gradient of acetonitrile in acidified water over 0–60% for

Table 2

Automated Edman degradation of 16.6 pmol with a repetitive yield of 90.5% of P1 isolated from the leech *T. tessulatum*

Cycle no.	PTH-Xaa	Yield (pmol)
1	Asp (D)	12
2	Arg (R)	5.8
3	Val (V)	29
4	Tyr (Y)	18
5	Ile (I)	28
6	His (H)	4
7	Pro (P)	7.5
8	Phe (F)	26
9	His (H)	3.8
10	Leu (L)	3.5
11	Leu (L)	3.6
12	Xaa	
13	Trp (W)	5
14	Gly (G)	6.5

Xaa corresponds to unidentifiable phenylthiohydantoin (PTH-Xaa).

60 min (1%/min). A peptide (P1) immunoreactive to the two antisera, at a retention time of 51.84 min, was purified to homogeneity (Fig. 2).

After the final step of purification, peptide P1 was submitted to an automated Edman degradation. The N-terminal sequence, established on 16.6 pmol of P1 with a sequencing yield of 90.5%, was Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Xaa-Trp-Gly (Table 2). Sequence alignment of P1 with vertebrate A0 reveals that the first 11 amino acid residues of the primary structure of P1 are fully superposable with human AI (Table 3). The sequence of P1 (first 14 amino acid residues) presents 78.5% sequence homology with the N-terminal sequence of human A0. Differences occur on amino acid residues at position 12–14.

In Table 3, it is worth noting that primary structure of vertebrate AI has been well preserved except variations in positions 1, 5 and 9 [13–16]. Surprisingly, the amino acid residue at position 5, isoleucine, is present in leeches up to elasmobranch, changed in all Vertebrates into valine, excepted in human. Equivalent conclusions could be advanced for the amino acid in position 1. For the amino acid residues in positions 1 and 5, we suggest two transitory genetic transitions, in the course of evolution. In fact,

Table 3

Amino acid sequences of AI or AII from various Vertebrate and Invertebrate species

	1	5	10							
<i>Mammals</i>										
Human ^a	D	R	V	Y	I	H	P	F	H	L
Ox, sheep	D	R	V	Y	V	H	P	F	H	L
<i>Birds</i>										
Fowl, quail	D	R	V	Y	V	H	P	F	S	L
<i>Reptiles</i>										
Snake	Acyl-Asx	R	V	Y	V	H	P	F	Y	L
Turtle	D	R	V	Y	V	H	P	F	H	L
Alligator	D	R	V	Y	V	H	P	F	Δ	L
<i>Amphibians</i>										
Bullfrog	D	R	V	Y	V	H	P	F	N	L
Frog skin	A-P-G ^b	D	R	I	Y	V	H	P	F	
<i>Fish</i>										
<i>Teleost</i>										
Goosefish	N	R	V	Y	V	H	P	F	H	L
Salmon	N/D	R	V	Y	V	H	P	F	N	L
Eel	N/D	R	V	Y	V	H	P	F	Q	L
<i>Elasmobranch</i>										
Dogfish	N	R	P	Y	I	H	P	F	E	L
<i>Annelids (Hirudinae)</i>										
<i>T. tessulatum</i> ^c	D	R	V	Y	I	H	P	F	H	L
<i>E. octoculata</i> ^c	D	R	V	Y	I	H	P	F	-amide	

Acyl-AsX indicates that the N-terminal Asp or Asn is acylated. For references regarding each AI, see Ref. [16].

^a Pig, rat, horse and sheep AI have the same sequence. Amino acid residues underlined are different to human or leech AI.

^b Ala-Pro-Gly.

^c Our data.

the codons of Asp, GAU and GAC, are similar to the two codons of Asn, AAU and AAC, thus a G → A transition can be considered. The same conclusions could be advanced for Ile and Val (AUU, AUC, AUA versus GUU, GUC, GUA), where a A → G transition can also be considered. Moreover, previous experimental testing on the pressor activity of different AI, has led to the conclusion that amino-acid residues in position 1 and 5 are fundamental for the biological activity [3,5, 17]. In mammals and birds, homologous [Asn¹] AI and AII are twice as potent as fish [Asn¹] AI and AII in terms of vasopressor activity [3,5,15,17]. Conversely, homologous [Asn¹] AI and AII are several-fold more vasoactive than [Asp¹] AI and AII in the eel [13,14]. The amino acid residue in position 5 (valine or isoleucine) influences the vasopressor activity of AII in the rat, fowl, quail and eel [13–17]. In comparison with positions 1 and 5, position 9 of AI seems to be much less important for the vasopressor activity [13–17]. It could be suggested that during evolution, genetic transitory transitions and substitutions have occurred in positions 1, 5 and 9, and only the most effective for the biological activity were conserved. For these reasons, leech AI and human AI present the same sequence. However, in the leech *Erpobdella octoculata* CNS, an AII-amide 100-fold more active on the leech hydric balance than AII, was found [8]. The existence of such an AII-amide in *E. octoculata* suggests in this species a precursor with glycine in position 9 rather than histine, as in the eel (Table 3). The amide is usually made by an α -amidating enzyme system operating on a glycine residue.

Interestingly, P1 possesses in its sequence the Phe⁸-His⁹ and the Leu¹⁰-Leu¹¹ bonds, two processing sites of the angiotensin-converting like enzyme (ACE) and the renin-like enzyme, respectively. Such enzymes have recently been isolated in *T. tessulatum* (unpublished data). The renin-like enzyme hydrolyses the Leu¹⁰-Leu¹¹ bond of synthetic porcine angiotensinogen tetradecapeptide in AI and Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴ peptide and the ACE-like the Phe⁸-His⁹ bond of AI in AII and dipeptide His⁹-Leu¹⁰ (unpublished data).

We suggest the existence of a complete RAS in leeches i.e. biological peptides (AI and AII) and their metabolic enzymes (the renin-like and ACE-like enzymes). However, the sequence of P1 is too small to suggest the existence of an angiotensinogen-like precursor in leeches. Moreover, several lines of evidence are in opposition with such a hypothesis. The molecular weight of the precursor, ca. 19 kDa, is different from angiotensinogen, ca. 60 kDa [10]. Furthermore, other antisera than anti-AII and anti-AI recognized this protein, e.g. the anti- γ MSH or the Tt159 [10] suggesting a multiple hormone precursor as in other invertebrate precursors [1,2]. A molecular biology study on the AII-like precursor will give us more information on its structure.

Our results establish the presence in leeches of AII, AI and conservation of the processing sites (Phe⁸-His⁹ and Leu¹⁰-Leu¹¹ bonds) of the conversion enzymes of AII

(ACE-like and renin-like). Moreover, this finding proves the existence in leeches of a complete RAS and demonstrates that it is an important hormonal system involved in fluid homeostasis. Our findings demonstrate the existence of a complete hormonal and associated metabolic enzyme system conserved from Annelids (the oldest group of *cœlomate Metazoans*) to Vertebrates.

The authors are indebted to Dr. J. Hoffmann (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR 9022 CNRS, Strasbourg, France), for facilities provided for the peptide sequencing.

- [1] De Loof, A. et al., Molecular structures of some Vertebrate-type messenger peptides in Invertebrates. In *Progress in Comparative Endocrinology*, Wiley-Liss, New York, 1990, pp. 16–21.
- [2] De Loof, A. et al., Vertebrate-type hormones in insects. In F. Sehnael et al. (Eds), *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*, Wrocław Technical University Press, Wrocław, Poland, 1988, pp. 813–831.
- [3] Henderson, I.W. et al. Phylogenetic aspects of the renin-angiotensin system. In G. Pethes and V.L. Frenyo (Eds), *Advances in Animal and Comparative Physiology*, Pergamon Press, New York, 1981, pp. 355–363.
- [4] Malecha, J. et al., Mise en évidence et évolution, au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance appartenée à la motiline porcine dans le ganglion supracéphalique de la sangsue *Theromyzon tessulatum*, *Can. J. Zool.*, 67 (1989) 636–640.
- [5] Peach, M.J., Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action, *Physiol. Rev.*, 57 (1977) 313–370.
- [6] Saavedra, J.M., Brain and pituitary angiotensin, *Endocr. Rev.*, 13 (1992) 329–380.
- [7] Salzet, M. et al., Isolation, structural characterization and biological function of lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*, *Eur. J. Biochem.* 217 (1993) 897–903.
- [8] Salzet, M. et al., Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*. Angiotensin II amide, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 1575–1582.
- [9] Salzet, M. et al., Evidence for angiotensin-like molecules in the central nervous system of the leech *Theromyzon tessulatum* (O.F.M). A possible diuretic effect, *Comp. Biochem. Physiol.*, 101A (1992) 83–90.
- [10] Salzet, M. et al., Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*, *Brain Res.*, 631 (1993) 247–255.
- [11] Salzet, M. et al., Isolation and structural characterization of a novel peptide related to γ -melanocyte stimulating hormone from the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*, *FEBS Lett.*, 348 (1994) 102–106.
- [12] Salzet, M. et al., Elisa for oxytocin. highly sensitive tests and application to the titration of an oxytocin-like substance in the leech *Erpobdella octoculata*, *Comp. Biochem. Physiol.* 102C (1992) 483–487.
- [13] Takei, Y., *In vivo* characterization of angiotensin II receptors and converting enzymes in the quail and eel, *Zool. Sci.* 4 (1987) 1088.
- [14] Takei, Y., Role of peptide hormones in fish osmoregulation. In J.C. Rankin and F.B. Jensen (Eds.), *Fish Ecophysiology*, Chapman and Hall, London, 1993, pp. 136–160.
- [15] Takei, Y. and Hasegawa, Y., Vasopressor and depressor effects of native angiotensins and inhibition of these effects in the Japanese quail, *Gen. Comp. Endocrinol.* 79 (1990) 12–22.
- [16] Takei, Y. et al., A novel angiotensin I isolated from an elasmobranch fish, *J. Endocrinol.*, 139 (1993) 281–285.
- [17] Watanabe, T.X. et al., Specific pressor activity and stability of synthetic angiotensins, *Jpn. J. Pharmacol.*, 27 (1977) 137–144.

Molécule apparentée à la rénine

Laurent, V., Salzet, M. Isolation of a Renin-like Enzyme from the Leech *Theromyzon tessulatum* Peptides, vol.16, n° 8, pp. 1351-1358, (1995).

Chez les mammifères, le système rénine-angiotensine (RAS) est connu depuis longtemps pour son rôle dans le contrôle de l'homéostasie ionique et hydrominérale. L'angiotensine I (AI) décapeptide inactif, est générée après coupure de l'angiotensinogène (A₀), glycoprotéine de *ca* 60 kDa, précurseur de l'angiotensine II, par la rénine libérée par le rein dans la circulation sanguine. Dans un deuxième temps, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Angiotensin Converting Enzyme) (ACE)) clive la partie C terminale de l'AI pour donner un peptide actif de huit acides aminés, l'angiotensine II (AII), produit final de ce système. Notre objectif a été la recherche d'une enzyme de type rénine chez la sangsue *T. tessulatum*.

Résultats

Chez *T. tessulatum*, la mise au point de tests de détection et d'activité enzymatique a permis l'isolement d'une molécule apparentée à la rénine. Elle possède une masse moléculaire de 32 kDa en électrophorèse SDS-PAGE. Son activité est inhibée par la pepstatine A, un inhibiteur spécifique des enzymes de la famille des aspartyl protéases. Ses paramètres cinétiques (activité spécifique, Km, Kcat) sont comparables à ceux de la rénine, bien que de légères différences d'affinité et d'efficacité pour le substrat employé (le tétradécapeptide (TDP), représentant les 14 premiers acides aminés de l'extrémité N terminale de l'angiotensinogène humain) existent. Cela peut s'expliquer par le fait que chaque rénine possède un substrat privilégié. Dans le cas de l'hydrolyse du TDP par les différentes rénines *in vitro*, on remarque que la séquence peptidique du TDP proche du site catalytique est importante pour que la protéolyse soit optimale. Or, la nature de la séquence du précurseur de l'AII, semble différente de celle de l'A₀, chez *T. tessulatum*. Cette variation de séquence spécifique pourrait expliquer la moindre efficacité de la rénine de sangsue sur le TDP.

L'activité optimale de la rénine-like est observée à 37°C et à pH 7,4, ce qui démontre que l'enzyme étudiée est une aspartyl protéase et non une protéase acide. Enfin, la récente

séquence N terminale de l'enzyme, réalisée par Salzet et Stefano (1997) a permis de confirmer que cette molécule est apparentée à la rénine. Cependant, aucune étude de spectre d'activité n'a pour l'instant été réalisée pour cette enzyme hormis le clivage, *in vitro*, du tétradécapeptide en AI. C'est la première mise en évidence d'une telle enzyme chez les invertébrés. Une étude plus complète de son spectre d'activité est en cours.



0196-9781(95)02038-1

Isolation of a Renin-Like Enzyme From the Leech *Theromyzon tessulatum*

VIRGINIE LAURENT AND MICHEL SALZET¹

Laboratoire de Phylogénie moléculaire des Annélides, ER 87 CNRS, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudiniées, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 12 June 1995

LAURENT, V. AND M. SALZET. *Isolation of a renin-like enzyme from the leech Theromyzon tessulatum*. PEPTIDES 16(8) 1351-1358, 1995.—This article reports the purification of a renin-like enzyme (an aspartyl protease) from head parts of the leech *Theromyzon tessulatum*. After four steps of purification including gel permeation and anion exchange chromatographies followed by reversed-phase HPLC, this enzyme was purified to homogeneity. The renin-like enzyme (of 32 kDa) hydrolyses at neutral pH and at 37°C, the Leu¹⁰-Leu¹¹ bond of synthetic porcine angiotensinogen tetradecapeptide yielding the angiotensin I and the Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴ peptide as products, with a specific activity of 1.35 pmol AI/min/mg (K_m 22 μM ; K_{cat} 2.7). The hydrolysis of angiotensinogen is inhibitable at 90% by pepstatin A (IC_{50} = 4.6 μM), consistent with a renin activity. This is the first biochemical evidence of renin-like enzyme in invertebrates.

Angiotensinogen Angiotensin I Leech Renin-angiotensin system Renin-like enzyme

THE advent of immunocytochemical techniques has strongly influenced thinking in invertebrate endocrinology. The development of antibodies to vertebrate peptides and their use in leeches has revealed a large number of immunoreactivities at the level of fibers and neurons in leech nervous systems (29). The improvement of chromatographic techniques has greatly facilitated the purification and the determination of the sequences of neuropeptides in leeches. A comparison of the sequences of neuropeptides isolated from vertebrates and leeches has shown the existence of same neuropeptides families, for example, RFamides (6,19), opioids (20,23), oxytocin/vasopressin peptides (18), and angiotensins (21,22). These data reflect the high conservation in the course of evolution of neuropeptides and lead to two central questions: what are the ancestral neuropeptides genes? and what are the enzymes involved in maturation of these ancestral neuropeptides genes? For the latter question, we focused our interest on the renin-angiotensin system (RAS) in leeches, an hormonal and associated metabolic enzymes system well investigated in vertebrates.

In mammals, the RAS has long been known to play a key role in body fluid homeostasis (17). In this system, renin cleaves the essentially inactive decapeptide angiotensin I (ANG I) from angiotensinogen. The further action by the angiotensin-converting enzyme (ACE) yields a simple eight amino acid bioactive peptide, angiotensin II (ANG II), the final product of this system (11,26).

Studies of human renin maturation on kidney tissue (3) showed that renin is first synthesized in an inactive form with a high molecular mass (55 kDa) and then converted into active

renin with a lower molecular mass (44 kDa). In 1982, Panthier et al. (15) were able to determine the complete nucleotide sequence of mouse submandibular gland renin and to deduce the amino acid sequence of its precursor. At the same time, Misuno et al. (14) reported the primary sequence of the active form of the submandibular gland, using Edman degradation. This enzyme belongs to the aspartyl protease family, such as cathepsin D, pepsin, chymosin, and penicillopepsin, which all contain aspartic acids in their catalytic site (3). Moreover, renin presents 35% sequence homology with these aspartyl proteases. This homology is most marked in the region of the two aspartic acids involved in the catalytic site (3). The common inhibitor of these aspartyl protease is the pepstatin A (8,9).

Existence of renin has also been demonstrated in all nonmammalian vertebrates. For example, evidence for an active and an inactive renin was found in the plasma of the snake *Bothrops jararaca* (7). In elasmobranch, active renin possesses a molecular mass of 48 kDa (28). If this molecule has been very well investigated in vertebrates, there exists to our knowledge no data related to this enzyme in invertebrates except for Hirudinae (this article).

In this zoological group, we have previously isolated in *Theromyzon tessulatum* (22) and sequenced in *Erpobdella octoculata* (21) a peptide related to the angiotensin family: an angiotensin II-amide, differing from the vertebrate ANG II by a carboxy-terminus amidation (21). The injection in *T. tessulatum* of either ANG II or ANG II-amide resulted in a decrease of mass expressing a diuretic effect of these molecules, ANG II-amide being 100-fold more effective than ANG II (21). Although the ANG II-like

¹ Requests for reprints should be addressed to Michel Salzet.

TABLE I
PURIFICATION OF THE RENIN-LIKE ENZYME FROM HEAD PARTS OF THE LEECH *Theromyzon tessulatum*

Step	Column material	Elution Conditions	Sp. Activity (Mean \pm SD)	Yield (%)
Leech extract			0.27 \pm 0.12	100
Gel permeation (FPLC)	Superdex G75 (16/60, Pharmacia)	Tris/HCl 20 mM NaCl 200 mM, pH 8.4	0.42 \pm 0.18	70
Anion exchange (FPLC)	Mono Q (HR 5/5, Pharmacia)	NaCl 0.2–0.9 (60 min) in Tris/HCl 20 mM pH 8.4	0.84 \pm 0.28	60
Reversed-phase HPLC	Ultrapore C ₁ (4.6 \times 75 mm, Beckman)	0–50% (15 min) 50–80% (5 min)	1.35 \pm 0.41	54.5

Experimental details are indicated in the Method section. FPLC: fast protein liquid chromatography; Sp. activity: specific activity in pmol AI min⁻¹ mg⁻¹ of protein.

peptide is very similar to the vertebrate ANG II, its precursor seems to be different from that of vertebrates, the angiotensinogen (protein of ca. 60 kDa). Western blot analyses performed in *T. tessulatum* have revealed the existence of a multiple hormone ANG II-like precursor of ca. 19 kDa (22). This protein possesses

at least four epitopes recognized by three different polyclonal antisera (an anti- γ -MSH, an anti-ANG I, and an anti-ANG II) and by a monoclonal antibody (Tt159) specific for epitopes contained in *T. tessulatum* supraesophageal ganglia (22). Three of the four epitopes recognized have been identified. The *N*-terminal

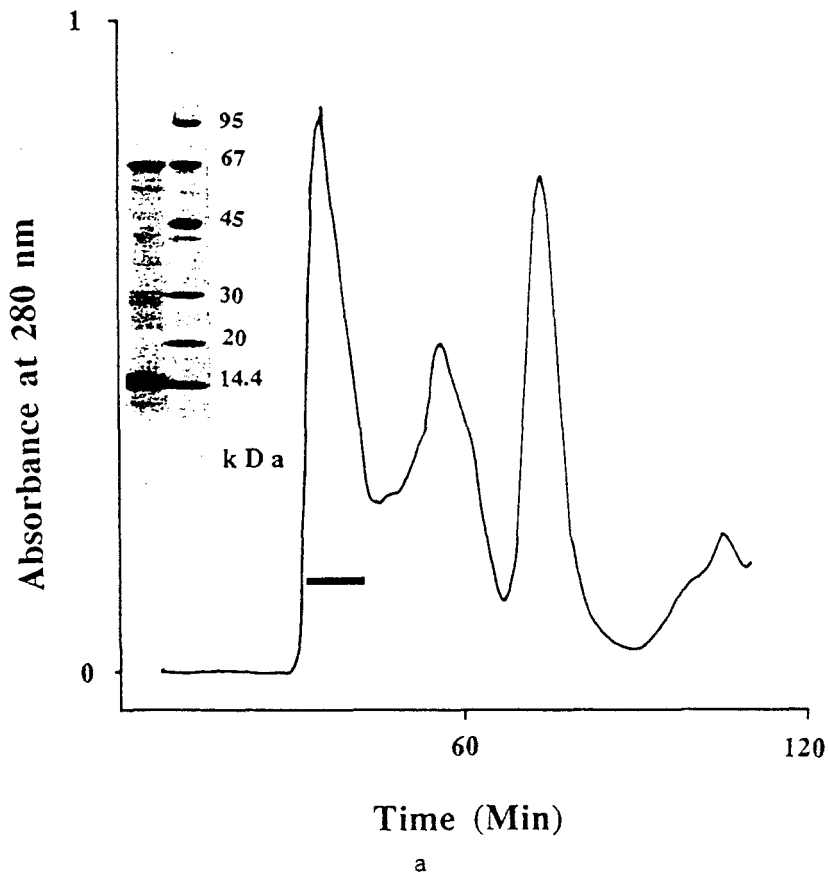


FIG. 1. Elution profiles of the renin-like enzyme following purification steps. (a) Elution profile on Superdex G75 column; (b) elution profile on Mono Q column; (c) final step of purification on C3 reversed-phase column. The solid bars indicate the fractions containing the renin-like enzyme. Insets represent the fractions containing the renin-like enzyme separated by SDS-PAGE. The small arrow indicates position of the renin-like enzyme, arrowheads to the left of the silver staining gel indicate molecular mass standards.

part of a fragment of this precursor has recently been determined and the first 14 amino acid residues reveal the existence of both ANG I and ANG II (12). The third epitope is a peptide related to the vertebrate γ_1 -MSH (23). The fragment of the ANG II-like precursor presents in its sequence the processing sites of the metabolic enzymes (i.e., renin and ACE) (12). Moreover, an ACE-like enzyme close to vertebrate ACE has recently been identified in *T. tessulatum* (unpublished data). These data suggest the existence in leeches of a renin-angiotensin-like system (RAS), similar to the RAS in vertebrates.

The aim of this work was to identify biochemically in *T. tessulatum* the renin-like enzyme to demonstrate the existence of a complete renin-angiotensin-like system in invertebrates.

METHOD

Animals

Mature specimens of the rhynchobdellid leech *T. tessulatum*, reared under laboratory conditions as described by Malecha et al. (13), were used in this study.

Antiserum

A rabbit polyclonal antiserum specifically directed against the carboxy-terminus of mammalian ANG I (a-ANG I) was used in this study. It was generated in a rabbit using synthetic human ANG I (Sigma) coupled to human serum albumin via glutaraldehyde. In enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) cross-reaction of the antiserum was 100% for ANG I and 10% for ANG II. No cross-reaction was observed with synthetic porcine angiotensinogen tetradecapeptide (TDP) (Sigma).

Immunoassays

Dot immunobinding assay (DIA) and ELISAs based on the protocols of Salzet et al. (18,24) were used to follow the renin-like activity during the purification procedures. Quantifications of ANG I were done in direct ELISA.

Purification

Step I: Renin-like enzyme extraction. After anesthesia of the animals in 0.01% chloretone, head parts of *T. tessulatum* were

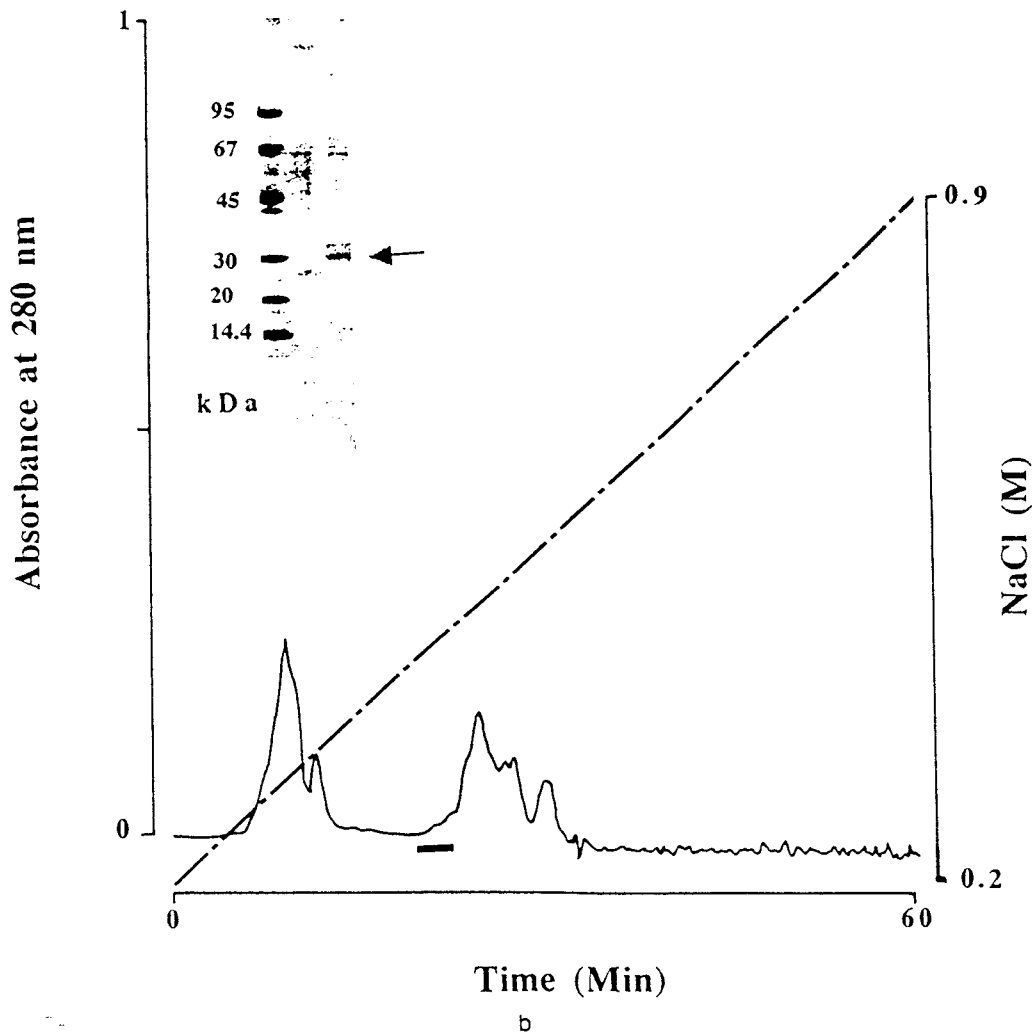


FIG. 1. Continued

excised, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C . Five hundred head parts (5 g) were placed in 25 ml (1 g/5 ml) Tris-HCl buffer (TBS), pH 8.4, 20 mM containing 200 mM NaCl and homogenized at 4°C with a polytron (5×15 -s bursts on setting 9). After centrifugation (30 min at 12,000 rpm on a Sigma 2K15 rotor at 4°C), the pellet was reextracted six-fold with the same amount of saline solution. The combined supernatants were centrifuged at 4°C , two-fold, 1 h at 10,000 rpm on a Beckman centrifuge (JA-20 rotor). The clear supernatant was filtered on nitrocellulose membranes (0.45 μm pore size, Millipore).

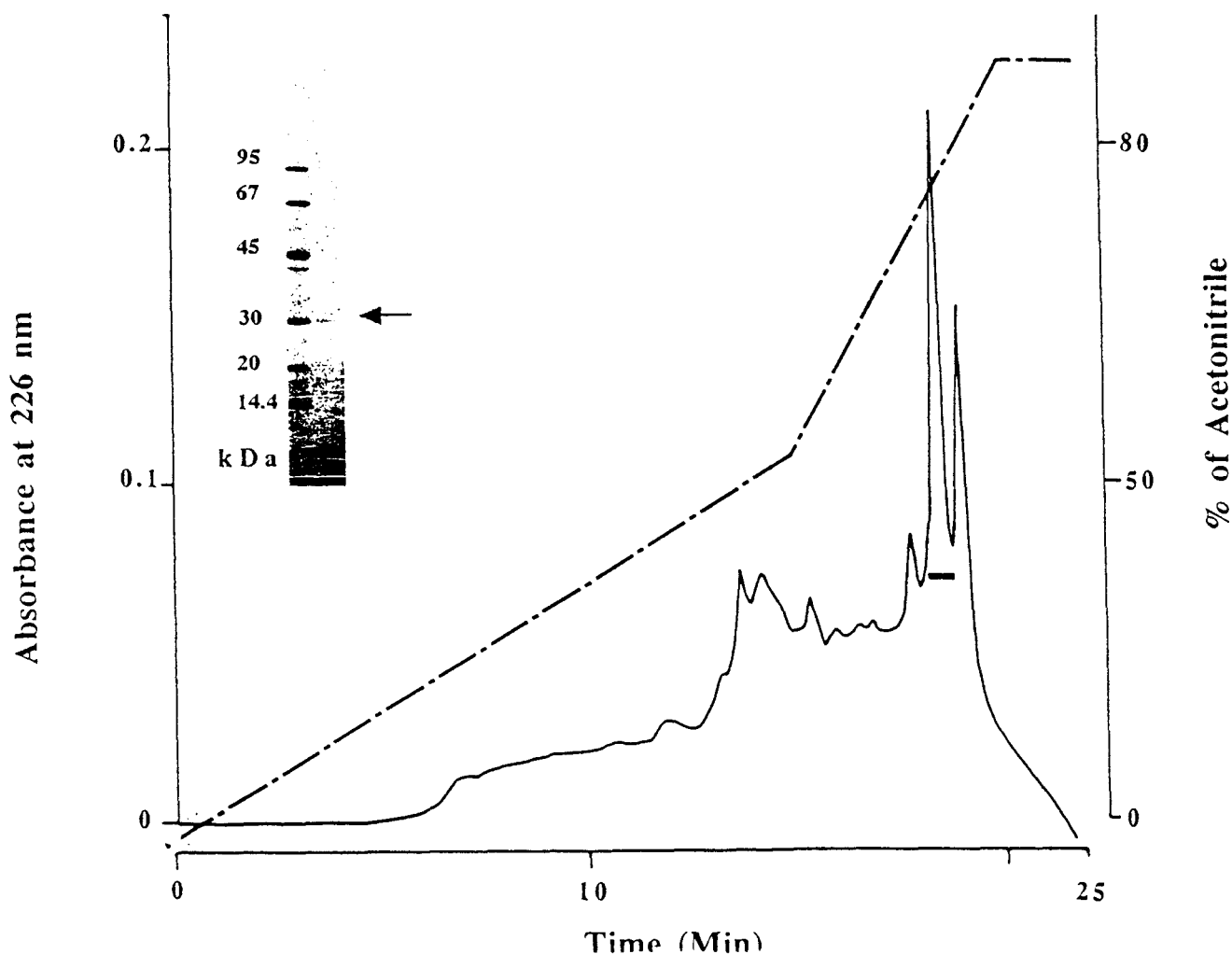
Protein concentrations were determined with the Bradford procedure (1) using γ globulin as a standard.

Step II: gel permeation chromatography. The crude extract was applied onto a column of Superdex G75 (16/60, Pharmacia), pre-equilibrated with TBS at a flow rate of 1 ml/min, and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by absorbance at 280 nm. All column fractions were assayed for renin-like activity.

Step III: chromatography on mono Q. A pool of fractions containing the renin-like enzyme was loaded onto a Mono Q column (HR 5/5, Pharmacia), equilibrated in 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.4. The column was washed with the same buffer and eluted with a linear gradient of 0.2–0.9 M NaCl in 60 min at a flow rate of 1 ml/min.

Step IV: reversed-phase HPLC. The active fractions from the Mono Q were separated on a C3 Ultrapore column (75×4.6 mm, Beckman), equilibrated in water. Elution was performed with a discontinuous linear gradient of acetonitrile/water over 0–50% for 15 min and over 50–80% for 5 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by absorbance at 226 nm. The acetonitrile was removed from the eluted fractions by freeze-drying using a vacuum centrifuge (Savant). Fractions were adjusted to pH 7.4 by adding TBS, and the presence of renin-like enzyme was detected by renin assay.

All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a photodiode array detector Beckman 168.



c

FIG. 1. Continued

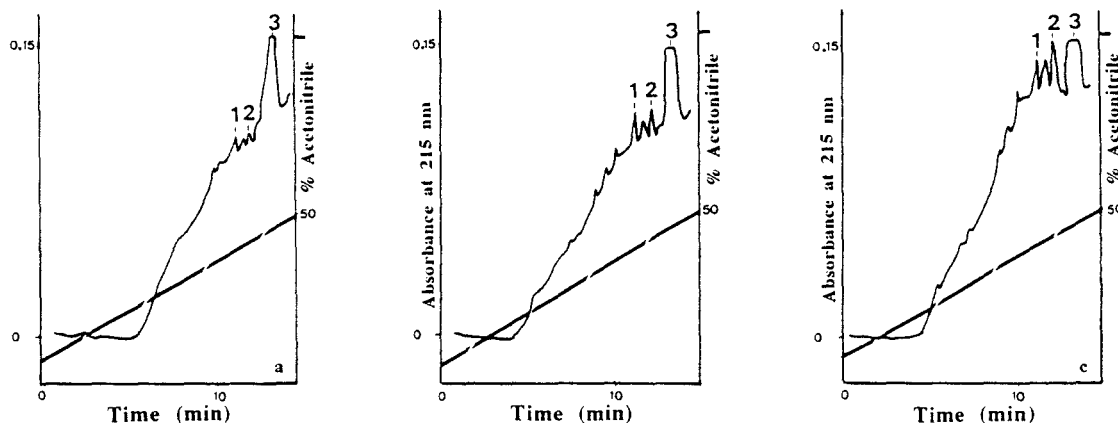


FIG. 2. Time course of hydrolysis of TDP by the renin-like enzyme. TDP 10 μ l (1 mg/ml) was incubated (a) 5 min, (b) 15 min, and (c) 30 min with the renin-like enzyme (60 ng/assay). The metabolites Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴ peptide (1) and ANG I (2) were resolved from TDP (3) by reversed-phase HPLC with UV detection at 215 nm. The UV absorbing peak at 12.7 min is an unidentified metabolite.

Electrophoresis

Electrophoresis analysis of the proteins was performed in 10–25% SDS/polyacrylamide gradient gels as described by Laemmli (10).

Determination of the Renin-Like Activity (RLA)

Immunoenzymatic assays. The assay of RLA was performed on fractions obtained at each step of purification by DIA and ELISA of ANG I generated *in vitro* in the following incubation buffer (16): 200 μ l sample, 100 μ l TBS, pH 7.4, containing 4 mM 2,3-dimercaptopropanol, 3.2 mM 8-hydroxyquinoline sulfate, and 5.9 mM EDTA-Na, and 10 μ l TDP (1 mg/ml) was incubated for 90 min at 37°C. The reaction was stopped by placing incubation vessels on ice. Blanks were prepared for each sample with the same procedure without TDP. Control experiments were performed by adding 50 μ M pepstatin A, a specific aspartyl protease inhibitor according to Guyene et al. (8).

HPLC renin-like enzymatic activity determination. Active fractions containing the purified renin-like enzyme were incubated with 10 μ l TDP (1 mg/ml) in the presence or absence of various concentrations of pepstatin A (Sigma). Metabolism was terminated by addition of 30% TFA (v/v). Samples were spun at high speed (12,000 \times g; Sigma 2K15) for 15 min. Supernatants were analyzed on a RP100 Lichrosphere C8 (125 \times 4.6 mm, Waters) reversed-phase HPLC column according to Welling et al. (30). The molar ratio of ANG I and Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴ was calculated from data given by Davies (5) on the quantification of peptides by HPLC.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of the Renin-Like Enzyme

The purification procedures are summarized in Table 1. After a TBS extraction, filtered supernatants were subjected to a gel permeation chromatography on a fast protein liquid chromatography system (FPLC) with a Superdex G75 column [Fig. 1(a)]. A single zone at a retention time between 39 and 44 min, corresponding to proteins having a molecular mass less than 67 kDa according the SDS-PAGE [Fig. 1(a)], was detected in RLA. The enzyme contained in the active zone was then purified by anion exchange on a FPLC Mono Q column

using a linear gradient of NaCl from 0.2 to 0.9 M in 60 min. Under these conditions, the aspartyl protease [Fig. 1(b)] eluted between 0.33 and 0.375 M NaCl. SDS-PAGE control showed at least two bands at a molecular mass between 30 and 45 kDa [Fig. 1(b)]. Finally, active fractions in RLA were applied to a C3 reversed-phase HPLC column with a discontinuous linear gradient of acetonitrile/water [Fig. 1(c)]. A single peak presenting the activity in RLA was resolved at a retention time of 18.37 min. Control of purity of the isolated enzyme performed on SDS-PAGE showed a single band at a molecular mass of 32 kDa [Fig. 1(c)]. This mass is smaller than the ones of the mammalian active renin (human, 44 kDa) (3) or non-mammalian active renin (fish, 48 kDa) (28).

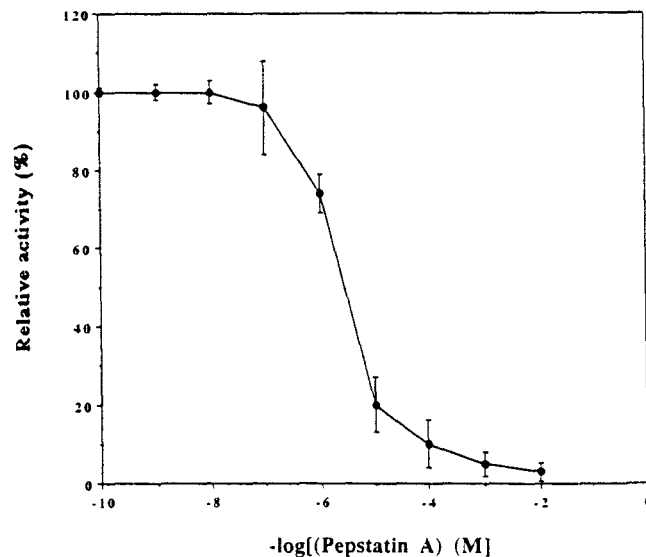


FIG. 3. Inhibition of the hydrolysis of TDP by pepstatin A. Inhibition of the cleavage of the Leu¹⁰-Leu¹¹ bond of the TDP (1 mg/ml) by different concentrations of pepstatin A was determined. Peptidase activity was measured by quantifying the peptide product ANG I in reversed-phase HPLC.

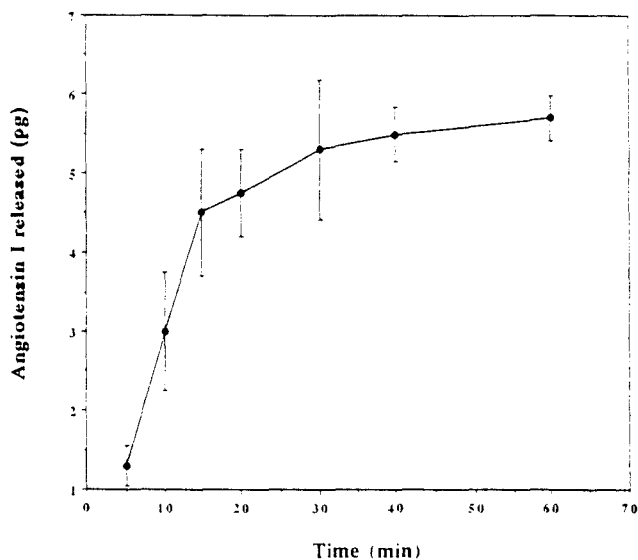


FIG. 4. Metabolism of synthetic TDP by the renin-like enzyme. TDP 10 μ l (1 mg/ml) was incubated with purified renin-like enzyme (0.1 μ g/assay) at 37°C at pH 7.4. The reactions were stopped by placing incubation vessels on ice, before being analyzed in RLA. Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

The Renin-Like Activity

Synthetic TDP hydrolysis by the renin-like enzyme. As demonstrated by data obtained by many reversed-phase HPLC, synthetic TDP (DRVYIHPFHLVYS) is hydrolyzed by the purified renin-like enzyme at the Leu¹⁰-Leu¹¹ bond yielding ANG I and the Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴ peptide in almost equimolar amounts (molar ratio of 1.00: 1.12 Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴/ANG I) (Fig. 2). The time course of the hydrolysis of TDP by renin-like enzyme monitored with reversed-phase HPLC indicated that half of TDP is converted in ca. 15 min, reflecting a high and rapid activity of this enzyme.

Inhibition of the TDP hydrolysis. To confirm that the cleavage of the TDP in ANG I is really due to the isolated enzyme, an inhibition curve with pepstatin A was generated by measuring the rate of formation of ANG I at different inhibitor concentrations (Fig. 3). Maximum inhibition by pepstatin A of around 90% was achieved at an inhibitor concentration of 26 μ M (IC₅₀ 4.6 μ M), indicating the high specificity of the renin-like enzyme towards the Leu¹⁰-Leu¹¹ bond of TDP and the poor efficiency of this inhibitor towards this enzyme (Fig. 3). Similar results were obtained in vertebrates (3).

Specific activity. The specific activity (Fig. 4) of the renin-like enzyme on TDP hydrolysis (1.35 \pm 0.416 pmol of ANG I/min per mg of protein) is much higher than the one registered in plasma of fishes [i.e., 1.49 \cdot 10⁻⁵ \pm 1.28 \cdot 10⁻⁶ pmol of ANG I/mg/min for *Pagothenia bernachii*, 2.86 \cdot 10⁻⁵ \pm 6.41 \cdot 10⁻⁶ pmol of ANG I/mg/min for *Chionodraco hamatus* (27) and 0.146 pmol/mg/min for *Scyliorhinus canicula* (28)]. But it is less active than the one obtained in the snake *Bothrops jararaca* (4.82 pmol/mg/min) (7).

Significant hydrolysis of TDP with a K_m of 22 μ M at 37°C occurs only at the Leu¹⁰-Leu¹¹ bond, yielding ANG I and the Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴ peptide as products. K_m of the renin-like enzyme is in line with result obtained on TDP with human renin (33 μ M) but was less active than canine renin (7 μ M) (2). How-

ever, the leech renin-like enzyme K_{cat} value (2.7 mol ANG I/mol renin per min) obtained on TDP substrate is inferior to the ones registered on the same substrate by human renin (K_{cat} 13) or canine renin (K_{cat} 112). This result could be explained by the fact that kinetic parameters for cleavage of angiotensinogen by renin differs from the type of angiotensinogen used (4). Skeggs et al. (25) showed that hog renin cleaves the Leu¹⁰-Leu¹¹ bond of synthetic hog renin Asp¹-Ser¹⁴ tetradecapeptide, and that the minimal peptide recognized and cleaved was a Hisⁿ-Tyr¹³ octapeptide. These latest experiments revealed the very high specificity of renin, which is probably due to the fact that the amino acids of the substrate surrounding the Leu¹⁰-Leu¹¹ cleavage site strongly interact with different renin subsites.

The ratio K_{cat}/K_m (10⁶/mol per min) corresponding to the catalytic efficiency of the enzyme is low in the case of the renin-like enzyme (0.12) on TDP substrate. However, as regards experiences conducted with human renin on different substrates (3), the ratio K_{cat}/K_m changes in function of the substrate used [e.g., K_{cat}/K_m : 0.5 on human angiotensinogen (DRVYIHPFHVHN . . .); 0.22 on rat angiotensinogen (DRVYIHPFHLVYS . . .); 0.25 on synthetic human TDP (DRVYIHPFHLVIHN); 1.33 on synthetic porcine TDP (DRVYIHPFHLVYS); 0.006 on synthetic rat TDP (DRVYIHPFHLVYS); and 0.0007 on synthetic human (Tyr¹²) TDP (DRVYIHPFHLVYHN) (3)]. One of the reasons for these results is the sequence of the human angiotensinogen itself, which differs markedly from other substrates near the Leu¹⁰-Leu¹¹ cleavage site.

These arguments could also be advanced in the case of the leech renin-like enzyme. In fact, the N-terminal part (DRVYIHPFHLXWG . . .) of the fragment of leech ANG II-like precursor possesses the Leu¹⁰-Leu¹¹ cleavage site as in the TDP (12). However, the amino acids of the substrate surrounding the cleavage site are different in ANG II-like precursor fragment (X¹²W¹³G¹⁴ vs. V¹²Y¹³S¹⁴ in TDP). Moreover, we

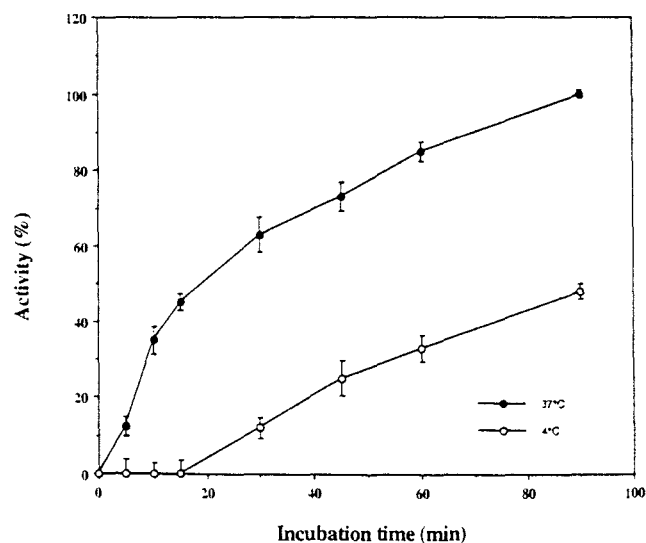


FIG. 5. Effect of the temperature on the renin-like activity. Renin-like enzyme (0.1 μ g) was incubated with 10 μ M TDP separately at 37°C and 4°C in 20 mM Tris-HCl/0.2 M NaCl, pH 7.4. Samples were removed at time intervals and tested in HPLC. Peptidase activity obtained from the resulting supernatant was assayed in RLA and results are expressed as a percentage of total activity. There was no loss of renin-like activity during the course of the experiment. Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

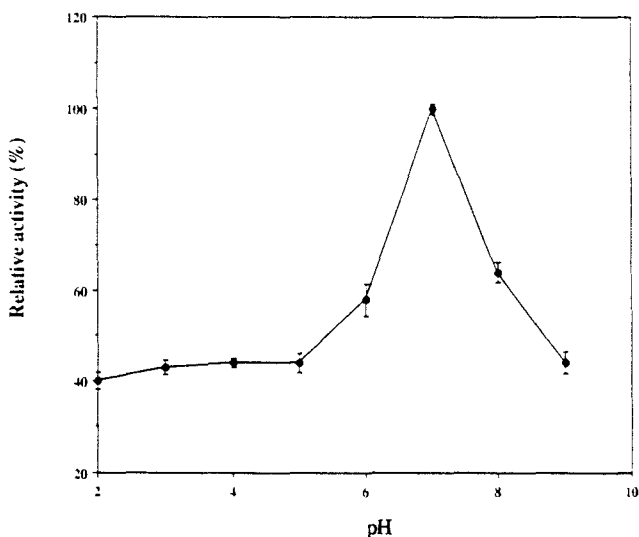


FIG. 6. Effect of pH on hydrolysis of synthetic TDP by purified renin-like enzyme. In the assay, 0.1 μ g renin-like enzyme was incubated with 10 μ M TDP in Tris-HCl/0.2 M NaCl in pH ranging from 2 to 9 at 37°C for 35 min. The conversion of TDP in ANG I and Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴ peptide was monitored with HPLC and assayed with RLA. Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

could speculate that the rest of ANG II-like precursor molecule plays an important part in renin-like specificity, as shown in the case of the human renin affinity for human angiotensinogen (DRVYIHPFHVHN . . .), which is 10 times superior that of the corresponding synthetic tetradecapeptide (DRVYIHPFHLLVYS) (3).

Effect of temperature on the TDP hydrolysis by the renin-like enzyme. To investigate the effect of temperature on the leech aspartyl protease, fractions containing the renin-like enzyme were incubated at either 4°C or 37°C in 20 mM Tris-HCl containing 0.2 M NaCl, pH 7.4, over 90 min. At various time intervals, samples were removed and tested in RLA (Fig. 5). Forty-

five percent of the renin-like activity was obtained after 15-min incubation at 37°C instead of 0% at 4°C during the same period. Nevertheless, the renin-like activity at 4°C reaches 40% at the end of the test, whereas we observed 100% of the renin-like activity at 37°C. These data suggest that this enzyme stays still active at this low temperature, presumably because *T. tessulatum* is a leech able to live in cold water and that this enzyme is specialized to work under constantly cold temperature. Similar findings were obtained in the Antarctic fishes *C. hamatus* and *P. bernachii* (27). The authors showed that fish renin is able to convert angiotensinogen in ANG I at 0°C (27).

Effect of pH on TDP hydrolysis by the renin-like enzyme. To investigate if the aspartyl protease activity measured is really due to a renin-like enzyme similar to renin (EC 3.4.23.15) and not to a cathepsin D or other acid proteases, fractions containing the renin-like enzyme were incubated with 10 μ M of TDP (1 mg/ml) in 20 mM Tris-HCl containing 0.2 M NaCl in pH ranging from 2 to 9 at 37°C for 40 min and tested in RLA. The optimal pH for this enzyme was found to be between 7 and 8 (Fig. 6). These data are in line with results obtained with vertebrate renin, which works at neutral pH. This result demonstrates that the protease activity measured is produced by a renin-like enzyme and not by an acid protease.

CONCLUSION

These experiments clearly demonstrate the existence, in the leech *T. tessulatum*, of a renin-like enzyme acting at neutral pH at both 37°C and 4°C. This enzyme is able to release from an ANG II-like precursor, ANG I by cleavage of the Leu¹⁰-Leu¹¹ bond. Although this enzyme possesses a molecular mass (ca. 32 kDa) lower than vertebrate active renin (ca. 44 kDa), its activity is comparable and thus conserved during evolution. This finding constitutes the first biochemical evidence of a renin-like enzyme in an invertebrate.

Moreover, the presence in leeches of a complete RAS is suggested by our results and this is the first evidence of hormonal and associated metabolic enzymes in Annelids.

ACKNOWLEDGEMENT

We were very grateful to Annie Desmons for her technical help.

REFERENCES

- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyeing. *Anal. Biochem.* 72:248-254; 1976.
- Burton, J.; Quinn, T. The amino-acid residues on the C-terminal side of the cleavage site of angiotensinogen influence the species specificity of reaction with renin. *Biochim. Biophys. Acta* 952:8-12; 1988.
- Corvol, P.; Ménard, J. Renin inhibition: Immunological procedures and renin inhibitor peptides. *Kidney Int.* 34(Suppl.26):S73-S79; 1988.
- Cumin, F.; Le Nguyen, D.; Castro, B.; Ménard, J.; Corvol, P. Comparative enzymatic study of human renin acting on pure natural or synthetic substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 913:10-19; 1987.
- Davies, T. P. Methods of measuring neuropeptides and their metabolism. In: Kaufman, J.; McCubbin, A.; Nemeroff, C. B., eds. *The roles of neuropeptides in stress pathogenesis and systemic disease.* Orlando, FL: Academic Press, Inc.; 1990:147-177.
- Evans, B. D.; Pohl, J.; Kartsonis, N. A.; Calabrese, R. L. Identification of RFamide neuropeptides in the medicinal leech. *Peptides* 12:897-908; 1991.
- Gervitz, R. K.; Brandi, C. M. W.; Monteiro, S. H. C.; Picarelli, Z. P. Active and inactive renin in the plasma of the snake *Bothrops jararaca*. *Comp. Biochem. Physiol. [A]* 102:27-31; 1992.
- Guyene, T. T.; Devaux, C.; Ménard, J.; Corvol, P. Inhibition of human plasma renin activity by pepstatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43:1301-1306; 1976.
- Katoh, I.; Yasunaga, T.; Ikawa, Y.; Yoshinaka, Y. Inhibition of retroviral protease by an aspartyl protease inhibitor. *Nature* 329:654-656; 1987.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685; 1970.
- Lattion, A.-L.; Soubrier, F.; Allegrini, J.; Hubert, C.; Corvol, P.; Alhenc-Gelas, F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, nonduplicated form of the enzyme. *FEBS Lett.* 252:99-104; 1989.
- Laurent, V.; Bulet, P.; Salzet, M. A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin I-like molecule with forms of Vertebrates angiotensinogens: An hormonal system conserved in course of evolution. *Neurosci. Lett.* 190:175-178; 1995.
- Malecha, J.; Verger-Bocquet, M. A.; Tramu, G. Mise en évidence et évolution, au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motiline porcine dans le ganglion

- supraoesophagien de la sangsue *Theromyzon tessulatum*. Can. J. Zool. 67:636-640; 1989.
14. Misono, K. S.; Chang, J. J.; Inagami, T. Amino acid sequence of mouse submaxillary gland renin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4858-4862; 1982.
 15. Panthier, J. J.; Foote, S.; Chambraud, D.; Stosberg, A. D.; Corvol, P.; Rougeon, F. Complete amino acid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:90-92; 1982.
 16. Poulsen, K.; Nielsen, A. H. In: Robertson, J. I. S.; Nicholls, M. G., eds. The measurement of renin. London: Gower Medical Publishing; 1993:13.1-13.12.
 17. Saavedra, J. M. Brain and pituitary angiotensin. Endocr. Rev. 13:329-380; 1992.
 18. Salzset, M.; Bulet, P.; Van Dorsselaer, A.; Malecha, J. Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. Eur. J. Biochem. 217:897-903; 1993.
 19. Salzset, M.; Bulet, P.; Watez, C.; Malecha, J. FMRFamide-related peptides in the sex segmental ganglia of the Pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. Identification and involvement in the control of hydric balance. Eur. J. Biochem. 221:269-275; 1994.
 20. Salzset, M.; Bulet, P.; Verger-Bocquet, M.; Malecha, J. Isolation and structural characterization of enkephalin-related peptides in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. FEBS Lett. 357:187-191; 1995.
 21. Salzset, M.; Bulet, P.; Watez, C.; Verger-Bocquet, M.; Malecha, J. Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*. Angiotensin II amide. J. Biol. Chem. 270:1575-1582; 1995.
 22. Salzset, M.; Watez, C.; Baert, J.-L.; Malecha, J. Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. Brain Res. 631:247-255; 1993.
 23. Salzset, M.; Watez, C.; Bulet, P.; Malecha, J. Isolation and structural characterization of a novel peptide related to γ -melanocyte stimulating hormone from the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*. FEBS Lett. 348:102-106; 1994.
 24. Salzset, M.; Watez, C.; Slomianny, M. C.; Léü, B.; Siegert, K. J. ELISA for oxytocin. Highly sensitive tests and application for titration of an oxytocin-like substance in the leech *Erpobdella octoculata*. Comp. Biochem. Physiol. [C] 102:483-487; 1992.
 25. Skeggs, L. T.; Lentz, K. E.; Kahn, J. R.; Hochstrasser, H. Kinetics of the reaction of renin with nine synthetic peptides substrates. J. Exp. Med. 128:12-34; 1968.
 26. Turner, A. J.; Dowdall, M. J. The metabolism of neuropeptides. Both phosphoramidon-sensitive and captopril-sensitive metalloproteinases are present in the electric organ of *Torpedo marmorata*. Biochem. J. 222:255-259; 1984.
 27. Uva, B. M.; Masini, M. A.; Devecchi, M.; Napoli, L. Renin-angiotensin in Antarctic fishes. Comp. Biochem. Physiol. [A] 100:897-900; 1991.
 28. Uva, B. M.; Masini, M. A.; Hazon, N.; O'Toole, L. B.; Henderson, I. W.; Ghiani, P. Renin and angiotensin converting enzyme in Elasmobranchs. Gen. Comp. Endocrinol. 86:407-412; 1992.
 29. Verger-Bocquet, M.; Watez, C.; Salzset, M.; Malecha, J. Immunohistochemical identification of peptidergic neurons in compartment 4 of the supraoesophageal ganglion of the leech *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). Can. J. Zool. 70:856-865; 1992.
 30. Welling, G. W.; Scheffer, A. J.; Welling-Wester, S. Determination of enzyme activity by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. [B] 659:209-225; 1994.

Molécule apparentée à l'ACE :

Article (3)

Article (4)

Article (5)

Molécule apparentée à l'ACE

Laurent, V. and Salzet, M. A Comparison of the N terminal sequence of the leech *Theromyzon tessulatum* ACE-like enzyme with forms of vertebrate ACEs Neuroscience Letters 198 (1995) 60-64.

Laurent, V. and Salzet, M. Biochemical Properties of the ACE-like enzyme from the leech *Theromyzon tessulatum* Peptides, Vol.17, n°5, pp. 737-745, 1996.

Vandenbulcke, F., Laurent, V., Verger-Bocquet, M., Stefano, G. B. and Salzet, M. Biochemical identification and ganglionic localization of leech Angiotensin converting enzymes Brain research.

Comme nos résultats semblent confirmer l'existence d'une aspartyl protéase responsable de la conversion du précurseur de l'angiotensine en AI, on peut penser qu'un système RAS complet conduisant à la libération des angiotensines actives, est également présent chez la sangsue. Pour valider cette hypothèse, après l'isolement de la rénine-like, la mise en évidence et la caractérisation biochimique d'une molécule apparentée à l'ACE, permettant la libération de l'angiotensine active, s'avéraient nécessaires. De plus, son étude à l'aide de techniques immunocytochimiques nous permettrait de la localiser.

Résultats

Une molécule apparentée à l'ACE (dipeptidyl carboxypeptidase, kininase II) nommée ACE-like a été mise en évidence et étudiée chez la sangsue. Quatre étapes de purification ont conduit à l'isolement de l'ACE-like membranaire. L'enzyme pure possède une masse moléculaire de 120 kDa en électrophorèse SDS-PAGE. Or elle est facilement solubilisée de la membrane et semble également pouvoir exister sous forme soluble active. L'hypothèse de l'existence de deux isoformes a alors été confirmée, par l'utilisation d'un anticorps anti-ACE dirigé contre la séquence N terminale de l'ACE membranaire de sangsue. En effet, l'anticorps a été utilisé en colonne d'affinité afin de piéger l'ACE soluble contenue dans les extraits de

système nerveux central de sangsue. Deux protéines ont été identifiées en Western blot, et la méthode du PAS (Periodic acid -Schiff) a permis de souligner leur nature glycoprotéique. La forme soluble de l'ACE-like possède une masse moléculaire de 100 kDa et une séquence N terminale identique à celle de l'ACE-like membranaire. L'ACE-like serait donc ancrée à la membrane du côté C terminal comme chez les vertébrés. L'existence de ces deux isoformes est proche de ce qui est connu chez les vertébrés, où la forme soluble a été identifiée dans les fluides corporels.

Chez la sangsue, le travail réalisé en immunocytochimie a permis de localiser l'ACE-like dans les neurones, au niveau membranaire et dans les granules de sécrétion à la périphérie des cellules, et également dans la commissure dorsale et l'aire neurohémale. Tous ces résultats confirment les données biochimiques sur l'existence de cette ACE-like sous deux isoformes (membranaire et soluble). En effet, l'activité catalytique et les paramètres cinétiques déterminés chez la sangsue, démontrent la présence de deux formes, de même que leur nature de type peptidyl carboxypeptidase, comme celle de l'ACE des mammifères.

D'autre part, les deux ACE-like sont capables de cliver l'AI et d'autres substrats : la D[Ala²-Leu⁵] enképhaline, le substrat chromogénique : Bz-G-H-L, la bradykinine, avec des paramètres cinétiques similaires à ceux des dipeptidyl carboxypeptidases de vertébrés. Elles semblent cliver de préférence les acides aminés hydrophobes telle la phénylalanine. Ces résultats indiquent que les ACE-like possèdent un second rôle : celui d'endopeptidase, bien que l'on ne sache pas encore si les deux isoformes se partagent ou se répartissent les deux types d'activité (carboxypeptidase et endopeptidase).

En outre, l'ACE-like attaque ses substrats de façon optimale à pH 8.4 et à 37° C. Son activité est inhibée de façon réversible par l'EDTA, ce qui permet de la ranger dans la famille des « Zincin » métallopeptidases. En effet, le ZnCl₂ permet de réactiver l'enzyme. Dans tous les cas, elle a besoin de la présence de Cl⁻ pour fonctionner. Cet aspect permet de penser qu'elle est proche des ACE à un seul domaine catalytique C. La même conclusion s'applique aux deux enzymes.

Leur séquence N terminale est identique et possède jusqu'à 87 % d'homologie avec l'ACE de cochon d'Inde et 67 % avec les ACEt. L'ensemble de nos résultats confirme la conservation au cours de l'évolution de cette enzyme clef.

Les études immunocytochimiques ont également permis de mettre en évidence l'ACE-like à la fois au niveau des neurones, et des immunocytes. Peu d'études chez les vertébrés ont été réalisées sur l'implication de l'ACE dans la modulation du système immunitaire et notre modèle semble particulièrement adapté à cette étude. On peut donc supposer un rôle essentiel

de cette enzyme et du RAS non seulement dans l'équilibre hydrominéral mais aussi peut être dans d'autres fonctions telle que l'immunité.

Ce travail démontre l'existence d'une ACE-like chez la sangsue, proche de l'ACE testiculaire de par sa structure, son activité, sa localisation et ses propriétés.



ELSEVIER

Neuroscience Letters 198 (1995) 60–64

**NEUROSCIENCE
LETTERS**

A comparison of the N-terminal sequence of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin converting-like enzyme with forms of vertebrate angiotensin converting enzymes

Virginie Laurent, Michel Salzet*

Laboratoire de Phylogénie moléculaire des Annélides, ER 87 CNRS, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudinées, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

Received 18 April 1995; revised version received 7 August 1995; accepted 16 August 1995

Abstract

This paper reports the purification of an angiotensin-converting like enzyme (ACE) of ca. 120 kDa from extracts of head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum*. After solubilization with Triton X-114, the ACE-like enzyme contained in the detergent-poor fraction was separated using five steps of purification including gel permeation and anion exchange chromatographies followed by reverse-phase HPLC. The first 23 amino acid residues of the N-terminal part (GLDPELSPGCFSADEAGAQLFAE) of the purified *S*-pyridylethylated leech ACE established by automated Edman degradation revealed ca. 87% sequence identity with the N-terminal sequence of the guinea pig ACE. This enzyme cleaves the hippuryl-His-Leu substrate with a specific activity of 5600 nmol hippurate min⁻¹ mg protein⁻¹. Hydrolysis of this substrate by ACE-like enzyme is inhibited at 80% by 10 μM captopril or 10 μM lisinopril (IC₅₀ of 200 nM and 50 nM, respectively). This enzyme is close in sequence and in activity to single domain vertebrate ACE. This is the first N-terminal sequence of an ACE-like enzyme determined in invertebrates.

Keywords: Renin-angiotensin system; Angiotensin-converting enzyme; Angiotensins; Neuropeptides; Leech

Angiotensin-converting enzyme (ACE) (EC 3.4.15.1, dipeptidyl carboxypeptidase I, kinase II) is a key enzyme of the renin-angiotensin system (RAS) which leads to the formation of the potent vasopressor angiotensin AII (AII), by cleavage of His⁹-Leu¹⁰ from the C-terminus of the inactive decapeptide angiotensin I (AI) [6]. It also inactivates the vasodepressor peptide bradykinin and possesses a wide specificity since it hydrolyzes several natural and synthetic peptides in vitro [4]. Mammalian ACE occurs in two distinct forms, somatic ACE (M_r 170–190 kDa) and testicular enzyme (M_r ca. 100 kDa) [4]. The cloning and characterization of cDNA clones for human [5] or mouse [17] somatic ACE has shown that somatic enzyme comprises two highly homologous domains with two putative active sites. In contrast, cDNAs for human [3] or mouse [1] testicular ACE provide a single active-site region presenting an identical sequence with the C-domain of the corresponding somatic ACE. The two forms of mammalian ACE are encoded in a single copy of ACE gene, and

transcription of the testicular enzyme has been shown to be under the control of an intragenic testis-specific promoter [6]. Both ACE isoforms hydrolyze AI, bradykinin and other natural peptide substrates as substance P and enkephalins [4].

In invertebrates, little is known about this enzyme except in insects and in leeches. In the insect *Musca domestica*, an ACE-like enzyme of ca. 87 kDa which cleaves the benzoyl-Gly-His-Leu substrate (specific substrate for vertebrate ACE) with a high specificity has been described [8]. In Hirudinae, an AII has been isolated in the leech *Theromyzon tessulatum* [16] and a peptide related to the angiotensin family, an angiotensin II-amide, differing from vertebrate AII by a carboxy-terminus amidation has been isolated in the leech *Erpobdella octoculata* [14]. Injection in the leech *Theromyzon tessulatum* of either AII or AII-amide resulted in a decrease of mass expressing a diuretic effect of these molecules, AII-amide being 100-fold more effective than AII [14]. Furthermore, the AII-like precursor has been identified in central nervous system. It is a multiple hormone precursor of ca. 19 kDa

* Corresponding author, Tel. and Fax: +33 2043 4054.

Table 1

Purification of the ACE-like enzyme from head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum*. Experimental details are indicated in text.

Step	Column material	Elution conditions	Sp. activity	Yield (%)
1. Protein solubilization	Triton X-114 treatment	Detergent-poor fractions	68	100
2. Gel permeation (FPLC)	Superdex G75 (16/60, Pharmacia)	Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, pH 8.4	128	80
3. Anion exchange (FPLC)	Mono Q (HR 5/5, Pharmacia)	NaCl 0.2–0.9 (60 min) in Tris-HCl 20 mM, pH 8.4	400	72
4. Reversed-phase HPLC	Ultrapore C ₃ (4.6 × 75 mm, Beckman)	0–50% ACN/TFA (15 min), 50–80% ACN/TFA (5 min)	1100	58
	Ultrapore C ₃ (4.6 × 75 mm, Beckman)	0–80% ACN/TFA (40 min)	5600	32

FPLC, fast protein liquid chromatography; ACN, acetonitrile; TFA, trifluoroacetic acid (0.1%); Sp. activity, specific activity, nmol hyppurate min⁻¹ mg protein⁻¹.

bearing at least four different epitopes, i.e. three immunoreactive to three different polyclonal antisera (an anti-AI, an anti-AII and an anti- γ MSH) and one to a monoclonal antibody (Tt159) specific of epitopes contained in *T. tessulatum* supraesophageal ganglia [16]. The N-terminal sequence of a fragment of the AII-like precursor (DRVYIHPFHLXWG...) has been determined and possesses 78.5% of sequence identity with the N-terminal sequence of human angiotensinogen [9]. In addition, the Phe⁸-His⁹ and Leu¹⁰-Leu¹¹ bonds of the proteolytic sites of the metabolic enzymes (ACE and renin, respectively) were conserved in leech AII-like precursor. Furthermore, we recently detected in *T. tessulatum* crude extract an ACE-like (this paper) and an endopeptidase-24.11-like enzyme (unpublished data). Involvement of these enzymes in enkephalins inactivation or in metabolism of angiotensins is sustained by isolation during purification of enkephalins from *T. tessulatum* brains, of the dipeptides Phe-Leu and Phe-Met, suggesting existence in leeches of such enzymes [15].

The aim of the present paper is to determine the N-terminal sequence of the ACE-like enzyme from a phylogenetic point of view.

For this study, mature specimens of the rhynchobdellid leech *T. tessulatum*, reared under laboratory conditions as described by Malecha et al. [10] were used. The ACE-like activity was estimated by chromogenic and immuno-enzymatic assays. Assay of ACE-like activity (ACELA) was performed as described by Pre and Bladier [12]. For the immunoenzymatic assay, a polyclonal antiserum directed against AII (a-AII) according to Salzet et al. [16] was used in this study. The enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) procedures were based on the protocols of Salzet et al. [14]. The angiotensin I hydrolysis assay (AIHA) was performed on fractions obtained at each step of purification by ELISA of AII generated in vitro in the following incubation buffer: 200 μ l sample, 100 μ l TBS (pH 8.4) containing 4 mM 2,3-dimercaptopropanol, 3.2 mM 8-hydroxyquinoline sulphate and 10 μ M AI were incubated for 90 min at 37°C. The reac-

tion was stopped by placing incubation vessels on ice. Blanks were prepared for each sample with the same procedure without AI.

For the enzyme purification, a membrane preparation was firstly performed. After anesthesia of the animals in 0.01% chlorethone, head parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. Five hundred head parts (5 g) were placed in 25 ml (1 g/5 ml) TBS, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), containing 200 mM NaCl and homogenized at 4°C with a polytron (5 × 15 s bursts on setting 9). After centrifugation (30 min at 6000 × g on a Sigma 2K15 rotor at 4°C), the pellet was re-extracted six-fold with the same amount of saline solution. The combined supernatants were centrifuged at 20 000 × g for 1 h on a Beckman centrifuge (JA-20 rotor) at 4°C to yield a membrane preparation. These membranes were washed by resuspension in TBS, followed by sedimentation at 20 000 × g. The washing procedure was repeated until a clear supernatant was obtained. The washed membranes were resuspended in TBS and stored at -20°C. Protein concentration was determined with the Bradford procedure [2] using γ -globulin as standard. In order to isolate the ACE-like enzyme, a phase separation of membrane proteins with Triton X-114 was performed. For this step, membranes (30 mg of protein) were mixed with TBS containing 0.5% (w/v) Triton X-114 and kept on ice for 30 min with occasional shaking. Detergent-insoluble material was removed by centrifugation at 20 000 g for 1 h at 4°C. After incubation at 20°C for 15 min to induce the phase separation of Triton X-114, samples were immediately centrifuged at 6000 g on a Sigma 2K15 rotor. The supernatant was collected and the detergent layer resuspended in an equal volume of TBS. Both detergent-rich and detergent-poor fractions were assayed for ACE activity and the major part (80%) of the ACE activity was found in the detergent-poor fraction. This fraction was then used for the different steps of purification.

The purification procedure consisted in four steps. In Step I, the detergent-poor fraction was applied onto a

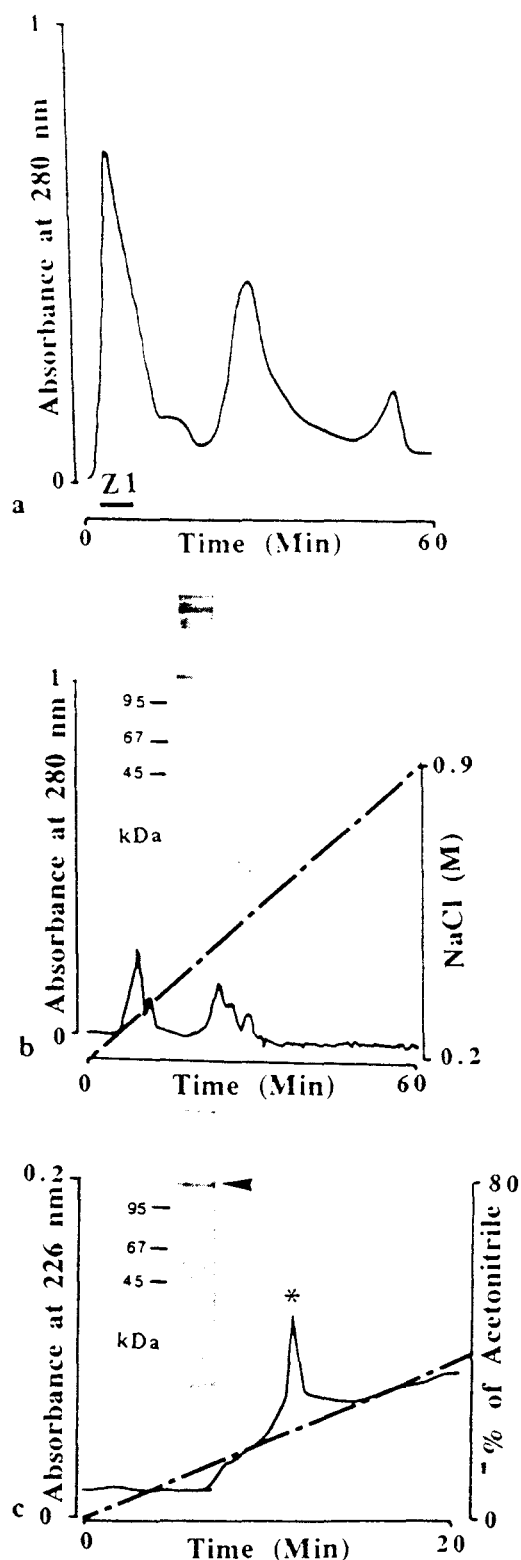


Fig. 1. Elution profiles of the ACE-like enzyme following purification steps. (a) Elution profile on Superdex G75 column. (b) Elution profile on MonoQ column. (c) Final step of purification on C3 reversed-phase column. The solid bars indicate the fractions containing the ACE-like enzyme. Inset photographs represent the fractions containing the ACE-like enzyme separated by SDS/PAGE. The asterisk indicates the peak containing the purified protein which was subjected to an automatic Edman degradation.

column of Superdex G75 (16/60, Pharmacia), pre-equilibrated with TBS at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by absorbance at 280 nm. All column fractions were assayed for ACE-like activities. In Step II, the pool of active fractions was loaded onto a Mono Q HR 5/5 column (Pharmacia), equilibrated in TBS. The column was washed with the same buffer and eluted with a linear gradient of NaCl over 0.2–0.9 M for 60 min at a flow rate of 1 ml/min. Active fractions from the MonoQ were then separated on a C₃ Ultrapore column (75 × 4.6 mm, Beckman), equilibrated in water acidified with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Elution was performed with a discontinuous linear gradient of acetonitrile in acidified water over 0–50% for 15 min and over 50–80% for 5 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by absorbance at 226 nm and the presence of ACE-like enzyme was detected by ACE assay. Finally, fractions containing the ACE-like material were further applied to the same column with a shallower gradient of acetonitrile equilibrated in acidified water over 0–80% for 40 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by absorbance at 226 nm and the presence of ACE-like enzyme was detected by ACELA and AIHA.

For the structure determination, three different techniques were used. The first one consisted of a reduction and *S*- β -pyridylethylation of the enzyme. Ten microlitres of ACE-like enzyme (≈ 100 pmol) were dissolved in 40 μ l 0.5 M Tris-HCl and 2 mM EDTA (pH 7.5), containing 6 M guanidine hydrochloride, to which 2 μ l 2 M dithiothreitol were added in the dark. The sample was flushed with nitrogen and incubated at 45°C for 1 h. Freshly distilled 4-vinylpyridine (2 μ l) was added and incubated for 10 min at 45°C in the dark. The pyridylethylated peptide was separated by reversed-phase HPLC prior to microsequencing. The amino terminal sequence determination of the ACE-like enzyme was performed using an Applied Biosystem Model 470A gas-phase sequencer equipped with a Model 120A on-line phenylthiohydantoin (PTH-Xaa) analyzer. Finally, the molecular mass of the isolated ACE-like enzyme was estimated in electrophoresis using 10–25% SDS-polyacrylamide gradient gels (SDS-PAGE) in reducing conditions as described by Laemmli [7].

Purification summaries are shown Table 1. After solubilization of the ACE-like enzyme from head membranes with Triton X-114, detergent-poor fraction was subjected to a gel permeation chromatography on a fast protein liquid chromatography system (FPLC) with a Superdex G75 column. A single zone at a retention time of between 5 and 10 min corresponding in electrophoresis to proteins with a molecular weight higher than 67 kDa, was detected in ACE assays and AIHA (Fig. 1a). Proteins contained in the active zone were then separated by anion exchange chromatography on a FPLC Mono Q column using a linear gradient of NaCl (Fig. 1b). In these condi-

	1	5	10	15	20
Vertebrates					
Human End, SP	L	D	P	G	L
Guinea pig serum	L	D	P	G	L
Rabbit lung, kidney	T	-	-	-	-
Rat lung	T	-	-	-	-
Calf kidney	E	-	-	-	-
Mouse lung, kidney	-	-	-	-	-
Pig kidney	-	-	-	-	-
Invertebrates					
<i>T. tessulatum</i> *	G	-	-	-	-

* Our data. SP: seminal plasma. End: endothelial

Fig. 2. Amino-terminal sequence of *T. tessulatum* ACE. Alignment with amino-terminal sequences of human seminal, guinea pig serum, rabbit lung and kidney, rat lung, calf kidney, mouse lung and kidney, pig kidney and *T. tessulatum* ACEs. One-letter amino acid notation is used. Boxes indicate amino acids conserved in all species.

tions, the active enzyme was eluted at 0.28 M NaCl. Then, active fractions were applied to a C3 reversed-phase HPLC column with a discontinuous linear gradient of acetonitrile in acidified water. A heterogeneous peak presenting a positive activity in ACE assays was resolved at a retention time of 13 min. Finally, this peak was separated on the same column with a shallower gradient. A single active protein at a retention time of 11.5 min was resolved (Fig. 1c). Control of purity of the isolated enzyme was performed on SDS-PAGE which showed a single band at a molecular weight of ca. 120 kDa (Fig. 1c). The molecular weight of this enzyme is closed to vertebrate testicular ACE ($M_r = 90-110$ kDa) [3] or to insect ACE-like enzyme ($M_r = 87$ kDa) [8], but is smaller than one found in vertebrate somatic tissues ($M_r = 150-180$ kDa) [3,17]. The results of the phase separation experiments using Triton X-114 and the temperature dependent solubilization of the leech ACE-like enzyme as the insect ACE suggest that these enzymes are easily solubilized from membranes and that it is difficult to keep the protein in its membrane-bound form. As suggested by Lamango and Isaac [8] in the case of the insect ACE, it has been shown that an EDTA-sensitive protease is associated with plasma-membrane preparations from mammalian lung and kidney, and that this enzyme releases a hydrophilic form of ACE from cell surfaces by cleavage of the ACE protein close to its membrane anchor [6]. Similar protease may exist in insect and leech membranes and could be responsible for the solubilization of the invertebrate ACE-like enzymes.

After the final step of purification, the leech *S*- β -pyridylethylated ACE-like enzyme was submitted to 25 cycles of Edman degradation. The sequence established on 96.4 pmol of ACE-like enzyme with a sequencing yield of 85%, was Gly-Leu-Asp-Pro-Gln-Leu-Ser-Pro-Gly-Cys-Phe-Ser-Ala-Asp-Glu-Ala-Gly-Ala-Gln-Leu-Phe-Ala-Glu.

The ACE-like enzyme sequence presents ca. 83% of sequence identity with vertebrate ACEs and more precisely 87% with guinea pig ACE (Table 2). Sequence

alignment of leech ACE with vertebrate ACEs reveals differences in amino acid residues at positions 4, 6, 9, 11, 22 and an N-terminal extension as in rabbit and calf kidney ACEs. In contrast, 67% of amino acids residues, constituting the N-terminal part of ACE (boxed in Table 2) are conserved in all ACEs isolated throughout the animal kingdom, reflecting a high conservation of this sequence in course of evolution. For differences between leech and vertebrate ACEs, genetic transitions could be advanced. Such an hypothesis has already been suggested by Ryan et al. [13] in the case of the guinea pig ACE. In fact, except the residue at position 9, guinea pig ACE differed from human ACE by only one residue at position 22. Guinea pig ACE contains a Glu instead of a Gly at position 4. Two of the four codons of Gly, GGA and GGG, are similar to the two codons of Glu, GAA and GAG, thus a G \rightarrow A transition can be considered. The same remark can be advanced for residues 6, 9 and 23 in the case of the leech ACE. Comparison between vertebrate ACEs reveals that with the possible exception of one unidentified amino acid residue (residue 22), the N-terminal sequence of rat ACE is identical to the corresponding sequence of human ACE. Over the first 24 residues, rat ACE sequence was found to differ from mouse ACE in only one position. Mouse ACE contains Pro¹² as opposed to Ala¹² in rat, guinea pig and human forms of ACE and a Thr¹² in pig ACE. Among all vertebrate ACEs, the one isolated in pig is the most different. It possesses a Ser⁴, an Ala⁵, a Cys⁹ as in leech ACE and a Thr¹².

Leech ACE possesses a specific activity on the hippuryl-His-Leu (HHL) substrate slightly higher than the ones registered with guinea pig serum, rat lung, rabbit and human seminal plasma ACEs (5600 nmol hippurate min⁻¹ mg protein⁻¹ versus 3928.78, 3534.93, 3524.96 and 3457.80 nmol hippurate min⁻¹ mg protein⁻¹, respectively) [13], but was largely inferior than the one obtained with mouse kidney ACE (292 380 nmol hippurate min⁻¹ mg protein⁻¹) [1]. However, it has to be noted that a treatment with acetonitrile and TFA, is not recommended in order to keep the total activity of an enzyme. The specific activity of the leech ACE could be much higher without such a treatment, specifically used for its purification. However, the specific mammalian ACE inhibitors (lisinopril and captopril) [11] blocked the hydrolysis of HHL by the leech ACE with a IC₅₀ of, respectively, 50 nM and 200 nM, values corresponding to the ones registered with isolated ACEs. These results confirm that the ACE-like enzyme is close to vertebrate ACE at the level of both the sequence and the activity.

To conclude, the isolation of the AII-amide in *E. octoculata* and the fragment of the AII-like precursor in *T. tessulatum* possessing the AII and the AI as well as the processing sites (Phe⁸-His⁹ and Leu¹⁰-Leu¹¹ bonds) of the metabolic enzymes of AII (ACE-like and renin-like), led us to think of the existence of a complete renin-

angiotensin like system in leeches. This finding not only give us a complete RAS 'like', but also an hormonal-metabolic enzymes system present for 400 million years up to human. Moreover, our results reveal the high conservation in course of evolution of the N-terminal sequence of this enzyme. This work constitutes the first report in invertebrates of N-terminal sequence determination of an ACE-like enzyme.

The authors are grateful to Annie Desmons for her technical assistance.

- [1] Bernstein, K.E., Martin, B.M., Bernstein, E.A., Linton, J. and Stricker, G., The isolation of angiotensin converting enzyme cDNA. *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 11021–11024.
- [2] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyeing. *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248–254.
- [3] Ehlers, M.R.W., Fox, E.A., Strydom, D.J. and Riordan, J.F., Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isoenzyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc. Natl. Sci. USA*, 86 (1989) 7741–7745.
- [4] Erdős, E.G. and Skidgel, R.A., The angiotensin-I converting enzyme. *Lab. Invest.*, 56 (1987) 345–358.
- [5] Henderson, P.J.F., A linear equation that describes the steady state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem. J.*, 127 (1972) 321–333.
- [6] Howard, T.E., Shai, S.-Y., Langford, K.G., Martin, B.M. and Bernstein, K.E., Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol. Cell. Biol.*, 10 (1990) 4294–4302.
- [7] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (1970) 680–685.
- [8] Lamango, N.S. and Isaac, R.E., Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly *Musca domestica*, that resembles mammalian angiotensin-converting enzyme. *Biochem. J.*, 299 (1994) 651–657.
- [9] Laurent, V., Bulet, P. and Salzet, M., A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin I-like molecule with forms of vertebrates angiotensinogens: an hormonal system conserved in course of evolution. *Neurosci. Lett.*, 190 (1995) 175–178.
- [10] Malecha, J., Verger-Bocquet, M.A. and Tramu, G., Mise en évidence et évolution, au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motiline porcine dans le ganglion supraœsophagien de la sangsue *Theromyzon tessulatum*. *Can. J. Zool.*, 67 (1989) 636–640.
- [11] Ondetti, M.A. and Cushman, D.W., Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.*, 51 (1982) 283–308.
- [12] Pre, J. and Bladier, D., A rapid and sensitive spectrophotometric method for routine determination of serum angiotensin I converting enzyme. *IRCS Med. Sci.*, 11 (1983) 220–221.
- [13] Ryan, J.W., Valido, F.A., Chung, A.Y.K., Ripka, J.E., Peterson, C.M. and Urry, R.L., A comparison of guinea pig serum angiotensin converting enzyme with forms of angiotensin converting enzyme from human, rat and rabbit tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196 (1993) 509–514.
- [14] Salzet, M., Bulet, P., Watzet, C., Verger-Bocquet, M. and Malecha, J., Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata* angiotensin II amide. *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 1575–1582.
- [15] Salzet, M., Bulet, P., Verger-Bocquet, M. and Malecha, J., Isolation and structural characterization of enkephalin-related peptides in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *FEBS Lett.*, 357 (1995) 187–191.
- [16] Salzet, M., Watzet, C., Baert, J.-L. and Malecha, J., Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *Brain Res.*, 631 (1993) 247–255.
- [17] Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G. and Corvol, P., Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (1988) 9386–9390.

Biochemical Properties of the Angiotensin-Converting-Like Enzyme From the Leech *Theromyzon tessulatum*

VIRGINIE LAURENT AND MICHEL SALZET¹

Centre de biologie cellulaire, Laboratoire de Phylogénie moléculaire des Annélides, EA DRED 1027, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudiniées, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

Received 23 October 1995

LAURENT, V. AND M. SALZET. *Biochemical properties of the angiotensin-converting-like enzyme from the leech Theromyzon tessulatum*. PEPTIDES 17(5) 737–745, 1996. — This article reports the evidence and the biochemical properties of an angiotensin-converting (ACE)-like enzyme from head parts of the leech *Theromyzon tessulatum*. After solubilization from membranes with Triton X-114, the ACE-like enzyme was purified from the detergent-poor fraction. Four steps of purification including gel permeation and anion exchange chromatographies followed by a reversed-phase HPLC were needed. This poor glycosylated peptidyl dipeptidase (of ca. 120 kDa) hydrolyzes, at pH 8.4 and at 37°C, the Phe⁸-His⁹ bond of angiotensin I with a high catalytic activity (i.e., K_m : 830 μ M and K_{cat}/K_m : 153 s⁻¹ mM⁻¹). The hydrolysis of angiotensin I is inhibitable at 80% by captopril (IC₅₀ = 175 nM) and lisinopril (IC₅₀ = 35 nM). This activity is strictly dependent on the presence of NaCl and is increased by Zn²⁺. This zinc metallopeptidase also attacks peptides that have in their sequence either Gly-His, Gly-Phe, or Phe-His bond [e.g., enkephalins (K_{cat}/K_m : 12 s⁻¹ mM⁻¹) or bradykinin (K_{cat}/K_m : 2200 s⁻¹ mM⁻¹)]. Taken together, these arguments are consistent with an ACE-like activity implicated in metabolism of angiotensins and bradykinin in leeches.

Angiotensin-converting enzyme Angiotensins Leech Peptidyl dipeptidase Renin-angiotensin system

ENDOPEPTIDASE-24.11 (EC 3.4.24.11) and peptidyl dipeptidase [angiotensin-converting enzyme (ACE), EC 3.4.15.1] are two well-characterized mammalian plasma membrane metalloenzymes involved in the metabolism of biologically active neuropeptides (6). Endopeptidase-24.11 is implicated in degradation of substance P and enkephalins (17). In contrast, ACE (dipeptidyl carboxypeptidase I, kininase II) is a key enzyme of the renin-angiotensin system (RAS), which leads to the formation of a potent vasopressor angiotensin II (AII), by cleavage of the His-Leu bond from the C-terminus of the inactive decapeptide angiotensin I (AI) (18). It also inactivates the vasopressor peptide bradykinin and possesses a wide spectrum of action (4). Both enzymes are metallopeptidases and can be distinguished by their sensitivity to different inhibitors. They are both phosphoramidon-sensitive (28,31). But, ACE can not be completely inhibited by phosphoramidon (only 40%), in contrast with captopril (9).

Mammalian ACE exists in two distinct forms, a somatic ACE (M_r 170–190 kDa) (29) and a testicular enzyme (M_r ca. 100 kDa) (1,4). The cloning and characterization of human somatic ACE cDNA (29) has revealed that somatic enzyme comprises two highly homologous domains with two putative active sites. In contrast, cDNAs for human (1) or mouse (4) testicular ACE

predict a single active-site region presenting an identical sequence to the C-domain of the corresponding somatic ACE. The two forms of mammalian ACE are encoded in a single copy of ACE gene, and transcription of the testicular enzyme appeared to be under the control of an intragenic testis-specific promoter (8,12). Both ACE isoforms hydrolyze AI, bradykinin and other natural peptide substrates such as substance P and enkephalins (8,12).

In invertebrates, little is known about the renin-angiotensin system except in leeches. In this zoological group, an angiotensin I (AI), an angiotensin II (AII), and an angiotensin III (AIII) have been isolated in the leech *Theromyzon tessulatum* (13,25), and a peptide related to the angiotensin family, an angiotensin II-amide, differing from vertebrate AII by a carboxy-terminus amidation, has been purified from the leech *Erpobdella octoculata* (22). Injection in the leech *T. tessulatum* of either AII or AII-amide resulted in a decrease of mass, expressing a diuretic effect of these molecules, with AII-amide being 100-fold more effective than AII (22). Furthermore, the AII-like precursor has been identified in the central nervous system of leeches. It is a multiple hormone precursor of ca. 19 kDa bearing at least four different epitopes: three immunoreactive to three different polyclonal antisera (an anti-AI, an anti-AII and an anti- γ -MSH) and

¹ Requests for reprints should be addressed to Michel Salzet.

one to a monoclonal antibody (Tt159) specific of epitopes contained in *T. tessulatum* supraesophageal ganglia (25). The *N*-terminal sequence of a fragment of the AII-like precursor (DRVYIHPFLLXWG...) has been determined and possesses 78.5% of sequence identity with the *N*-terminal sequence of human angiotensinogen (13). In addition, the Phe³-His⁷ and Leu¹⁰-Leu¹¹ bonds of the proteolytic sites of ACE and renin, respectively, are conserved in leech AII-like precursor (13). Furthermore, we recently detected in *T. tessulatum* crude extract a renin-like (of ca. 32 kDa) (14) and an NEP-like enzyme (of ca. 45 kDa) (15), sustaining the existence of a renin-angiotensin system (RAS) and a non-RAS in leeches. Moreover, involvement of the NEP-like or/and ACE-like enzymes in enkephalins inactivation or in metabolism of angiotensins is reinforced by isolation of the dipeptides Phe-Leu and Phe-Met during enkephalin purification from *T. tessulatum* brains (23).

The aim of this work was to purify and to characterize with respect to substrate specificity and kinetic properties (pH, temperature dependence), the ACE-like enzyme in head membranes of the leech *T. tessulatum*.

METHOD

Chemical

Phosphoramidon, captopril, [D-Ala²,Leu⁵]enkephalin, lisinopril, Phe-Leu, Tyr-D-Ala-Gly, angiotensin I, angiotensin II, 3-3'-diaminobenzidine-tetra-hydrochloride, and hydrogen peroxide were obtained from Sigma; Triton X-114 was purchased from Boehringer-Mannheim. The peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG was from Pasteur Diagnostics. All organic solvents were HPLC grade and purchased from Merck. Deionized water was obtained from a Milli-Q system (Millipore).

Animals

Leeches of the species *T. tessulatum* at stage 2 reared under laboratory conditions according to Malecha et al. (16) were used in this study.

Antiserum

The polyclonal antiserum directed against AII (a-AII) was generated in a rabbit using synthetic human AII coupled to human serum albumin via glutaraldehyde. In radioimmunoassay experiments, cross-reaction of the antiserum was 100% for AII (DRVYIHPF) and 0.46% for AI (DRVYIHPFL).

Immunoassays

Dot immunobinding assay (DIA) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on the protocols of Salz et al. (20,27) were used to follow the ACE-like activity during the purification procedures.

Enzyme Purification

Membrane preparation. After anesthesia of the animals in 0.01% chlorotone, head parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C. Five hundred head parts were placed in 15 ml (1 g/5 ml) [TBS] 20 mM Tris/HCl, pH 8.4, containing 200 mM NaCl and homogenized at 4°C with a polytron (5 × 15 s bursts on setting 9). After centrifugation (30 min at 6000 × g on a Sigma 2K15 rotor at 4°C), the pellet was reextracted six-fold with the same amount of saline solution. The combined supernatants were centrifuged at 20,000 × g for 1 h on a Beckman centrifuge (JA-20 rotor) at 4°C to yield a membrane preparation. These membranes were

washed by resuspension in TBS, followed by sedimentation at 20,000 × g. The washing procedure was repeated until a clear supernatant was obtained. Finally, the washed membranes were resuspended in TBS and stored at -20°C. Protein concentration was determined according to Bradford (3) using γ globulin as standard.

Phase separation of membrane proteins with Triton X-114. Membranes (30 mg of protein) were mixed in TBS containing 0.5% (w/v) Triton X-114 and kept on ice for 30 min with occasional shaking. Detergent-insoluble material was removed by centrifugation at 20,000 × g for 1 h at 4°C. After incubation at 20°C during 15 min to induce the phase separation of Triton X-114, samples were immediately centrifuged at 6000 × g on a Sigma 2K15 rotor. The supernatant was collected and the detergent layer resuspended in an equal volume of TBS. Both detergent-rich and detergent-poor fractions were assayed for ACE activity and the major part (80%) of the ACE activity was found in the detergent-poor fraction. This fraction was then used for the different steps of purification.

Purification procedure.

Step I: Gel permeation chromatography. The detergent-poor fraction was applied onto a column of Superdex G75 (16/60, Pharmacia), pre-equilibrated with TBS at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by absorbance at 280 nm. All column fractions were assayed for ACE-like activity.

Step II: Chromatography on Mono Q. A pool of active fractions was loaded onto a Mono Q column (HR 5/5, Pharmacia), equilibrated in TBS. The column was washed with the same buffer and eluted with a discontinuous linear gradient of NaCl at 0.28 M during 2 min, then over 0.28–0.48 M for 15 min, and finally at 0.5 M during 2 min at a flow rate of 1 ml/min.

Step III: Reversed-phase HPLC: Active fractions from the Mono Q were separated on a C3 Ultrapore column (75 × 4.6 mm, Beckman), equilibrated in water. Elution was performed with a discontinuous linear gradient of acetonitrile/water over 0–50% for 15 min and over 50–80% for 5 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by absorbance at 226 nm. The acetonitrile was quickly removed from the eluted fractions by freeze drying using a vacuum centrifuge (Savant). Fractions were adjusted to pH 8.4 by adding TBS and the presence of ACE-like enzyme was detected by ACE assays.

Step IV: Final purification. Active fractions were further applied to a C8 Lichrosphere Rp100 column (125 × 4.6 mm), equilibrated in water. Elution was performed at a flow rate of 1 ml/min. The acetonitrile was quickly removed from the eluted fractions by freeze drying using a vacuum centrifuge (Savant). Fractions were adjusted to pH 8.4 by adding TBS and the presence of ACE-like enzyme was detected by ACE assays.

All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a photodiode array detector Beckman 168.

Electrophoresis

Electrophoresis analysis of the proteins was performed in 10–25% SDS/polyacrylamide gradient gels (SDS-PAGE) as described by Laemmli (10).

Determination of the ACE-Like Activity

Chromogenic assay. ACE-like activity (ACE_{LA}) was researched according to Pre and Baldier (19). For the assay, 500 μl of sample and 200 μl of substrate (6.25 mM Bz-Gly-His-Leu) in 125 mM borate buffer with 300 mM NaCl, pH 8.4, were mixed in glass test tubes and incubated for 90 min at 37°C. The reaction was stopped by

adding 250 μ l 20 mM EDTA. Borate buffer (2 ml) and 1.5 ml 160 mM cyanuric chloride (made in Dioxane) were added to each tube. The test tubes were then centrifuged (10 min at $6000 \times g$) and the absorbancies of the supernatants were read at 405 nm against distilled water using a Dynatec MR-5000 spectrophotometer. Blanks were prepared by adding EDTA before the substrate. Negative controls consisted in samples incubated with 5 μ M captopril, a potent inhibitor of ACE (9). Positive controls were carried out using (0.1 U) human ACE (Sigma). For calibration, each sample was overloaded, after incubation and EDTA addition, with 20 μ l 2.5 mM hyppuric acid standard solution.

Immunoenzymatic assay. The assay (AIHA: angiotensin I hydrolysis assay) was performed on fractions obtained at each step of purification by DIA and ELISA of AII generated *in vitro* in the following incubation buffer: 200 μ l sample, 100 μ l TBS, pH 8.4, containing 4 mM 2,3-dimercaptopropanol, 3.2 mM 8-hydroxyquinoline sulfate, and 10 μ M AI. After a 90-min incubation at 37°C, the reaction was stopped by placing incubation vessels on ice. In blanks, AI was omitted.

HPLC ACE-like enzyme activity determination. Active fractions containing the purified ACE-like enzyme were incubated with 10 μ M synthetic peptides (AI, [D-Ala², Leu⁵]enkephalin, the Bz-Gly-His-Leu substrate) and with or without 10 μ M of inhibitors (lisinopril, captopril) in TBS, in a final volume of 100 μ l. The reaction was terminated by addition of 30% trifluoroacetic acid (v/v). Samples were spun at high speed ($10,000 \times g$; Sigma 2K15) for 15 min. Supernatants were diluted by adding 100 μ l of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid before analysis on a C8 (125 \times 4.6 mm, Waters) reversed-phase HPLC column according to Welling et al. (34). The molar ratio of Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu peptides is calculated from data given by Stephenson and Kenny (30) on the quantification of peptides by HPLC.

RESULTS

Hydrolysis of [D-Ala²,Leu⁵]Enkephalin by Leech Head Membranes

Phosphoramidon (10 μ M), partially inhibited the formation of Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu during incubation of [D-Ala²,Leu⁵]enkephalin with leech membranes [Fig. 1(a)], suggesting a phosphoramidon-sensitive metallopeptidase activity. Captopril (10 μ M), a potent inhibitor of mammalian ACE (18) almost completely abolished (80%) the hydrolysis [Fig. 1(b)]. By contrast, a mixture of 10 μ M phosphoramidon and 10 μ M captopril provoked a complete disappearance of these two fragments in reversed-phase HPLC. Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu peptides were detected in reversed-phase HPLC, in almost equimolar amount (molar ratio 1.00:1.06 for Tyr-D-Ala-Gly/Phe-Leu) after hydrolysis of the [D-Ala²,Leu⁵]enkephalin by leech membranes [Fig. 1(a)]. Both fragments were inhibited to the same extent by the inhibitors mixture. Inhibition curves of phosphoramidon, captopril and mixture of phosphoramidon and captopril were generated by measuring the rate of formation of Tyr-D-Ala-Gly over a range of inhibitor concentrations (Fig. 2). Maximum inhibition performed by different inhibitors are respectively 60% for phosphoramidon (IC_{50} : 3 μ M) and 75% for captopril (IC_{50} : 0.4 μ M) (Fig. 2). This inhibition was complete using a mixture of phosphoramidon (10 μ M) and captopril (10 μ M).

Isolation of the ACE-Like Enzyme

Purification steps are shown in Table 1.

After solubilization of proteins with Triton X-114 from membranes, ACE assays performed at the level of both detergent-poor

and detergent-rich fractions reveal that the most ACE activity is detected in detergent-poor fraction (80% of the activity). This fraction was then subjected to a gel permeation chromatography on a fast protein liquid chromatography system (FPLC) with a Superdex G75 column. A single active zone in both ACELA and AIHA was detected at a retention time between 41 and 49 min (Fig. 3, lane 1). Proteins contained in this zone were then separated by anion exchange chromatography on a FPLC Mono Q column using a discontinuous linear gradient of NaCl. In these conditions, the active enzyme detected in both ACELA and AIHA eluted at 0.31 M NaCl (Fig. 3, lane 2). Then the active fractions were applied to a C3 reversed-phase HPLC column with a discontinuous linear gradient of acetonitrile/water. A heterogeneous peak presenting a positive activity in both AIHA and ACELA was resolved at a retention time of 7 min. Finally, this peak was separated on a C8 reversed-phase column and a single active protein at a retention time of 13.9 min was obtained (Fig. 3). Control of purity of the isolated enzyme was performed on SDS-PAGE showing a single band at a molecular mass of ca. 120 kDa (Fig. 3, lane 3).

The ACE-Like Activity

In the following experiments conversion of AI in AII is quantified by AII ELISA.

Synthetic AI hydrolysis by the ACE-like enzyme. As demonstrated by data obtained from many reversed-phase HPLC, synthetic AI (DRVYIHPFHL) is hydrolyzed by the purified ACE-like enzyme at the Phe⁸-His⁹ bond, yielding AII and the dipeptide His⁹-Leu¹⁰ in almost equimolar concentrations. The time course of the hydrolysis of AI by ACE-like enzyme, monitored in reversed-phase HPLC, indicated that half of AI is converted in ca. 10 min.

Inhibition of the AI hydrolysis. To confirm that the cleavage of AI in AII is really due to the isolated enzyme, inhibition curves with specific mammalian ACE inhibitors (captopril, lisinopril) (18) were generated by measuring the rate of formation of AII at different inhibitor concentrations (data not shown). Maximum inhibition of around 80% was achieved at an inhibitor concentration of 1 μ M captopril (IC_{50} : 175 ± 45 nM) or 1 μ M lisinopril (35 ± 17 nM), indicating the high specificity of the ACE-like enzyme towards the Phe⁸-His⁹ bond of AI and the high efficiency of these inhibitors towards this enzyme.

Effect of pH on AI hydrolysis. To investigate if the peptidyl dipeptidase activity registered is really due to an ACE-like enzyme close to vertebrate ACE and not to the NEP-like enzyme, fractions containing the purified enzyme were incubated with 10 μ M of AI (1 mg/ml) in buffers at a pH ranging from 2 to 9 at 37°C for 40 min and tested in both ACELA and AIHA. The optimal pH for this enzyme is between 8 and 9 (Fig. 4).

Effect of the temperature on AI Hydrolysis. To investigate the effect of temperature on the leech peptidyl dipeptidase, fractions containing the ACE-like enzyme were incubated in TBS at either 4°C or 37°C during 90 min. At various time intervals, samples were removed and tested in AIHA (Fig. 5). Fifty percent of the ACE-like activity was obtained after a 15-min incubation at 37°C; only 10% at 4°C was obtained during the same incubation period. Nevertheless, the ACE-like activity at 4°C reaches 50% at the end of the test, whereas we observed 100% of the ACE-like activity at 37°C.

Effect of chloride on AI hydrolysis. To investigate the effect of chloride on the peptidyl dipeptidase activity, concentrations of NaCl (0 to 0.5 M) were studied. Results obtained showed that ACE activity is strictly dependent on the presence of NaCl and is maximal for a 0.3 M concentration.

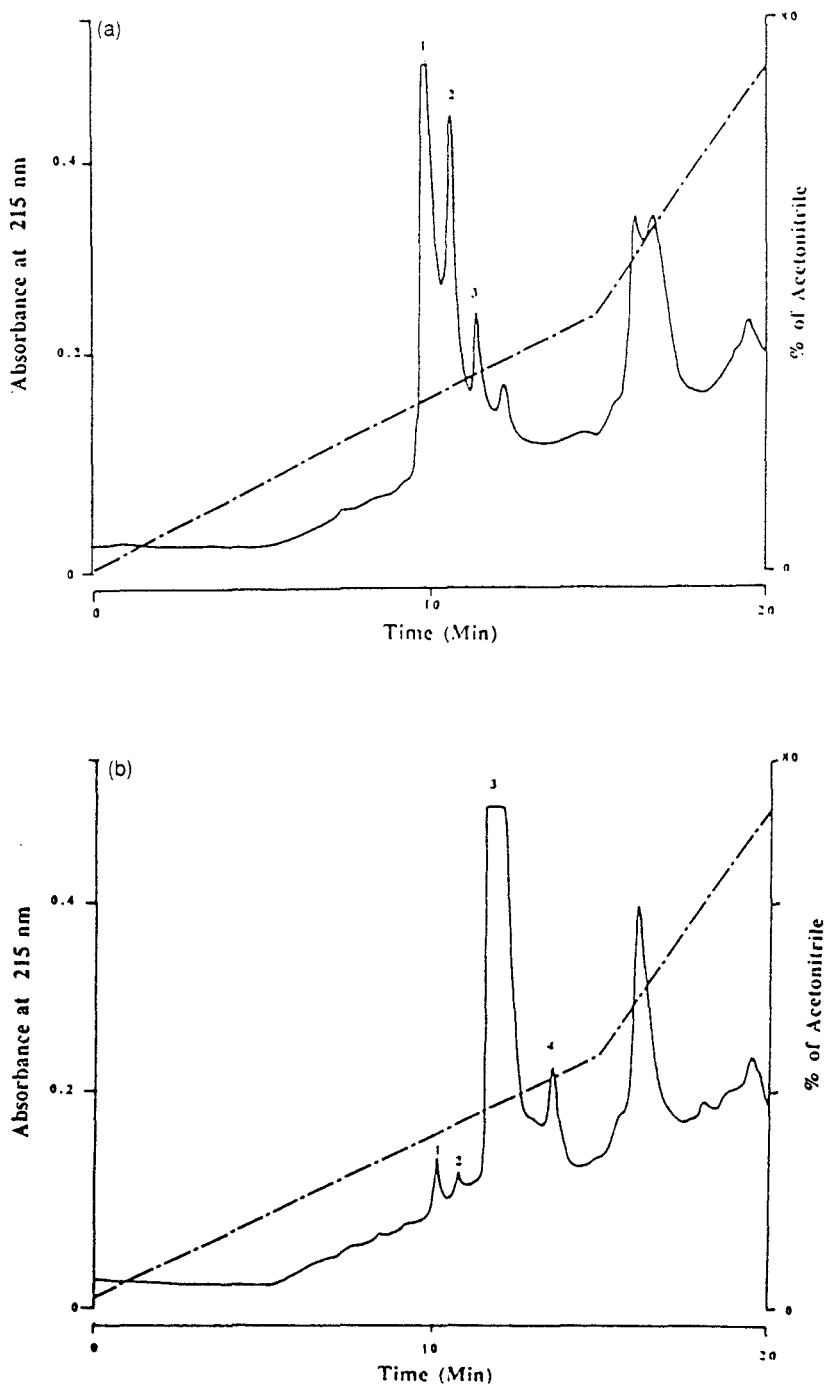


FIG. 1. Metabolism of synthetic [D-Ala²,Leu⁵]jenkephalin by head membranes of *T. tessulatum*. [D-Ala²,Leu⁵]jenkephalin (50 μ M) was incubated at 37°C at pH 8.4 with membrane enzyme. The metabolites Tyr-D-Ala-Gly (1) and Phe-Leu (2) were resolved from [D-Ala²,Leu⁵]jenkephalin (3) by HPLC with UV detection at 215 nm. Incubations were carried out in the absence (a) or presence of 10 μ M captopril (b). The UV-absorbing peaks at 16.2 min corresponded to a fragment of the ACE-like enzyme, at 13.6 min to captopril (4), and at 12.2 min and 19.2 min to minor metabolites.

Effect of EDTA and bivalent metal ions on the ACE-like activity. The ACE-like activity is inhibited by 100 μ M EDTA (95% inhibition) and 1 mM 1,10-phenanthroline (50% inhibition).

These data signify the requirement of a metal atom for catalysis. The ability of bivalent metal ions to recover the enzyme activity was tested by incubating EDTA-treated membranes, which had

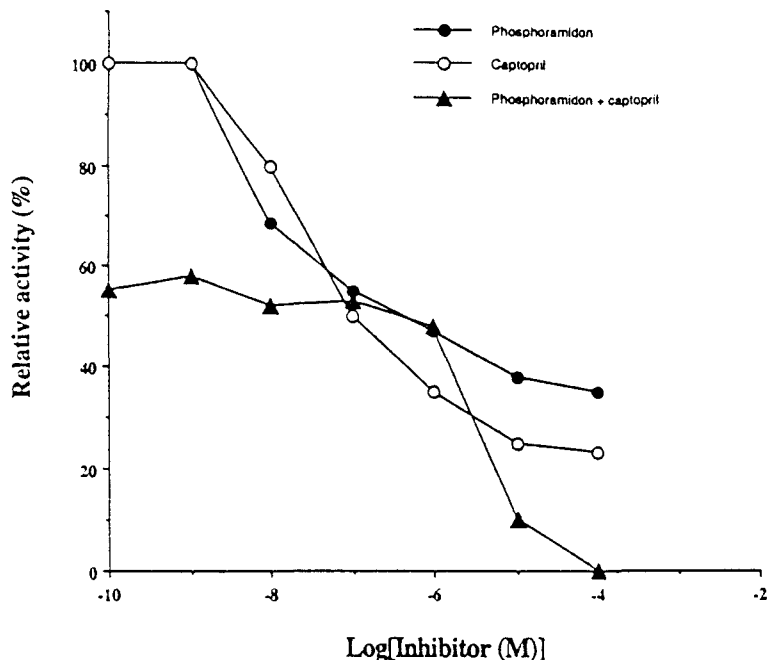


FIG. 2. Inhibition of the hydrolysis of [D-Ala²,Leu⁵]enkephalin by phosphoramidon and captopril. Inhibition of the cleavage of the Gly³-Phe⁴ bond of [D-Ala²,Leu⁵]enkephalin (10 μM) by different concentrations of phosphoramidon and captopril was determined. Peptidase activity was measured by quantifying the peptide product Tyr-D-Ala-Gly by HPLC. The effect of mixture of phosphoramidon and captopril on peptidase activity was also investigated by keeping the concentration of the phosphoramidon constant at 10 μM while the concentration of the captopril was varied (10⁻¹⁰, 10⁻⁴ M). Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

been washed to remove excess EDTA, with Bz-GHL in the presence of ZnCl₂. The addition of 100 μM ZnCl₂ resulted in a massive activation (300% activation relative to the activity of untreated membranes) of the EDTA-treated enzyme. The ZnCl₂ stimulating the activity of EDTA-treated membranes is completely inhibited by 10 μM captopril.

Kinetic parameters. The ACE-like enzyme hydrolyzes AII at the Phe⁸-His⁹ bond, yielding AII and the dipeptide His⁹-Leu¹⁰ as products, with a specific activity of 1.5 ± 0.45 nmol of AII per mg of protein, a K_m of 830 μM, and a catalytic efficiency of K_{cat}/K_m: 153 s⁻¹ mM⁻¹. In contrast, on Bz-GHL substrate, the K_m value is 2350 μM and its K_{cat} is 350 s⁻¹. Significant hydrolysis by the ACE-like enzyme is also observed in the case of the [D-Ala²,Leu⁵]enkephalin (K_{cat}/K_m: 12 s⁻¹ mM⁻¹) and bradykinin (K_{cat}/K_m: 2200 s⁻¹ mM⁻¹).

DISCUSSION

The hydrolysis of [D-Ala², Leu⁵] enkephalin by leech head membranes suggests a phosphoramidon-sensitive metallopeptidase activity. Moreover, assays including specific inhibitors reflect the presence in leech membranes of both a NEP-like and an ACE-like enzyme. We previously isolated the NEP-like enzyme (15), and in this study we focused our interest on the purification of ACE-like enzyme. After solubilization from membranes with Triton X-114, the ACE-like enzyme was purified from the detergent-poor fraction. Four steps of purification, including gel permeation and anion exchange chromatographies followed by a reversed-phase HPLC, were needed. The purified ACE-like enzyme shows a molecular mass close to vertebrate testicular ACE (M_r = 90–110 kDa) (18) or to insect ACE-like enzyme (M_r = 87 kDa) (11), but is smaller than the one found in vertebrate

TABLE I
PURIFICATION OF THE ACE-LIKE ENZYME FROM HEAD PARTS OF THE LEECH *Theromyzon tessulatum*

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (Units)	Sp. Activity (Units/mg)	Recovery (%)	Fold
1. Protein solubilization	30	16.8	0.56	80	1
2. Gel permeation (FPLC)	5.6	12.54	2.24	65	4
3. Anion exchange (FPLC)	0.86	3.75	4.37	58	7.8
4. Reversed-phase HPLC	0.45	2.94	6.4	39	11.42

Experimental details are indicated in the Method section. FPLC: fast protein liquid chromatography; Sp. activity: specific activity in nmol AII · min⁻¹ · (Unit) mg protein⁻¹.

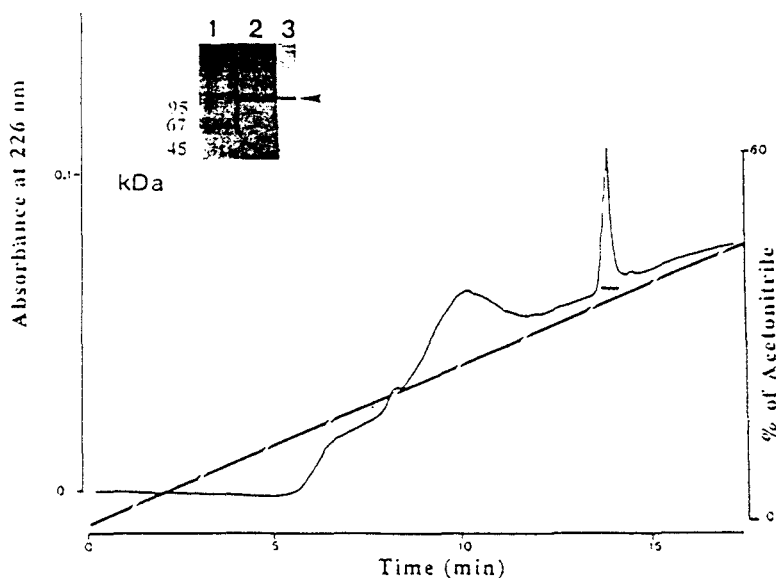


FIG. 3. Final step of purification of the ACE-like enzyme. The solid bars indicate the fractions containing the ACE-like enzyme. Inset photographs represent the fractions containing the ACE-like enzyme separated by SDS-PAGE: (1) after Superdex G75 chromatography, (2) after anion exchange on Mono Q column, and (3) at the final step of purification. Small arrow indicates position of the ACE-like enzyme; arrowheads on the left of the silver staining gel indicate molecular mass standards.

somatic tissues ($M_r = 150\text{--}180$ kDa) (18,27). Periodic acid schiff treatment after electrophoresis is negative and allow us to conclude that the leech ACE is not highly glycosylated, in contrast with mammalian ACE (4).

Results of the phase separation experiments using Triton X-114 and the temperature-dependent solubilization of the leech ACE-like enzyme suggest that this enzyme is easily solubilized from membranes and that it is difficult to keep the protein in its membrane-bound form. As suggested by Lamango and Isaac (11) in the case of the insect ACE, it has been shown that an EDTA-sensitive protease is associated to plasma-membrane preparations from mammalian lung and kidney, and that this enzyme releases a hydrophilic form of ACE from cell surfaces by cleavage of the ACE protein close to its membrane anchor (9). Similar protease may exist in insect and leech membranes and could be responsible for the solubilization of the invertebrate ACE-like enzymes.

The kinetic parameters measurement of the leech ACE-like enzyme reveals a high specific activity of this enzyme towards AI. The value 1.5 ± 0.45 nmol of AII per mg of protein is in line with the ones obtained in kidney or plasma of the Antarctic fishes *Pagothenia bernachii* (3.43 ± 1.2 nmol AII/min/mg and 2.16 ± 1.74 nmol AII/min/mg, respectively) and *Chionodraco hamatus* (0.88 ± 0.12 nmol AII/min/mg and 0.34 ± 0.22 nmol AII/min/mg, respectively) (32,33). However, this value is inferior to the ones found in the insect *M. domestica* (7.61 nmol AII/min/mg) (11) or in mammals (ca. 10 nmol AII/min/mg) (5). In contrast, the K_m value ($830 \mu\text{M}$) of the ACE-like enzyme is much higher than those registered with mammalian ACEs ($10\text{--}50 \mu\text{M}$) (4). Two hypotheses could be advanced for this result: either AI is not the principal substrate of leech ACE, or the enzyme activity has been modified in the course of the biochemical purification steps. However, the ratio K_{cat}/K_m ($153 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) of the leech ACE, corresponding to the catalytic efficiency of the enzyme, is close to the one of mammalian ACE ($147\text{--}189 \text{ s}^{-1}$

mM^{-1}) (4), which demonstrates a high efficiency of the leech ACE towards AI. This finding corroborates recent immunocytochemical findings with anti-AI and anti-AII at the level of the brain. In fact, a very low amount of cells containing AI was detected in *T. tessulatum* brain, in contrast with AII, which was detected in numerous neurons and glial cells (24), suggesting a rapid cleavage of AI in AII by *T. tessulatum* ACE, especially after a blood meal when the amount of AII greatly increases (24). In the case of the pharyngobdellid leech *Erpodellela octoculata*, an angiotensin II-amide has been isolated instead a AII in *T. tessulatum* (22). We suspect a glycine in position 9 rather than a histidine in *E. octoculata* AI, as in the eel (13). The C-terminal amidation is usually made by an α -amidating enzyme system operating on glycine residue. However, we could not exclude the possibility of an α -amidation by the *E. octoculata* ACE.

The use of specific ACE inhibitors (captopril and lisinopril) reinforces the precedent findings and confirms both the high efficiency of these inhibitors towards leech ACE and the high specificity of this enzyme towards the Phe⁸-His⁹ bond of AI. Moreover, our results are in line with the ones obtained by Lamango and Isaac (11) in the insect *M. domestica*, where IC_{50} values for captopril and lisinopril are, respectively, 400 and 130 nM vs. 175 and 35 nM for leech ACE, but are 100-fold less than the one obtained on pig kidney ACE (7). In addition, the difference between the potency of the two inhibitors is probably due to the difference of enzyme subsites that interact with the side groups of inhibitors.

The different biochemical and physiological parameters influencing the ACE-like enzyme activity were investigated. The optimal pH ($8.2\text{--}8.4$) determined for this enzyme confirms that the peptidyl dipeptidase activity is really due to the ACE-like enzyme and not to the NEP-like enzyme present in head leech membranes (15). The results obtained at 37°C and 0°C suggest that this enzyme stays still active at this low temperature, presumably because *T. tessulatum* is a leech able to live in cold water and

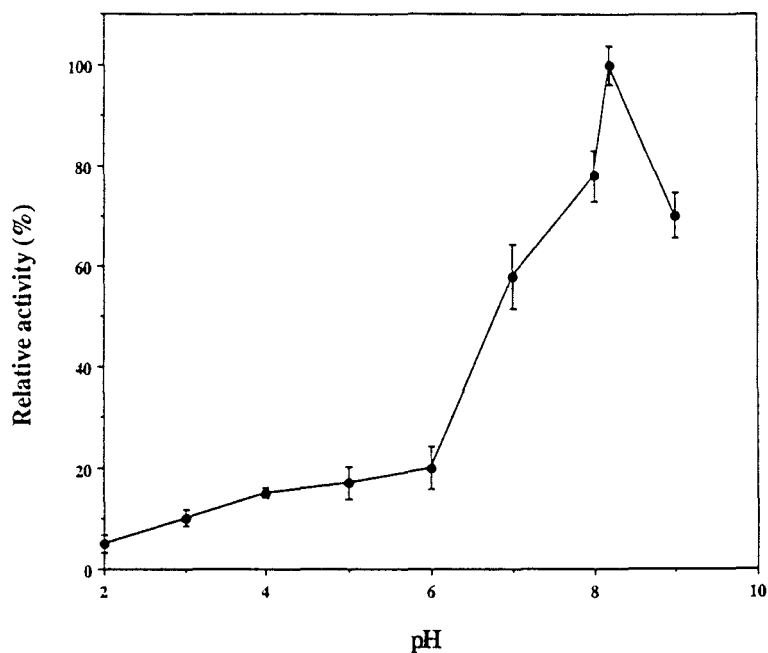


FIG. 4. Effect of pH on hydrolysis of synthetic AI by purified ACE-like enzyme. In the assay, 0.1 μg ACE-like enzyme was incubated with 10 μM AI in buffers ranging from 2 to 9 pH at 37°C for 35 min. The conversion of AI in AII was tested in HPLC and assayed in both ACELA and AIHA. Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

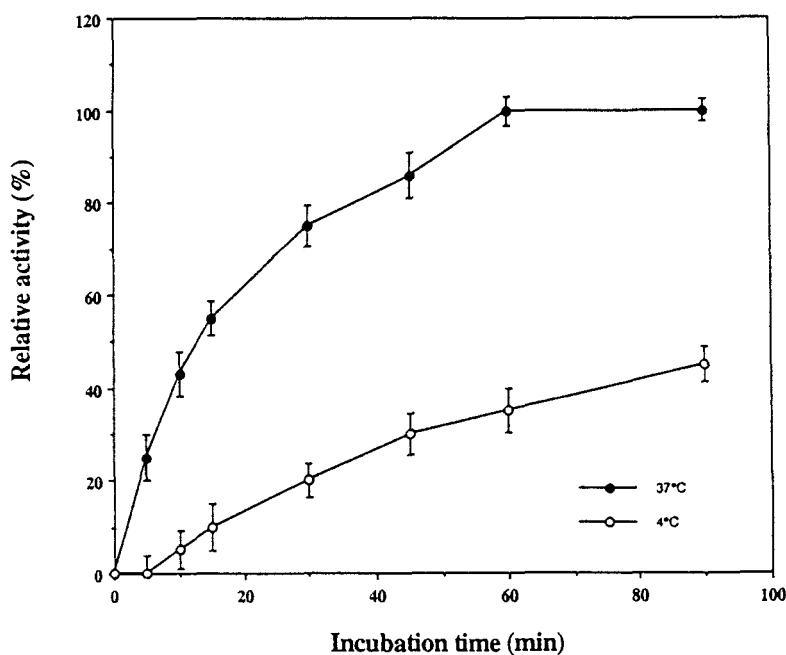


FIG. 5. Effect of the temperature on the ACE-like activity. ACE-like enzyme (0.1 μg) was incubated with 10 μM AI separately at 37°C and 4°C in TBS. Samples were removed at time intervals and tested in both ACELA and AIHA. Results are expressed as a percentage of total activity. There was no loss of ACE-like activity during the course of the experiment. Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

that this enzyme is specialized to work under constantly cold temperature. Similar findings were obtained in the Antarctic *Chionodraco hamatus* and *Pagothenia bernachii* (33). The authors showed that fish ACE-like enzyme is able to convert AI in AII at 0°C (33). Effect of chloride on AI hydrolysis was also researched. The data obtained indicated that ACE activity is strictly dependent to the presence of NaCl like vertebrate ACE (2) and is maximal for a 0.3 M NaCl concentration. Finally, assays of ACE-like activity with EDTA and bivalent metal ions suggest that this enzyme is a "Zincin" metalloproteinase.

Finally, we can underline the key role played by the leech ACE towards different peptides. Significant hydrolysis by the ACE-like enzyme was observed in the case of the [D-Ala²,Leu⁵]enkephalin (K_{cat}/K_m : 12 s⁻¹ mM⁻¹), Bz-GHL substrate (K_{cat}/K_m : 148 s⁻¹ mM⁻¹), and bradykinin (K_{cat}/K_m : 2200 s⁻¹ mM⁻¹). These results are in line with those of vertebrate ACEs where neurotensin, [Met⁵]enkephalin, [Met⁵]enkephalin-Arg⁹-Gly⁷-Leu⁸, β -neoendorphin, dynorphins, cholecystokinin, gastrin analogues, and bradykinin are also degraded (4). In fact, if this ACE-like enzyme converts AI in AII, it also acts as an

endopeptidase by degrading other biologically active peptides such as bradykinin, its principal substrate. In conclusion, leech ACE shows a preference for peptide bonds that involve the hydrophobic amino acids (e.g., Phe, Leu, Trp, Tyr, and, in particular, Phe). Moreover, considering its activity towards nonamidated peptide, we postulate that its activity may not be restricted to hydrolysis of such peptides and may be extended to metabolism of many leech peptides having their C-termini blocked by an amidation [e.g., RF-amide (21), lysine-conopressin (20), or γ -MSH-like (26)]. For such peptides, a C-terminal amidation is invariably required for full biological activity, and thus hydrolysis close to the C-terminus will lead to inactivation.

The whole of these results demonstrate that the leech ACE is close to the single domain vertebrate ACE and thus is conserved during evolution. This finding constitutes the first biochemical characterization of an ACE-like enzyme in leeches, and we now established by our results the existence of a complete renin-angiotensin system in this zoological group.

ACKNOWLEDGEMENT

We were very grateful to Annie Desmons for her technical help.

REFERENCES

- Bernstein, K. E.; Martin, B. M.; Bernstein, E. A.; Linton, J.; Stricker, G. The isolation of angiotensin converting enzyme cDNA. *J. Biol. Chem.* 263:11021-11024; 1988.
- Benetto-Burnat, B.; Taraoui, A.; Barbut, F.; Giboudeau, J.; Baudin, B. Physiological and immunological comparisons between angiotensin I-converting enzymes purified from different mammalian species. *Comp. Biochem. Physiol. [B]* 109:623-635; 1994.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyeing. *Anal. Biochem.* 72:248-254; 1976.
- Corvol, P.; Williams, T. A.; Soubrier, F. Peptidyl Dipeptidase A: Angiotensin I-converting enzyme. In: Barrett, A. J., ed. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press; 1995:283-305.
- El-Dorry, H. A.; Bull, H. G.; Iwata, K.; Thornberry, N. A.; Cordes, E. H.; Soffer, R. L. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 257:14128-14133; 1982.
- Erdős, E. G.; Skidgel, R. A. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J* 3:145-151; 1989.
- Hooper, N. M.; Turner, A. J. Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: A reevaluation of their role in neuropeptide metabolism. *Biochem. J.* 241:625-633; 1987.
- Howard, T. E.; Shai, S.-Y.; Langford, K. G.; Martin, B. M.; Bernstein, K. E. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol. Cell. Biol.* 10:4294-4302; 1990.
- Kenny, A. J.; Ingram, J. Proteins of the kidney microvillar membrane. *Biochem. J.* 245:515-524; 1987.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685; 1970.
- Lamango, N. S.; Isaac, R. E. Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly *Musca domestica*, that resembles mammalian angiotensin-converting enzyme. *Biochem. J.* 299:651-657; 1994.
- Lation, A.-L.; Soubrier, F.; Allegrini, J.; Hubert, C.; Corvol, P.; Alhenc-Gelas, F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett.* 252:99-104; 1989.
- Laurent, V.; Bulet, P.; Salz, M. A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin I-like molecule with forms of vertebrates angiotensinogens: An hormonal system conserved in course of evolution. *Neurosci. Lett.* 190:175-178; 1995.
- Laurent, V.; Salz, M. Isolation of a renin-like enzyme from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Peptides* 16:1351-1358; 1995.
- Laurent, V.; Salz, M. Isolation of a neuropeptide-degrading endopeptidase from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Eur. J. Biochem.* 233:186-191; 1995.
- Malecha, J.; Verger-Bocquet, M.; Lepretre, A.; Tramu, G. Mise en évidence et évolution, au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motiline porcine dans le ganglion supraesophagien de la sangsue *Theromyzon tessulatum*. *Can. J. Zool.* 67:636-640; 1989.
- Matsas, R.; Kenny, A. J.; Turner, A. J. The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues by endopeptidase-24-11. *Biochem. J.* 223:433-440; 1984.
- Ondetti, M. A.; Cushman, D. W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 51:283-308; 1982.
- Pre, J.; Bladier, D. A rapid and sensitive spectrophotometric method for routine determination of serum angiotensin I converting enzyme. *IRCS Med. Sci.* 11:220-221; 1983.
- Salzet, M.; Bulet, P.; Van Dorsselaer, A.; Malecha, J. Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. *Eur. J. Biochem.* 217:897-903; 1993.
- Salzet, M.; Bulet, P.; Watez, C.; Malecha, J. FMRamide-related peptides in the sex segmental ganglia of the Pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. Identification and involvement in the control of hydric balance. *Eur. J. Biochem.* 221:269-275; 1994.
- Salzet, M.; Bulet, P.; Watez, C.; Verger-Bocquet, M.; Malecha, J. Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*. *Angiotensin II amide*. *J. Biol. Chem.* 270:1575-1582; 1995.
- Salzet, M.; Bulet, P.; Verger-Bocquet, M.; Malecha, J. Isolation and structural characterization of enkephalin-related peptides in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *FEBS Lett.* 357:187-191; 1995.
- Salzet, M.; Verger-Bocquet, M.; Watez, C.; Malecha, J. Evidence for angiotensin-like molecules in the central nervous system of the leech *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). A possible diuretic effect. *Comp. Biochem. Physiol. [A]* 101:83-90; 1992.
- Salzet, M.; Watez, C.; Baert, J.-L.; Malecha, J. Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *Brain Res.* 631:247-255; 1993.
- Salzet, M.; Watez, C.; Bulet, P.; Malecha, J. Isolation and structural characterization of a novel peptide related to γ -melanocyte stimulating hormone from the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*. *FEBS Lett.* 348:102-106; 1994.

27. Salzet, M.; Watez, C.; Slomianny, M. C.; Léü, B.; Siegert, K. J. ELISA for oxytocin. Highly sensitive tests for the titration of an oxytocin-like substance in the leech *Erpobdella octoculata*. *Comp. Biochem. Physiol. [C]* 102C:483-487; 1992.
28. Shipp, M. A.; Tarr, G. E.; Chenn C.-Y.; Switzer, S. R.; Hersch, L. B.; Stein, H.; Sunday, M. E.; Reinherz, E. L. CD/10 neutral endopeptidase-24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10662-10666; 1991.
29. Soubrier, F.; Alhenc-Gelas, F.; Hubert, C.; Allegrini, J.; John, M.; Tregear, G.; Corvol, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9386-9390; 1988.
30. Stephenson, S. L.; Kenny, J. A. Metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes. *Biochem. J.* 241:237-247; 1987.
31. Turner, A. J.; Dowdall, M. J. The metabolism of neuropeptides. Both phosphoramidon-sensitive and captopril-sensitive metallopeptidases are present in the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Biochem. J.* 222:255-259; 1984.
32. Uva, B. M.; Masini, M. A.; Hazon, N.; O'Toole, L. B.; Henderson, I. W.; Ghiani, P. Renin and angiotensin converting enzyme in Elasmobranchs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86:407-412; 1992.
33. Uva, B. M.; Masini, M. A.; Devecchi, M.; Napoli, L. Renin-angiotensin in Antarctic fishes. *Comp. Biochem. Physiol. [A]* 100:897-900; 1991.
34. Welling, G. W.; Scheffer, A. J.; Wellig-Wester, S. Determination of enzyme activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. [B]* 659:209-225; 1994.

Research report

Biochemical identification and ganglionic localization of leech angiotensin-converting enzymes

Franck Vandebulcke^a, Virginie Laurent^a, Martine Verger-Bocquet^a, George B. Stefano^{a,b}, Michel Salzet^{a,b,*}

^a Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire de Phylogénie Moléculaire des Annélides, EA DRED 1027, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudiniées, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

^b Multidisciplinary Center for the Study of Aging, Old Westbury Neuroscience Research Institute, State University of New York, College at Old Westbury, Old Westbury, NY 11568-0210, USA

Accepted 8 April 1997

Abstract

We demonstrate the presence of a membrane and soluble form of leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin-converting enzyme (ACE). Four steps in the purification of this enzyme include gel-permeation, captopril-sepharose affinity and anion-exchange chromatography followed by a reverse-phase HPLC. The peptidyl dipeptidases (of ≈ 120 and ≈ 100 kDa) are glycosylated enzymes hydrolysing the Phe⁸-His⁹ bond of angiotensin I, exhibiting the same specific activity and K_m whereas the soluble ACE exhibits a higher catalytic efficiency. This hydrolysis is inhibited by the ACE-specific antagonist captopril. Western blot analysis of a polyclonal antiserum raised against the first 11 amino-acid residues of the membrane ACE and the N-terminal sequence of the soluble molecule also demonstrates the presence of two ACE enzymes. Anti-ACE immunocytochemistry also supports the presence of two forms of ACE. This material is found in neurons and glia. We demonstrate for the first time the cellular localization and biochemical characterization of ACEs in the central nervous system of an invertebrate. Thus, the leech brain may represent a simple model for the study of these enzymes. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: Angiotensin-converting enzyme; Leech; Multicellular cooperation; Renin-angiotensin system

1. Introduction

The angiotensin-converting enzyme (dipeptidyl carboxypeptidase I, kininase II; ACE; EC 3.4.15.1) is a key enzyme of the renin-angiotensin system (RAS) which leads to the formation of the potent vasopressor angiotensin II (AII) in mammals. This is performed by the cleavage of the His-Leu bond from the C-terminus of the inactive decapeptide angiotensin I (AI) [5]. ACE also inactivates the vasopressor peptide bradykinin [5]. Mam-

malian ACE exists in two distinct forms, a somatic ACE ($M_r = 170$ – 190 kDa) [22] and a testicular enzyme ($M_r = \approx 100$ kDa) [2,5]. The cloning and characterization of human somatic ACE cDNA [22] demonstrates that it consists of two highly homologous domains with two putative active sites. In contrast, cDNAs for human [2] or mouse [14] testicular ACE appear to have a single active site exhibiting an identical sequence to the C-domain of the corresponding somatic ACE. The two forms of mammalian ACE are encoded in a single copy of the ACE gene and transcription of the testicular enzyme is under the control of an intragenic testis-specific promoter [14]. Both ACE isoforms hydrolyze AI, bradykinin and other natural peptide substrates including substance P and enkephalins [5].

Recently, in invertebrates, in the house fly *Musca domestica*, a peptidyl dipeptidase, which has very similar enzymatic properties to mammalian ACE, has been identified [9]. The other invertebrate ACE that has been studied

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1); ACELA, angiotensin-converting-like enzyme assay; AIHA, angiotensin I hydrolysis assay; AI, angiotensin I; AII, angiotensin II; DIA, dot-immunobinding assay; FPLC, fast-protein liquid chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; NEP, neuropeptide-degrading endopeptidase (EC 3.4.24.11); TBS, Tris-HCl buffer saline.

* Corresponding author. Fax: +33 (03) 2004-1130; E-mail: salzet@pop.univ-lille1.fr

in detail is the leech enzyme. A membranar leech ACE with a M_r of ≈ 120 kDa, hydrolysing the Phe³-His⁹ bond of the angiotensin I, has been purified and the first 23 amino acids sequenced [11,12]. Moreover, an ACE-like activity was also detected in the soluble fraction, suggesting the existence of a second leech ACE that is a soluble protein.

The leech brain, especially those of *Theromyzon tessulatum*, is well-known. The biochemical and morphological characteristics of numerous neurons and glial cells are well-established. The supraesophageal ganglion of this leech is made up of ≈ 500 cells distributed in six pairs of compartments, three anteriors and three posteriors. Through neurohormones, this ganglion controls important functions: gametogenesis, chromatic adaptation, oxygen consumption and osmoregulation [25]. Then, the central nervous system (CNS) of this invertebrate constitutes a particularly favorable model for the study and the understanding of the multicellular cooperation involved in the regulation of the renin-angiotensin system and the non-renin-angiotensin system.

In the present study, we focused our attention on the supraesophageal ganglion and the neuroheamal area, a region where a lot of neuropeptides might be secreted in the dorsal vessel. The aim of this work was first, to identify the soluble form of the leech ACE and second, to precise the distribution of the ACE-like immunoreactivity within the leech brain.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Chemicals

Captopril, angiotensin I, angiotensin II, 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride, hydrogen peroxide were obtained from Sigma. The peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG was from Pasteur Diagnostics. All organic solvents were HPLC grade and purchased from Merck. Deionized water was obtained from a Milli-Q system (Millipore).

2.1.2. Animals

Leeches of the species *T. tessulatum* were reared under laboratory conditions according to Malecha et al. [15].

2.1.3. Antisera

The polyclonal antiserum against the N-terminal side (GLDPELSPGCF) of the leech ACE (anti-ACE) was generated in rabbits using synthetic peptide (Neosystem, France) coupled to human serum albumin via glutaraldehyde. In enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), cross-reaction of the antiserum was 20% for rabbit lung ACE (Sigma).

2.2. Methods

2.2.1. Microscopy

For light microscopy, anterior parts of *T. tessulatum* were fixed overnight at 4°C in Bouin-Hollande fixative (+ 10% HgCl₂, saturated solution). They were then embedded in paraffin and serially sectioned at 7 μ m. After removal of paraffin with toluene, the sections were successively treated with the anti-ACE diluted 1:200 and with goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase as described elsewhere [19].

For electron microscopy, anterior and lateral compartments of the brain were fixed for 2 h at 4°C in a mixture of 4% paraformaldehyde, 0.2% picric acid and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The tissues were post-fixed in 1% OsO₄ 5 min and were dehydrated before embedding in LR white (TAAB). Immunostaining was performed directly on ultrathin sections of brains collected on nickel grids and treated as follows: (1) 10% H₂O₂, 8 min; (2) distilled water, 10 min; (3) Coons buffer pH 7.4 containing 1% normal goat serum (NGS) and 1% bovine serum albumine (BSA), 10 min; (4) anti-ACE diluted 1:800 in Coons buffer containing 1% NGS and 1% BSA, 48 h, 4°C; (5) Tris 0.1 M pH 7.4 containing 0.5 M NaCl, 1% BSA and 1% NGS, 2 \times 10 min; (6) 10 nM colloidal gold-labeled goat anti-rabbit IgG (Janssen, Belgium) diluted 1:50 in the precedent buffer, 1.5 h; and finally (7) buffer (2 \times 10 min) and distilled water (2 \times 10 min). The sections were then stained 10 min with uranyl acetate and then examined with a Jeol JEM 100 CX electron microscope.

Controls involved omission of primary antiserum, replacement of primary antibody by non-immune rabbit serum and the pre-absorption of the antiserum overnight at 4°C with the homologous antigen (synthetic leech ACE fragments, Neosystems, France at a concentration of 500 μ g/ml of pure antiserum), were performed at the optical and the ultrastructural levels.

2.2.2. Immunoassays

Dot-immunobinding assay (DIA) and ELISA based on the protocols of Salzet et al. [20,21] were used to follow the ACE-like immunoreactivity during the purification procedures.

2.3. Biochemistry

2.3.1. Protein extraction

After anesthesia of the animals in 0.01% chloretone, head parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. 500 head parts (5 g) were placed in 25 ml (1 g/5 ml) [TBS] Tris-HCl pH 8.4 20 mM containing 200 mM NaCl and homogenized at 4°C with a polytron (5 \times 15-s bursts on setting 9). After centrifugation (30 min at 12000 rpm on a Sigma 2K15 rotor at 4°C), the pellet was re-extracted

6-fold with the same amount of saline solution. The combined supernatants were centrifuged at 4°C, 2-fold 1 h at 10 000 rpm on a Beckman centrifuge (JA-20 rotor). The clarified supernatant was filtered on nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size, Millipore). Protein concentrations were determined with the Bradford procedure [3] using g globulin as a standard.

2.3.2. Protein purification

The clarified supernatant was applied onto a column of Superdex G75 (16/60, Pharmacia), pre-equilibrated with TBS at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by absorbance at 280 nm. All column fractions were assayed for ACE-like activity. A pool of active fractions was then loaded onto a captopril-sepharose affinity column (20 ml bed volume) equilibrated in 10 mM Tris-300 mM-NaCl, at a flow rate of 10 ml/h. Once the sample is applied, the affinity column is then washed with 10 mM Tris-300 mM-KCl and the elution performed with 10 mM Tris-300 mM-KCl/100 µM ZnCl₂ pH 8. The eluted fractions were then concentrated to a final volume of 5 ml. Additionally, the pool of active fractions were also loaded onto a Mono Q column (HR 5/5, Pharmacia), equilibrated in TBS. The column was washed with the same buffer and eluted with a linear gradient of NaCl of 0 to 0.5 M for 30 min and finally at 1.5 M during 5 min at a flow rate of 1 ml/min. Active fractions from the Mono Q are then separated on a C₃ Ultrapore column (75 × 4.6 mm, Beckman), equilibrated in water. Elution was performed with a discontinuous linear gradient of acetonitrile/water over 0–100% for 30 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by absorbance at 226 nm. The acetonitrile was quickly removed from the eluted fractions by freeze-drying, using a vacuum centrifuge (Savant). Fractions were adjusted to a pH of 8.4 by adding TBS and the ACE-like enzyme was detected by the ACE assays. All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a diode array.

2.3.3. Protein characterization

Electrophoresis was performed on native 5–25% polyacrylamide gradient gels (PAGE) as described by Laemmli [8]. The Western blot procedure has been described in detail elsewhere [20]. Automated Edman degradation of the purified peptide and detection of phenylthiohydantoin

(PTH-Xaa) derivatives were performed on a pulse liquid automatic sequencer (Applied Biosystems, model 470).

2.4. Determination of the ACE-like activity

2.4.1. Immunoassay

The ACE assay (AIHA, angiotensin I hydrolysis assay) was performed according to Pre and Bladier [17] on fractions obtained at each step of purification by DIA and ELISA of AII *in vitro*. The assay was performed in the following incubation buffer: 100 µl sample, 100 µl TBS pH 8.4 containing 4 mM 2,3 dimercaptopropanol, 3.2 mM 8-hydroxyquinoline sulfate and 10 µM AI. After a 90-min incubation at 37°C, the reaction was stopped by placing incubation vessels on ice. Blanks did not contain AI.

2.4.2. HPLC ACE-like enzyme activity determination

To determine the enzyme activity, active fractions containing the purified ACE-like enzyme were incubated with 10 µM synthetic peptides (AI) and with or without 10 µM of specific ACE inhibitor (captopril, according Ondetti et al. [16]) in TBS, in a final volume of 100 µl. The reaction was terminated by the addition of 30% trifluoroacetic acid (v/v). Samples were spun at high speed (10 000 × g; Sigma 2K15) for 15 min. Supernatants were diluted by adding 100 µl of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid before analysis on a C₃ (125 × 4.6 mm, Waters) reverse-phase HPLC column according to Welling et al. [26]. The molar ratio of DRVYIHPF and HL was calculated from data given by Stephenson and Kenny [24] on the quantification of peptides by HPLC.

2.5. Determination of kinetics of degradation

Kinetic parameters were determined from the regression line fitted to the data plotted as 1/V vs. 1/[S]. Correlation coefficients were > 0.99 [13]. Values for K_{cat} were calculated assuming molecular mass of 100 and 120 kDa for the pure ACEs.

3. Results

3.1. Biochemistry

The isolation of the membrane form of leech ACE has been described in detail elsewhere [11,12]. Isolation of the

Table 1
Purification of the leech ACE-like enzyme-soluble form

Step	Total protein (mg)	Sp. activity (U/mg)	Recovery (%)	Fold
1 Protein-extract	35	0.005	100	1
2 Gel-permeation (FPLC)	4.8	0.25	78	50
3 Captopril-sepharose affinity column	0.60	1.52	35	304
4 Mono Q	0.52	1.8	28	360
5 Reverse-phase HPLC	0.44	2.05	25	410

Experimental details are indicated in Section 2. FPLC, fast-protein liquid chromatography; Sp. activit, specific activity in nmol AII min⁻¹ (U) mg protein⁻¹.

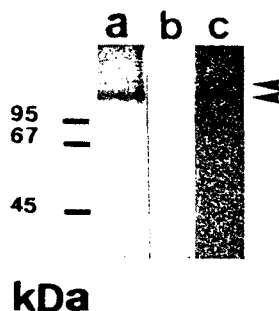


Fig. 1. Electrophoresis analysis of the leech ACE. a: electrophoresis analysis of the ACE-soluble form at the final step of purification. b: Western blot analysis of the soluble form with a-ACE directed against the N-terminal sequence of the membrane ACE form. c: periodic acid schiff treatment of the membranar and soluble ACE forms. Arrows at the left indicate the positions of the two ACE forms.

soluble ACE after a TBS extraction (gel-permeation chromatography on a fast protein liquid chromatography system (FPLC) with a Superdex G75 column) revealed a single active zone in AIHA at a retention time of 41–49 min (Table 1). Further purification of proteins contained in this zone by separating them on a captopril affinity column and then by anion-exchange chromatography on a FPLC Mono Q column revealed positive material in the void volume of AIHA. The active fractions were applied to a C3 reverse-phase HPLC column with a linear gradient of acetonitrile/water. Positive activity with the AIHA was resolved at a retention time of 5.62 min (data not shown). A molecular mass of ≈ 100 kDa was estimated for this material (Fig. 1, lane a).

Western blot analysis with the anti-leech ACE raised against the N-terminal sequence of the membrane ACE was undertaken on the purified enzyme. As shown in Fig. 1, lane b, this protein is recognized by the antiserum. Moreover, the N-terminal sequence of the purified enzyme (first 20 amino-acid residues; Table 2) is identical to the one previously obtained after solubilization of the leech head membranes [11]. Furthermore, periodic acid treatment (Schiff reaction) of the two enzymes confirms that they are both glycosylated (Fig. 1, lane c).

The specific activity of the soluble ACE on AI hydrolysis is similar to that found in leech membranes, i.e. 1.75 ± 0.27 vs. 1.5 ± 0.45 nmol of AII/mg of protein. Moreover, their K_m values are also similar (750 vs. 830 μM). By contrast, the K_{cat}/K_m , corresponding to the catalytic effi-

Table 2

Automated Edman degradation of 100 pmol of the leech ACE-soluble form, with a repetitive yield of 93%

AA	pmol
Gly (G)	68.03
Leu (L)	63.44
Asp (D)	49.49
Pro (P)	58.52
Glu (E)	79.22
Leu (L)	69.77
Ser (S)	49.23
Pro (P)	45.28
Gly (G)	48.41
Xaa	
Phe (F)	34.43
Ser (S)	13.86
Ala (A)	29
Asp (D)	48.94
Glu (E)	30.83
Ala (A)	46.46
Gly (G)	53.45
Ala (A)	44.67
Gln (Q)	27.06
Leu (L)	28.29
Phe (F)	28.55

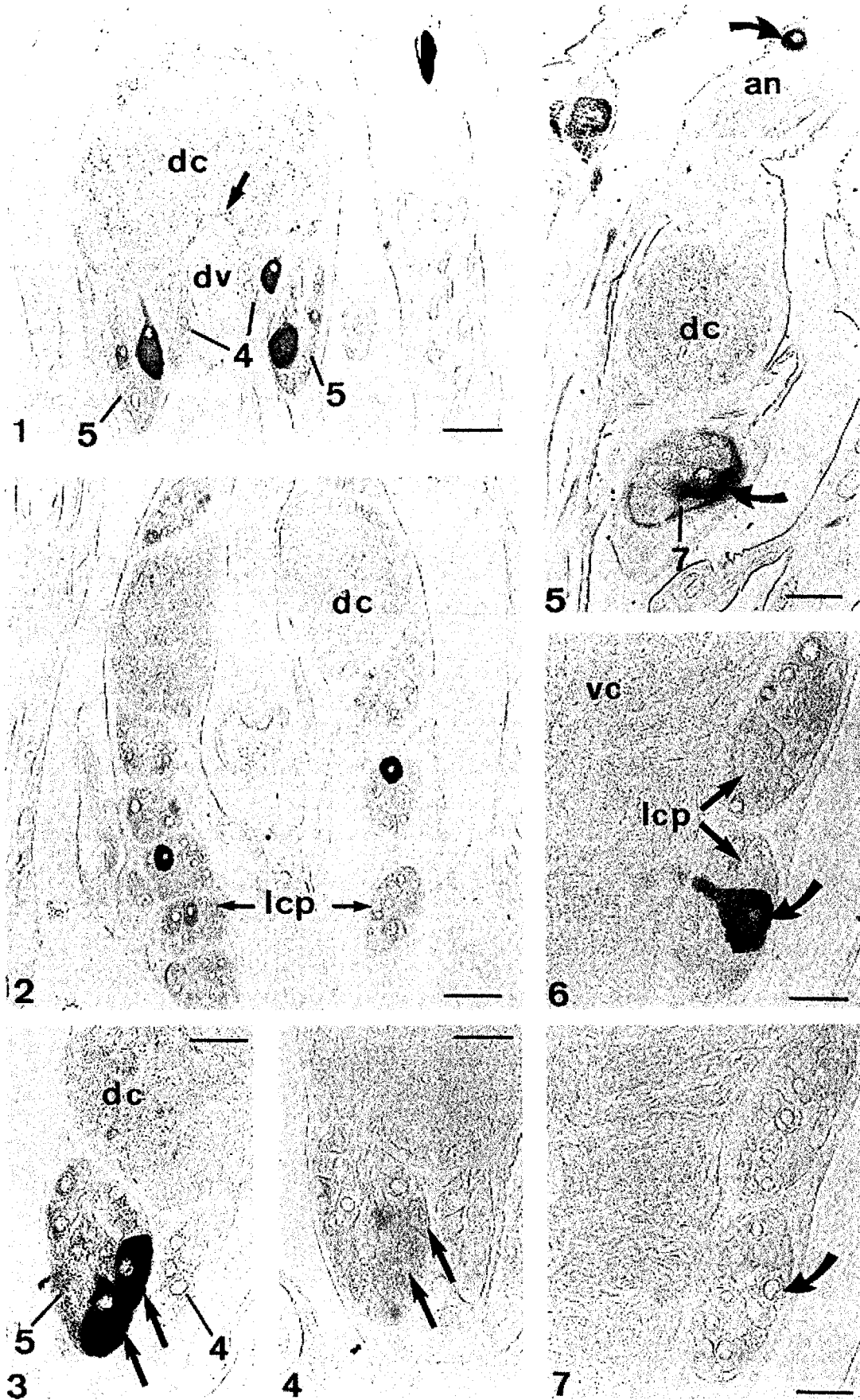
AA, amino-acid residues; Xaa, non-identified phenylthiohydantoin derivative.

ciency of the enzyme is higher in the case of the hydrophilic ACE-like enzyme (346 vs. $153 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). Captopril blocks both enzymes with a similar efficiency ($\text{IC}_{50} = 230 \pm 65$ vs. $175 \pm 45 \text{ nM}$, respectively). The two ACE forms need Cl^- for their catalytic action (optimal concentration was 0.3 M NaCl).

3.2. Immunocytochemistry

Positive ACE immunoreactivity is found in the leech CNS (supra- and subesophageal ganglia, segmental ganglia of ventral nervous cord). Immunostaining is found on nerve cell bodies, fibers and on some glial cells. Positive nerve cell bodies are located in the different compartments of the supra- (Fig. 2.1) and subesophageal ganglia (Fig. 2.2). Immunoreactive fibers were distributed throughout the dorsal commissure (Fig. 2.1). Thus, the neurohaemal area also contains ACE-immunoreactive fibers. A few glial cells located in the ganglionic compartments were also immunostained (Fig. 2.5). It is possible to identify glial

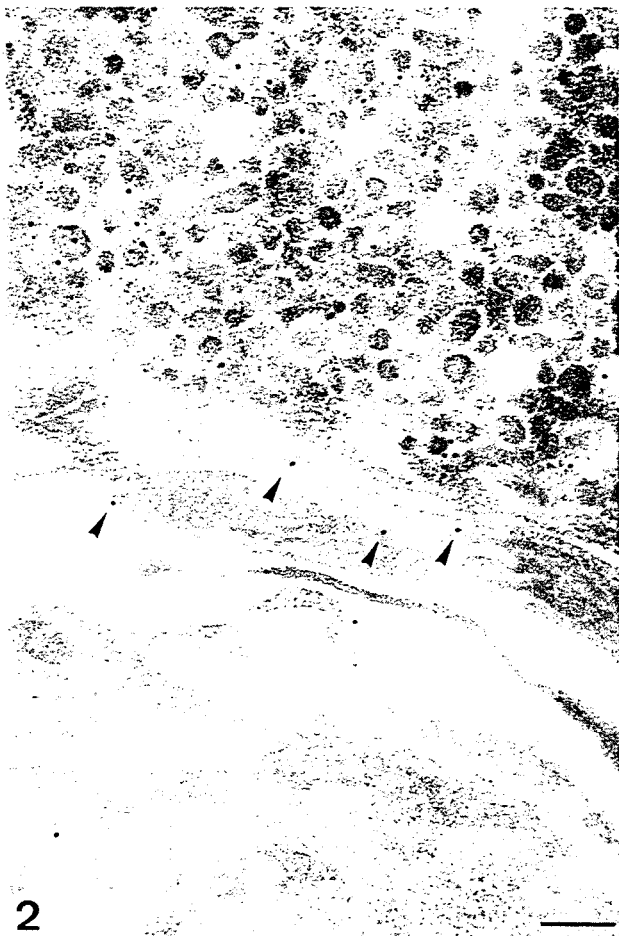
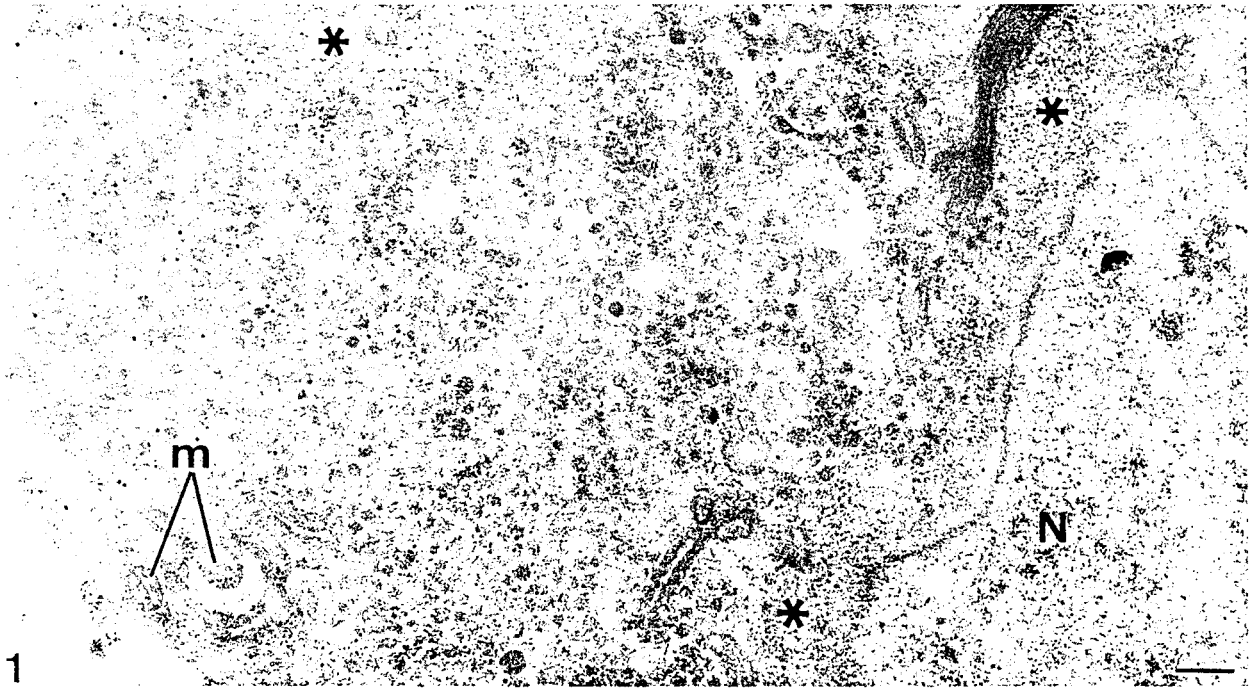
Fig. 2. ACE immunoreactivity in CNS of *T. tessulatum*. 1: section through supraesophageal ganglion showing immunostaining with ACE antiserum in neurons of compartments 4,5 (4,5) and in fibers of dorsal commissure (dc). Immunoreactive fibers are observed in neurohaemal area (arrow); dv, dorsal vessel. 2: immunopositive neurons to ACE antiserum detected in lateral compartments (lcp) of subesophageal ganglion. dc, dorsal commissure. 3,4: adjacent sections through posterior compartments of supraesophageal ganglion treated with a-ACE pre-adsorbed (Fig. 4) or not (Fig. 3) with the homologous antigen. Pre-adsorption of the antiserum with synthetic ACE abolished the immunostaining (arrows). 5: immunostaining with ACE antiserum in glial cells (arrows) of a lateral compartment (compartment 7 (7)) and of an anterior nerve (an); dc, dorsal commissure. 6,7: adjacent sections through lateral compartments (lcp) of subesophageal ganglion incubated with either a-ACE (Fig. 6) or a-ACE pre-adsorbed with synthetic ACE (Fig. 7). The ACE-staining capacity is abolished after adsorption with ACE (arrows). vc, ventral commissure. Bar = 40 μm (for 1,2), = 25 μm (for 3,4,6,7), and = 30 μm (for 5).



cells because of their specific aspect and in particular by the presence of glial processes (Fig. 2.5). Pre-adsorption of anti-ACE with the homologous antigen abolished the posi-

tive staining, reflecting the specificity of the immunostaining (Fig. 2.3-4, 6-7).

ACE immunoreactivity, visualized by gold-labeling, was



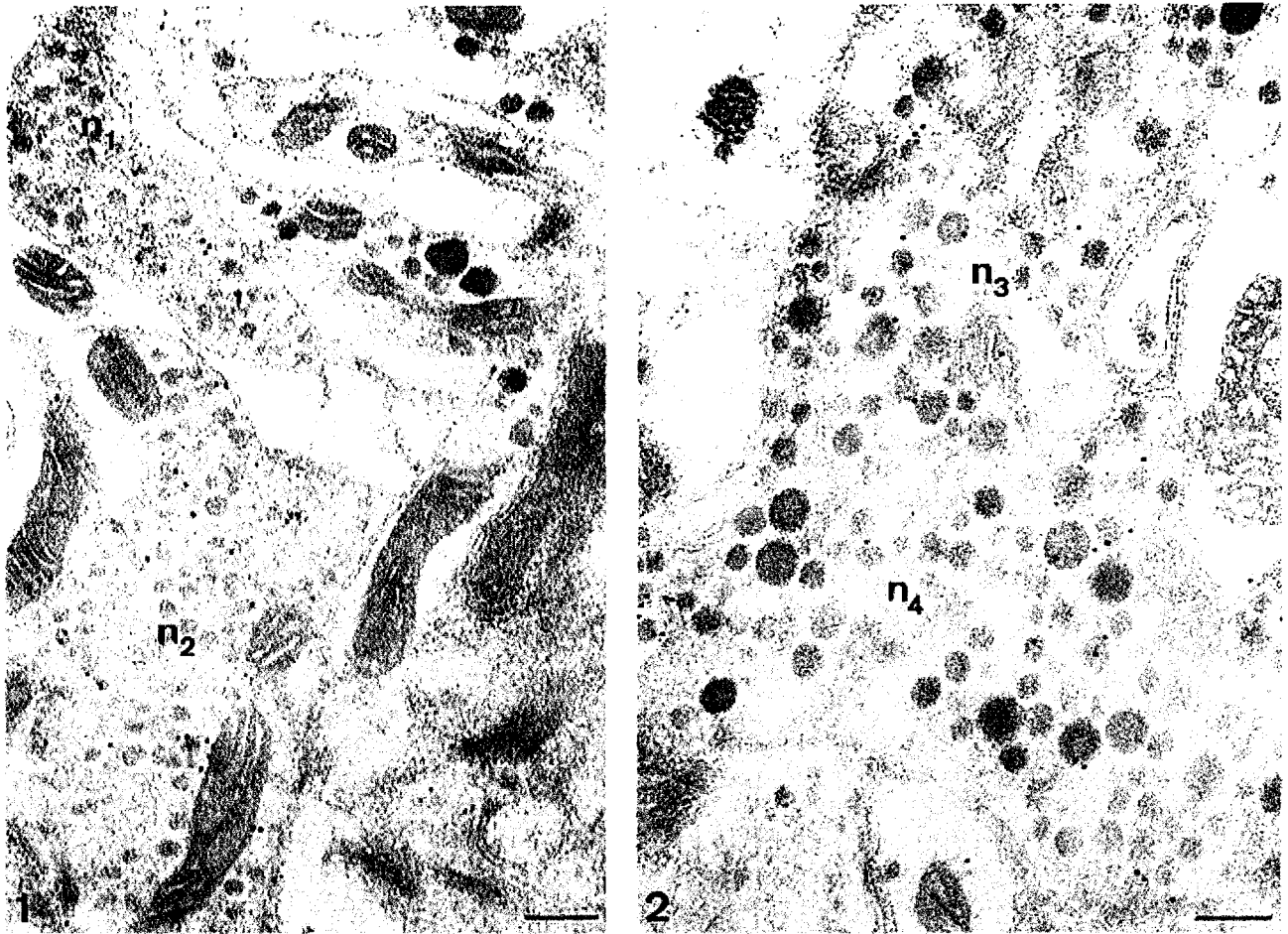


Fig. 4. Ultrastructural distribution of ACE-like immunoreactivity (immunogold-labeling) in the neurohaemal area of *T. tessulatum*. 1,2: two different views demonstrating the presence of ACE immunoreactivity in nerve fibers having different ultrastructural features (cf. n_1 , n_2 with n_3 , n_4). n, nerve fibers. Bar = 0.2 μ m.

prominent in nerve cell bodies of the anterior and lateral compartments of the CNS. Most of the labeling was concentrated over dense-core vesicle fields (60–100 nm in diameter), suggesting that the enzyme is packed in vesicles and/or inserted in the vesicles' membrane (Fig. 3.1). Nevertheless, it seems that the immunolabeling is preferentially located at the periphery of the granules which may be in favor of a localization of ACE on membranes of the granules. ACE immunoreactivity was observed overlying 2 different populations of dense-core vesicles (40–60 and 60–100 nm in diameter) present in the perikarya (data not shown) as well as in the nerve fibers in the neurohaemal area (Fig. 4.1–2).

The cytoplasm of these neurons also exhibited positive immunoreactivity to ACE. ACE immunoreactivity was moderate in intensity in perikaryal vesicle-free cytoplasm

(Fig. 3.2, arrows) while the intensity and dispersion of immunogold particles over axonal endings was inconclusive regarding extravascular (i.e. exoplasmic) localization (Fig. 4.1–2). Moreover, ACE immunoreactivity also was detected over glial-cell profiles and appeared to be membrane in origin (Fig. 3.3).

4. Discussion

The results of the study demonstrate the following: (1) The presence in the CNS of a soluble leech ACE with a molecular mass of 100 kDa resembling vertebrate testicular ACE ($M_r = 90$ –110 kDa) [5] and insect ACE ($M_r = 67$ –87 kDa) [4,9,10]. (2) The existence of a biochemical link between the membrane [11] and soluble leech ACE

Fig. 3. Ultrastructural distribution of ACE-like immunoreactivity (immunogold-labeling) in the subesophageal ganglion of *T. tessulatum*. 1,2: ACE immunoreactivity in neuronal perikarya shown at low (1) and high (2) magnification. Although concentrated over dense-cored vesicle fields as obvious in (1), ACE immunoreactivity is also present in the cell cytoplasm (arrowheads in 2). m, mitochondrion; $\bar{}$ vesicle-free regions of cytoplasm. 3: high-power micrograph showing the preferential membranar localization of ACE immunoreactivity in glial cell profiles. Bar = 0.2 μ m.

demonstrate by Western blot analysis and periodic schiff treatment experiences and automated Edman degradation. (3) The two ACE possess the same N-terminus, reinforcing the hypothesis that both are, respectively, the membrane and the soluble forms of ACE. In fact, ACE forms belong to the type-I class of integral transmembrane domain with a 17-amino acid hydrophobic anchor located 30 amino-acid residues from cytosolic C-terminus [5]. (4) The immunocytochemical studies demonstrate the presence of ACE immunoreactivity in neurons and glial cells. Taken together, the study demonstrates that invertebrate ACE resembles vertebrate ACE. Additionally, its localization suggests that both neurons and glial cells are involved with processing similar signal molecules.

Recently, in invertebrates, in *M. domestica*, a peptidyl dipeptidase which has similar enzymatic properties to mammalian ACE has been described [9]. This enzyme has an apparent M_r of ≈ 80 kDa, thus, resembling the single-domain enzyme [9]. A more hydrophilic ACE with a M_r of 67 kDa has been purified in *M. domestica* using a lisinopril-sepharose affinity column [10]. This enzyme removed C-terminal dipeptides from angiotensin I, bradykinin, Leu-enkephalin and Met-enkephalin as well as functioning as an endopeptidase by hydrolysing dipeptideamides from Leu-enkephalinamide and Met-enkephalinamide and then a dipeptideamide and tripeptideamide from substance P. *Musca* ACE also displays properties of both N- and C-domains of human ACE [10]. More recently, cDNA of insect ACE has been cloned from *Drosophila melanogaster* embryo cDNA library that codes for a single-domain 615 amino-acid protein with high levels of similarity to both N- and C-domains of mammalian ACE [4].

The leech has also provided information on invertebrate ACE. We purified ACE from leech head membranes [11,12]. The first 23 amino-acid residues of the N-terminal part of the purified leech ACE revealed $\approx 87\%$ sequence identity with the N-terminal sequence of the plasma serum guinea-pig ACE [11]. This ACE (of ≈ 120 kDa) hydrolyses at pH 8.4 and 37°C, the Phe⁸-His⁹ bond of the angiotensin I with a high catalytic activity, i.e. $K_m = 830 \mu\text{M}$ and $K_{cat}/K_m = 153 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. This zinc metallopeptidase also attacks peptides having in their sequence either a Gly-His or a Gly-Phe or a Phe-His bonds, e.g. enkephalins ($K_{cat}/K_m = 12 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) or bradykinin ($K_{cat}/K_m = 2200 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) [13]. This data are consistent with an ACE-like activity implicated in metabolism of angiotensins and bradykinin in leeches as in insects and mammals. Our results are in agreement with the finding that this is a single-domain mammalian-like ACE.

Immunocytochemical reactivity reveals that this material is found on neurons and glial cells. These findings suggest that invertebrate neurons and glial cells may communicate via the renin-angiotensin system. Regarding the positive immunostaining of neurons and glial cells, at present, it is not possible to determine if 2 different molecular forms are present or if different forms exist in

the same cell type. Moreover, the observation of ACE immunoreactivity in nerve fibers in a neurohaemal area is in agreement with the known function of ACE in insects as a secreted enzyme.

In comparing this information to that found in vertebrates, we note that in higher animals there are two isoforms of ACE derived from a single gene [7,14]. In somatic tissues, ACE is expressed as a glycoprotein composed of a single polypeptide chain with an apparent molecular mass of 170 kDa, containing two large homologous domains, called the N- and C-domains, with each domain bearing an active catalytic site [22]. In male germinal cells, ACE is synthesized as a lower molecular mass form (110 kDa), containing only the active C-domain of endothelial ACE [22]. Recently, it has been demonstrated in vertebrates that an EDTA-sensitive protease associated to membrane preparations [18] releases a hydrophilic form of ACE from cell surfaces by cleavage of the ACE protein close to its membrane anchor [1] which then creates a soluble form of ACE. This may also occur in invertebrates.

In vertebrates, the solubilized ACE circulates in many body fluids [6], suggesting an immunoregulatory function. In regard to the N-terminal sequence of both forms of leech ACE and their recognition by anti-ACE antiserum, we suggest that the membrane form may be anchored by its C-terminus. Insect ACE displays properties of both N- and C-domains of human ACE, indicating a high degree of conservation during evolution [9,10]. In leeches, both membrane and soluble ACE forms display similar activity towards AI, except for the catalytic efficiency which is higher for the hydrophilic form.

In summary, comparison of the core regions of the two mammalian ACE domains with the single-domain insect ACE shows three significant events in evolutionary terms [4]. The divergence of the higher insect and mammal lineages (usually put at 550 million years ago), the radiation of the modern mammals (65 million years ago) and the gene duplication event that led from a single-domain ACE-like protein to the mammalian two-domain ACE. However, it is possible to say that the duplication probably occurred in the deuterostome lineage, as seen by the greater similarity between the N- and the C-domains than between the N- and the C-domains of vertebrate and insect ACE. This study also provides additional evidence that the mammalian-like peptides (i.e. enkephalins, etc.) found in invertebrates also have mammalian-like processing/terminating enzymes demonstrating that these processes first evolved in simpler animals [23].

Acknowledgements

The studies were in part supported by NIH Grants MH/DA 17138 and DA 09010 (to G.B.S.) and NIH Fogarty Grant INT 00045 (to G.B.S. and M.S.). We are indebted to Annie Desmons of the Laboratoire de

Phylogénie Moléculaire des Annélides, EA DRED 1027, for her excellent technical assistance.

References

- [1] V. Beldent, A. Michaud, C. Bonnefoy, M.-T. Chauvet, P. Corvol, Cell surface localization of proteolysis of human endothelial angiotensin I converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 28962–28969.
- [2] K.E. Bernstein, B.M. Martin, E.A. Bernstein, J. Linton, G. Stricker, The isolation of angiotensin converting enzyme cDNA. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 11021–11024.
- [3] M.M.A. Bradford, Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyeing. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [4] M.J. Cornell, T.A. Williams, N.S. Lamango, D. Coates, P. Corvol, F. Soubrier, J. Hoheisel, H. Lehrach, I. Isaac, Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin-converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 13613–13619.
- [5] P. Corvol, T.A. Williams, F. Soubrier, Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. in: A.J. Barrett (Ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 248, Academic Press, 1995, pp. 283–305.
- [6] N.M. Hooper, A.J. Turner, Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. *Biochem. J.* 241 (1987) 625–633.
- [7] T.E. Howard, S.-Y. Shai, K.G. Langford, B.M. Martin, K.E. Bernstein, Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 4294–4302.
- [8] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [9] N.S. Lamango, R.E. Isaac, Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly *Musca domestica*, that resembles mammalian angiotensin-converting enzyme. *Biochem. J.* 299 (1994) 651–657.
- [10] N.S. Lamango, M. Sajid, R.E. Isaac, The endopeptidase activity and the activation by Cl^- of angiotensin converting enzyme is evolutionary conserved: purification and properties of an angiotensin-converting enzyme from the housefly, *Musca domestica*. *Biochem. J.* 314 (1996) 639–646.
- [11] V. Laurent, M. Salzter, A comparison of the N-terminal sequence of leech angiotensin converting-like enzyme with forms of vertebrate angiotensin converting enzyme. *Neurosci. Lett.* 198 (1995) 60–64.
- [12] V. Laurent, M. Salzter, Identification and properties of an angiotensin-converting enzyme in the leech *Theromyzon tessulatum*. *Peptides* 17 (5) (1996) 737–745.
- [13] V. Laurent, M. Salzter, Metabolism of enkephalins in head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum* by peptidases. *Regul. Peptides* 65 (1996) 123–131.
- [14] A.L. Lattion, F. Soubrier, J. Allegrini, C. Hubert, P. Corvol, F. Alhenc-Gelas, The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett.* 252 (1989) 99–104.
- [15] J. Malecha, M. Verger-Bocquet, A. Lepretre, G. Tramu, Mise en évidence et évolution, au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motiline porcine dans le ganglion supraœsophagien de la sangsue *Theromyzon tessulatum*. *Can. J. Zool.* 67 (1989) 636–640.
- [16] M.A. Ondetti, D.W. Cushman, Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 283–308.
- [17] J. Pre, D. Bladier, A rapid and sensitive spectrophotometric method for routine determination of serum angiotensin I converting enzyme. *IRCS Med. Sci.* 11 (1983) 220–221.
- [18] R. Ramchandran, I. Sen, Cleavage processing of angiotensin-converting enzyme by a membrane-associated metalloprotease. *Biochemistry* 34 (1995) 12645–12652.
- [19] M. Salzter, M. Verger-Bocquet, C. Watez, J. Malecha, Evidence for angiotensin-like molecules in the central nervous system of the leech *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). A possible diuretic effect. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A (1992) 83–90.
- [20] M. Salzter, C. Watez, J.-L. Baert, J. Malecha, Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *Brain Res.* 631 (1993) 247–255.
- [21] M. Salzter, C. Watez, M.C. Slomianny, B. Léü, K.J. Siegert, ELISA for oxytocin. Highly sensitive tests for the titration of an oxytocin-like substance in the leech *Erpobdella octoculata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102C (1992) 483–487.
- [22] F. Soubrier, F. Alhenc-Gelas, C. Hubert, J. Allegrini, M. John, G. Tregear, P. Corvol, Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 9386–9390.
- [23] G.B. Stefano, B. Scharrer, E.M. Smith, T.K. Hughes Jr., H.I. Magazine, T.V. Bilfinger, A.R. Hartman, G.L. Fricchione, Y. Liu, M.H. Makman, Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit. Rev. Immunol.* 16 (1996) 109–144.
- [24] S.L. Stephenson, J.A. Kenny, Metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes. *Biochem. J.* 241 (1987) 237–247.
- [25] M. Verger-Bocquet, C. Watez, M. Salzter, J. Malécha, Immunocytochemical identification of peptidergic neurons in compartment 4 of the supraesophageal ganglion of the leech *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). *Can. J. Zool.* 70 (1991) 856–865.
- [26] G.W. Welling, A.J. Scheffer, S. Wellig-Wester, Determination of enzyme activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 659 (1994) 209–225.

Molécules apparentées à l'endopeptidase 24.11 et
à l'aminopeptidase neutre :

Article (6)

Article (7)

La NEP-like et l'Aminopeptidase-like

Laurent, V. and Salzet, M. Isolation of a neuropeptide-degrading endopeptidase from the leech *Theromyzon tessulatum* Eur. J. Biochem. 233, 186-191 (1995).

Laurent, V., Salzet, M. Metabolism of enkephalins in head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum* by peptidases : isolation of an enkephalin-degrading aminopeptidase : Regulatory Peptides 65 (1996) 123-131.

Lors de la purification de l'ACE-like membranaire, les différents tests utilisés ont montré l'existence d'une activité de conversion de l'AI en AII résistante aux inhibiteurs spécifiques de l'ACE : le captopril, le lisinopril. Le but de mon travail a alors été de rechercher l'enzyme responsable de cette activité et de la caractériser. Les premiers résultats ont montré l'existence d'une peptidase sensible au phosphoramidon, un inhibiteur spécifique des métalloprotéases telle l'endopeptidase 24.11.

Résultats

L'étude approfondie de l'ACE-like chez *T. tessulatum* a permis de mettre en évidence une seconde enzyme impliquée dans la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II active, ainsi que dans celle du TDP en AII de façon directe. Une enzyme apparentée à l'endopeptidase 24.11 a été isolée. Elle possède une masse de 45 kDa, clive ses substrats à pH neutre et à 37° C, bien qu'elle soit encore active à 4° C. Ce dernier résultat est facilement explicable par le fait que notre modèle est une sangsue vivant en eaux froides. Son métabolisme semble y être adapté. Elle est capable de cliver l'AI et d'autres substrats comme les enképhalines. Son action est bloquée en présence d'un inhibiteur spécifique de l'endopeptidase 24.11 : le phosphoramidon. Son activité catalytique vis à vis de neuropeptides est comparable à ce que l'on observe chez les Vertébrés. Tous ces résultats tendent à démontrer l'existence d'une enzyme de type « neutral endopeptidase » (NEP) chez la sangsue, bien qu'elle soit plus petite que celle isolée chez les vertébrés.

Néanmoins, les premiers résultats de microséquençage montrent que l'on a bien affaire à une molécule apparentée à la NEP (NEP-like), comprenant une séquence consensus HEXXH au niveau de son site actif. Afin de connaître le rôle exact de ce nouveau membre possible de la famille des métallopeptidases de type II, nous avons procédé à l'hydrolyse des enképhalines par les peptidases contenues dans le système nerveux central de sangsues, tout en sachant que l'enzyme recherchée possède une préférence pour les peptides opioïdes par rapport aux angiotensines.

Deux enzymes prédominent dans l'attaque des enképhalines dans le cerveau de sangsue. L'une d'elles a déjà été identifiée et il s'agit de la NEP, tandis que la deuxième s'apparenterait à l'aminopeptidase neutre.

En effet, une troisième activité enzymatique est présente dans l'extrait membranaire préparé à partir de parties antérieures de sangsues, en plus de l'ACE-like et la NEP-like. C'est un homodimère de 70 kDa comme l'aminopeptidase neutre (EC. 3. 4. 11. 2), mais sa taille est plus petite que celle de l'enzyme de vertébrés. Elle attaque l'extrémité N terminale des enképhalines, à pH neutre et à 37° C (activité bloquée par l'amastatine, inhibiteur spécifique de l'aminopeptidase neutre). Les différents produits d'hydrolyse identifiés en HPLC sur colonne de phase inverse, ont contribué à déterminer les différents points d'attaque des substrats et la nature des enzymes impliquées. On remarque que la Met-enképhaline est un excellent substrat pour cette nouvelle molécule de la famille des aminopeptidases alors que la NEP-like arrive en deuxième position pour l'hydrolyse de ce substrat.

Ces résultats sont semblables à ceux obtenus chez les vertébrés. Ils confirment donc l'existence chez la sangsue, de deux nouvelles enzymes apparentées respectivement, à l'endopeptidase 24.11 et à l'aminopeptidase neutre. Ces deux protéases participeraient au catabolisme de peptides variés (les angiotensines, les enképhalines etc.) chez *T. tessulatum* comme chez les vertébrés.

La présence de ces enzymes (rénine, ACE, NEP, aminopeptidase) montre l'implication des peptides et des enzymes dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques tel que le maintien de l'équilibre hydrominéral ou la réponse immunitaire chez la sangsue et ceci de façon plus efficace encore que chez le mollusque *Mytilus edulis* (Stefano, *et al.*, 1996b) considéré comme plus évolué.

Isolation of a neuropeptide-degrading endopeptidase from the leech *Theromyzon tessulatum*

Virginie LAURENT and Michel SALZET

Laboratoire de Phylogénie moléculaire des Annélides, Centre National de la Recherche Scientifique ER 87, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudinées, Université des Sciences et Technologies de Lille, France

(Received 7 July 1995) – EJB 95 1140/4

Extracts of head parts prepared from the leech *Theromyzon tessulatum* hydrolyse the Gly3-Phe4 bond of synthetic [D-Ala2, Leu5]enkephalin and the Gly-His bond of benzoyl-Gly-His-Leu. The metabolism of benzoyl-Gly-His-Leu was completely inhibited by captopril, consistent with an angiotensin-converting enzyme activity. Such an enzyme has recently been isolated from *T. tessulatum*. However, the enkephalin hydrolysis by captopril (100 μM) was inhibited to a maximum of 70 %. The residual activity hydrolyzing enkephalin was inhibited by phosphoramidon, consistent with the presence of endopeptidase-24.11, a mammalian enzyme implicated in the metabolism of neuropeptides. This enzyme was isolated using four steps of purification including gel-permeation and anion-exchange chromatographies followed by reverse-phase HPLC. This neuropeptide endopeptidase (of approximate molecular mass 45 kDa) hydrolyses, at pH 7 and 37°C, both the Gly3-Phe4 bond of synthetic [D-Ala2, Leu5]enkephalin and the Phe8-His9 bond of angiotensin I. Cleavage of [D-Ala2, Leu5]enkephalin yields, respectively, the Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu peptides with a specific activity of 29 nmol Tyr-D-Ala-Gly \cdot min⁻¹ \cdot mg protein⁻¹ (K_m 95 μM). The hydrolysis of angiotensin I yields angiotensin II and the dipeptide His-Leu with a specific activity of 1.2 nmol angiotensin min⁻¹ \cdot mg protein⁻¹ (K_m 330 μM). The metabolism of these peptides was totally inhibited by phosphoramidon. This study therefore provides biochemical evidence for neuropeptide-degrading endopeptidases in leeches.

Keywords: angiotensin-converting enzyme; leech; neuropeptides; neutral endopeptidase; peptidase.

Endopeptidase-24.11 and peptidyl dipeptidase (angiotensin-converting enzyme or ACE) are two well-characterized mammalian plasma-membrane metalloenzymes involved in the metabolism of biologically active peptides [1–6]. Both enzymes hydrolyse the Gly3-Phe4 bond of enkephalin and are implicated in the physiological inactivation of this opioid peptide [5, 6]. The two enzymes can be distinguished by their sensitivity to different inhibitors. They are both phosphoramidon sensitive [7]. However, ACE was not totally inhibited by phosphoramidon (only 40%). By contrast, captopril completely inactivates this enzyme [8].

In comparison with the mammalian system, relatively little is known about the inactivation of neuropeptides in invertebrates, but it is likely that similar enzyme mechanisms operate at the synaptic level. Neuropeptide-degrading endopeptidases were found in hemolymph of the mollusk *Mytilus edulis* [9], the crayfish *Astacus polyphemus*, and the horse shoe crab *Limulus polyphemus* [10]. Moreover, an ACE-like enzyme, similar to vertebrate ACE, has been isolated from the insect *Musca domestica* [11] and an endopeptidase-24.11-like enzyme has been isolated

from the insect *Schistocera gregaria* [12] and from the crayfish *Astacus polyphemus* [11]. These enzymes possess degradative activities similar to the mammalian dipeptidyl carboxypeptidase.

In leeches, such enzymes should also be present. Parallel to the purification of enkephalins from brains of the leech *Theromyzon tessulatum*, two dipeptides, Phe-Met and Phe-Leu, were isolated [13]. The presence of the dipeptides Phe-Leu and Phe-Met could be due to a proteolytic action of peptidases, i.e. an endopeptidase-24.11-like and/or an ACE-like enzyme. Recently, the ACE-like enzyme has been isolated from *T. tessulatum* (Laurent, V. and Salzset, M., unpublished results).

In the present study, we demonstrate that extracts from head parts of the leech *T. tessulatum* hydrolyse the Gly3-Phe4 bond of synthetic [D-Ala2, Leu5]enkephalin and this is attributable to two separate enzyme activities. One of these two activities corresponded to the ACE-like enzyme, previously isolated in *T. tessulatum* (Laurent, V. and Salzset, M., unpublished results). The other activity has characteristics similar to those of endopeptidase-24.11.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Mature specimens of the Rhynchobdellid leech *T. tessulatum*, reared under laboratory conditions as described by Malecha et al. [14], were used in this study.

Antiserum. The polyclonal antiserum (a-AII) directed against angiotensin II (AII) was a kind gift of Dr G. Tramu (Laboratoire de Neurocytochimie fonctionnelle, Université de Bordeaux I, Talence, France). It was generated in a rabbit using

Correspondence to M. Salzset, Laboratoire de Phylogénie moléculaire des Annélides, ER 87 Centre National de la Recherche Scientifique, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudinées, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abbreviations. ACE, angiotensin-converting enzyme; AI, angiotensin I; AII, angiotensin II; a-AII, anti-angiotensin II; Bz, benzoyl; DIA, dot immunobinding assay; NEP, neuropeptide endopeptidase.

Enzymes. Angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1); neuropeptide endopeptidase (EC 3.4.24.11).

Table 1. Purification of the endopeptidase-24.11-like enzyme from head parts of the leech *T. tessulatum*. Experimental details are indicated in the Materials and Methods section. One unit is 1 nmol Tyr-D-Ala-Gly · min⁻¹ · mg protein⁻¹.

Step	Total protein	Total activity	Specific activity	Recovery	Purification
	mg	U	U/mg	%	-fold
1. Leech extract	120	120	1	100	1
2. Gel permeation (FPLC)	15	75	5	70	5
3. Anion exchange (FPLC)	3	36	12	66	12
4. Reverse-phase HPLC	1.05	30	29	60	29

synthetic human AII coupled to human serum albumin via glutaraldehyde. In radioimmunoassay experiments, cross-reaction of the antiserum was 100% for AII and for fragment 5–8 of AII, 3.13% for AIII, and 0.46% for AI. No cross-reaction was observed with fragment 1–4 of AII and A0.

Enzyme assay. Assays of peptidase activities were carried out with 15 µg protein incubated with or without 10 µM [D-Ala², Leu⁵]enkephalin (Sigma) and 10 µM phosphoramidon (Sigma) or 10 µM captopril (Sigma) or 10 µM epimiastatin (Sigma) in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 (Tris/NaCl), in a total volume of 100 µl. Metabolism was terminated by the addition of 30% (by vol.) trifluoroacetic acid. Samples were centrifuged at high speed (12000 g; Sigma 2K15) for 15 min. Supernatants were diluted by adding 100 µl 0.1% (by vol.) trifluoroacetic acid before analysis on a C₄ LiChrospher RP100 HPLC column (125 mm×4.6 mm, Merck) according to Davis [15]. The molar ratio of Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu was calculated from the data given by Turner and Dowdall [16] on the quantification of peptides by HPLC.

HPLC analysis of incubation mixtures. A 100-µl aliquot of the assay mixture was removed from each of the assay mixtures after it was clarified by centrifugation and subsequently analyzed by HPLC on a C₄ LiChrospher RP 100 column (125 mm×4.6 mm, Merck), equilibrated in water acidified with 0.1% trifluoroacetic acid. Elution was performed with a discontinuous linear gradient of acetonitrile in acidified water over 0–50% for 15 min and over 50–80% for 5 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by measuring the absorbance at both 215 nm and 254 nm. The 254 nm wavelength is particularly well suited for our assay since it is able to detect peptide bonds and the aromatic amino acids, Tyr and Phe. Under the described conditions, [D-Ala², Leu⁵]enkephalin and most of its major degradation products are separated from each other.

Assay of Bz-Gly-His-Leu hydrolysis. The hydrolysis of Bz-Gly-His-Leu (Bz, benzoyl) was also measured by a HPLC method. Bz-Gly-His-Leu (5 mM) was incubated in Tris/NaCl, containing 15 µg protein in a total volume of 100 µl. The reaction was stopped by addition of 30% (by vol.) trifluoroacetic acid and the products (Bz-Gly and His-Leu) were resolved and quantified by HPLC.

Immunoassays. Dot immunobinding assays (DIA) and enzyme-linked immunoabsorbant assays (ELISA) were based on the protocols of Salzet et al. [17, 18]. Quantification of AII was performed using a direct ELISA. For the two types of immunoassays, antiserum a-AII was employed at a dilution of 1:1000. As a control, the preadsorption of a-AII was carried out using homologous peptide. Prior to ELISA and DIA, a-AII, at its working dilution, was incubated overnight at 4°C with synthetic AII (100 µg/ml undiluted a-AII).

Assay of angiotensin I hydrolysis. This assay was performed on fractions obtained at each step of purification of the endopeptidase by DIA and ELISA of AII generated *in vitro* in the following incubation system: 200 µl sample, 100 µl Tris/NaCl

containing 4 mM 2,3-dimercaptopropanol, 3.2 mM 8-hydroxyquinoline sulfate and 10 µM AI (incubated for 90 min at 37°C). The reaction was stopped by placing incubation vessels in ice-cold water. Controls were prepared for each sample with the same procedure without AI.

Purification. A four-step procedure was used for purification (Table 1). *Step I: tissue endopeptidase extraction.* After anesthesia of the animals in 0.01% chlorotone, head parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C. 500 head parts were homogenized and extracted with 5 ml 20 mM Tris/HCl, pH 8.2, containing 200 mM NaCl and 0.05% Triton X-114, at 4°C. After centrifugation at 12000 rpm for 30 min in a Sigma 2K15 rotor at 4°C, the pellet was extracted again six times. The supernatants were filtered using nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size, Millipore). Protein concentrations were determined with the Bradford procedure [19] using γ-globulin as a standard.

Step II: gel-permeation chromatography. The extract was applied onto a column of Superdex G-75 (16/60, Pharmacia), previously equilibrated with Tris/NaCl at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by measuring the absorbance at 280 nm. All column fractions were assayed for enzyme activity.

Step III: chromatography on Mono Q. Pooled active fractions were loaded onto a Mono Q HR 5/5 column (Pharmacia), equilibrated in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.2. The column was washed with the same buffer and eluted with a discontinuous linear gradient of 0.28 M NaCl for 2 min, with 0.28–0.48 M NaCl for 15 min, and finally at 0.5 M NaCl for 2 min at a flow rate of 1 ml/min.

Step IV: reverse-phase HPLC. The active fractions were concentrated 20-fold in a vacuum centrifuge (Savant) before separation on a C₄ LiChrospher RP 100 column (125 mm×4.6 mm, Merck), equilibrated in acidified water. Elution was performed with a linear gradient of acetonitrile in acidified water over 0–80% for 25 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by measuring the absorbance at 215 nm and the presence of the neuropeptide endopeptidase (NEP) was detected by NEP assays. All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a Beckman model 168 photodiode array detector.

Electrophoresis. Electrophoresis of proteins was performed by SDS/PAGE using 10–25% polyacrylamide gradient gels as described by Laemmli [20]. The sample buffer contained 2-mercaptoethanol.

RESULTS AND DISCUSSION

Hydrolysis of [D-Ala², Leu⁵]enkephalin by *T. tessulatum* extract. Significant hydrolysis of the [D-Ala², Leu⁵]enkephalin occurred only at the Gly³-Phe⁴ bond, producing the products Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu (Fig. 1). In the absence of epimiastatin

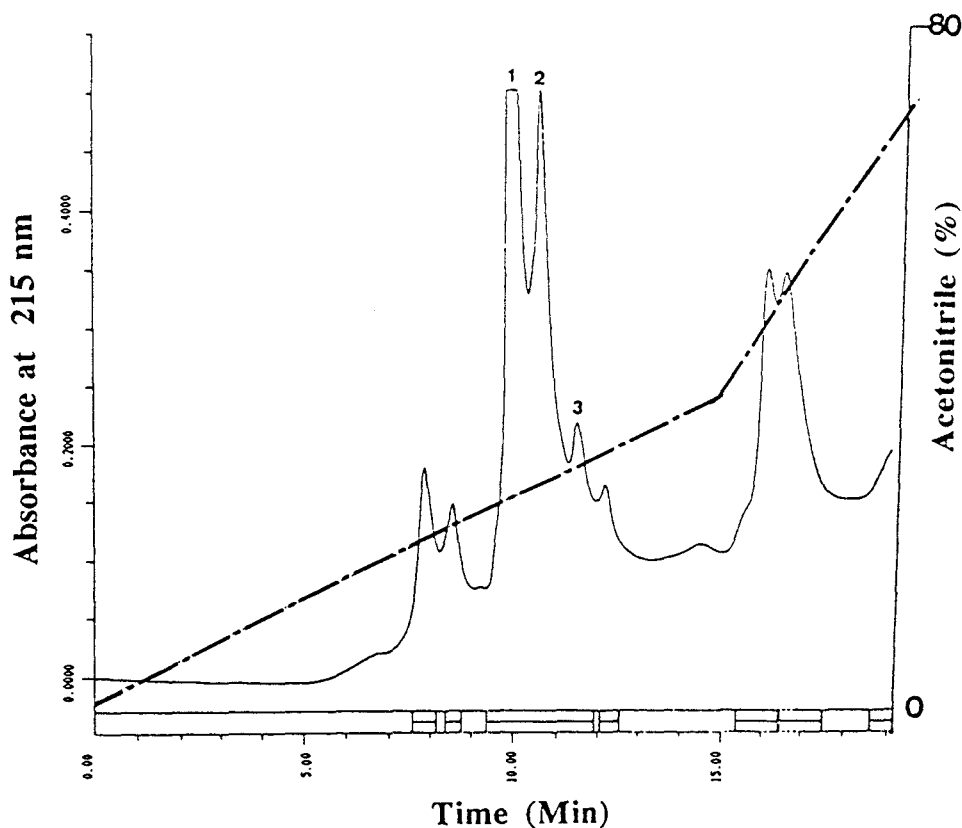


Fig. 1. Metabolism of synthetic [D-Ala₂, Leu₅]enkephalin by extracts of head parts from *T. tessulatum*. [D-Ala₂, Leu₅]enkephalin (10 μ M) was incubated at 37°C, pH 7.4, with leech extract (60 μ g protein/assay). The metabolites Tyr-D-Ala-Gly (1) and Phe-Leu (2) were resolved from [D-Ala₂, Leu₅]enkephalin (3) by HPLC with ultraviolet detection at 215 nm. The ultraviolet-absorbing peaks at 7.89 min and 16.2–16.7 min correspond to the NEP and the ACE-like enzymes, respectively; the other peaks are minor metabolites.

(a potent inhibitor of aminopeptidase) during the incubation, the dipeptide Phe-Leu was further hydrolyzed by an aminopeptidase present in the leech extract. Captopril (10 μ M), a potent inhibitor of peptidyl dipeptidase [8], partially inhibited (70%) the formation of Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu (Fig. 2). The residual activity was abolished by phosphoramidon (10 μ M), a selective inhibitor of endopeptidase-24.11 (Fig. 2). These observations suggest that the leech extract contained at least two peptidases. The first activity, which hydrolyzed [D-Ala₂, Leu₅]enkephalin and Bz-Gly-His-Leu substrate (data not shown), was sensitive to captopril and therefore resembles mammalian peptidyl peptidase. This enzyme has recently been isolated from leech extract. The second activity, which hydrolyzed [D-Ala₂, Leu₅]enkephalin (Fig. 1) but not Bz-Gly-His-Leu substrate (data not shown), was sensitive to phosphoramidon (Fig. 2) and therefore may resemble mammalian endopeptidase-24.11 according to Turner and Dowdall [16].

Isolation of the neuropeptide endopeptidase. After a Tris/NaCl extraction, filtered supernatants were subjected to gel-permeation chromatography on a FPLC system with a Superdex G-75 column. NEP was eluted at a retention time in the range 17–25 min (data not shown). Active fractions containing the NEP enzyme were purified by anion exchange on a FPLC Mono Q column using a 0.28–0.48 M linear gradient of NaCl for 15 min. Using these conditions, NEP eluted at 0.28–0.30 M NaCl (Fig. 3, lane a). Finally, fractions containing the enzyme were applied to a C₈ reverse-phase HPLC column with a discontinuous linear gradient of acetonitrile in acidified water. A single peak, with activity in NEP assays, was resolved at a retention time of 20.39 min (Fig. 3). The purity of the isolated enzyme

was checked by SDS/PAGE, which showed a single band at a molecular mass of approximately 45 kDa (Fig. 3, lane b). The molecular mass of this enzyme is smaller than the one found in mammalian kidney (94 kDa) [21]. In spite of these results, leech NEP possesses similarities to vertebrate NEP. Leech NEP is present in the supernatant after Tris/NaCl extraction, which suggests that this enzyme is anchored to the membranes of cells through a small hydrophobic domain. In vertebrates, this hydrophobic domain is near the N-terminus of the enzyme; the glycosylated hydrophobic extracellular domain contains the zinc-requiring active site [2].

Hydrolysis of [D-Ala₂, Leu₅]enkephalin by neuropeptide endopeptidase. At pH 7.4 in Tris/NaCl and at 37°C, purified NEP has a specific activity of 29 nmol Tyr-D-Ala-Gly \cdot min⁻¹ \cdot mg protein⁻¹ (K_m 95 μ M). The inhibition curve for phosphoramidon was generated by measuring the rate of formation of Tyr-D-Ala-Gly over a range of inhibitor concentrations (data not shown). Maximum inhibition, 80%, was obtained for 10 μ M phosphoramidon (IC_{50} = 0.1 μ M). This value is comparable to the activity observed (IC_{50} = 0.2 μ M) in the insect *Schistoceca gregaria* [12], but is higher than that found in mammals (IC_{50} = 2 nM) [1].

Incubation experiments conducted at 37°C show approximately 80% of NEP activity released after 15 min for an incubation at 37°C (Fig. 4). When incubations are conducted at 4°C, it appears that the rate (between 0–15 min) is approximately 10% the rate at 37°C. Nevertheless, this enzyme still stays active at this low temperature. These data could be explained by the fact that *T. tessulatum* is a leech that can live in cold water

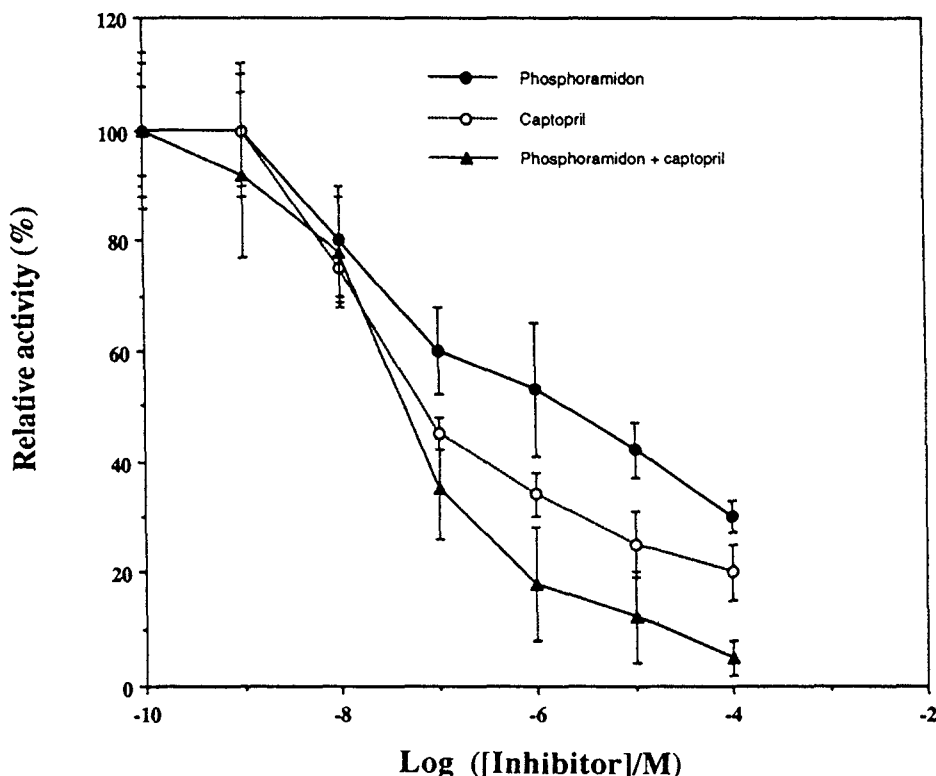


Fig. 2. Inhibition of the hydrolysis of [D-Ala₂, Leu₅]enkephalin by phosphoramidon and captopril. Inhibition of the cleavage of the Gly³-Phe⁴ bond of [D-Ala₂, Leu₅]enkephalin (10 μM) by different concentrations of phosphoramidon and captopril was determined. Peptidase activity was measured by quantifying the peptide product Tyr-D-Ala-Gly by HPLC. The effect of a mixture of phosphoramidon and captopril and peptidase activity was also investigated by keeping the concentration of the phosphoramidon constant at 10 μM while the concentration of captopril was varied (0.1 nM, 0.1 mM). Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

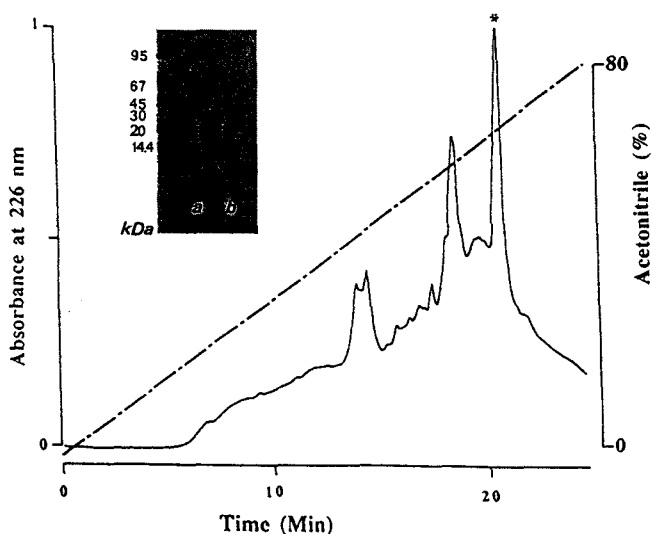


Fig. 3. Elution profile at the final step of purification of the neuropeptide endopeptidase on a C₈ reverse-phase column. The peak containing the purified enzyme is indicated (*). The insert represents the neuropeptide endopeptidase after anion exchange (lane a) and at the final step of purification (lane b) after SDS/PAGE; the gel was stained with silver.

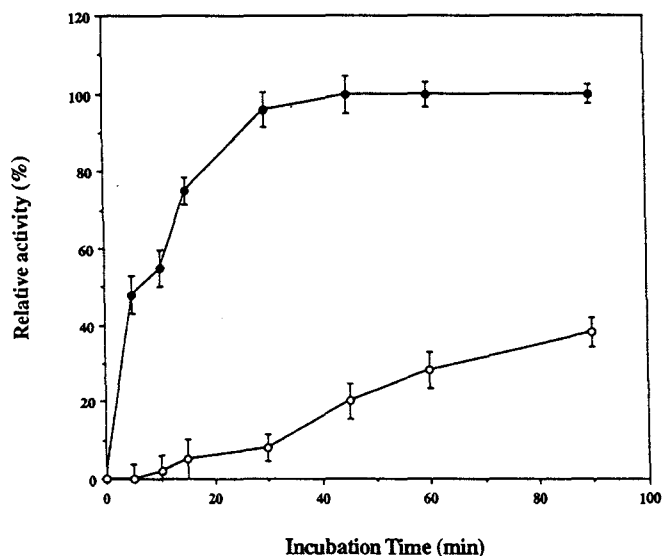


Fig. 4. Effect of the temperature on the neuropeptide endopeptidase activity. Neuropeptide endopeptidase was incubated separately at 37°C (●) and 4°C (○) in 20 mM Tris/HCl/0.2 M NaCl, pH 7.4. Samples were removed at time intervals and tested by HPLC. Results are expressed relative to the total activity. There was no loss of endopeptidase activity during the course of the experiment. Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

and that NEP is specialized to work under constantly cold temperatures.

These observations together show that the purified enzyme bears a close similarity to the mammalian endopeptidase-24.11 [16]. Such an enzyme has previously been isolated in the insect *Schistocerca gregaria* [12]. Moreover, in the hemolymph from

Astacus [11], *Limulus* [11], and *Mytilus* [9], endopeptidase activities were also detected. The activity values (nmol · min⁻¹ · mg protein⁻¹) of purified endopeptidases reported by the authors are comparable to those found in leeches. These findings establish

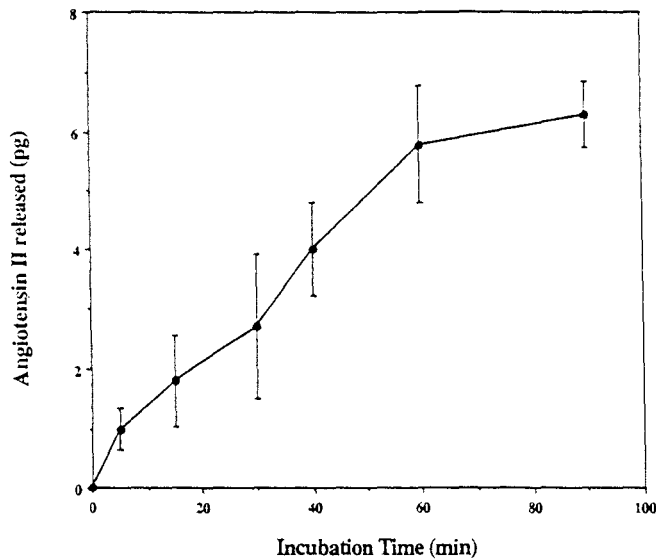


Fig. 5. Metabolism of synthetic angiotensin I by the neuropeptide endopeptidase from head parts of *T. tessulatum*. 10 μ l angiotensin (1 mg/ml) was incubated with the enzyme (0.1 μ g/assay) at 37°C, pH 7.4. The reactions were stopped by placing incubation vessels in ice-cold water before analysis by ELISA. Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

the important role that this enzyme plays in the degradation of enkephalins *in vivo* in invertebrates. This hypothesis is consistent with the presence in *T. tessulatum* brains of the dipeptides Phe-Met and Phe-Leu, the degradation products of enkephalins after hydrolysis by NEP [13]. Moreover, with respect to the data obtained for vertebrates, NEP could be capable of hydrolysing a variety of neuropeptides and peptide hormones such as angiotensins, substance P, bradykinin, oxytocin, and vasopressin [2].

Hydrolysis of angiotensin I by the neuropeptide endopeptidase. This NEP hydrolyses AI at the Phe⁸-His⁹ bond to yield AII and the dipeptide His-Leu with a specific activity of 1.23 nmol AII \cdot min⁻¹ \cdot mg protein⁻¹ (Fig. 5) with a K_m of 330 μ M. Moreover, based on data obtained in *T. tessulatum* brains [22], we could conclude that AII was then cleaved by NEP at the Tyr⁴-Ile⁵ bond yielding fragments 1-4 and 5-8 of AII. Comparison between specific activities of NEP towards AI and [D-Ala², Leu⁵]enkephalin indicates that this enzyme preferentially metabolises enkephalins rather than angiotensins. The K_m values for AI and [D-Ala², Leu⁵]enkephalin are in agreement with the values obtained with pig NEP towards bradykinin (92 μ M) and substance P (32 μ M) [23]. In vertebrates, endopeptidases have a preference for peptide bonds involving the amino function of hydrophobic residues (e.g. Phe, Leu, Trp, Tyr) and in particular phenylalanine [12]. Neuropeptides isolated to date from leeches that could be NEP substrates include the following: angiotensin I [24], angiotensin II-amide [25], RF-amides [26], enkephalins [13], γ -MSH-like peptide [27], and lysine-conopressin [18]. Whether the phosphoramidon-sensitive endopeptidase is involved in the metabolism of these various leech neuropeptides remains to be established. However, the presence of degradation products of enkephalins [13] and angiotensins [22] is consistent with this hypothesis.

CONCLUSION

Extracts of head parts of *T. tessulatum* contain a neuropeptide-degrading endopeptidase resembling mammalian endopeptidase-24.11, except for its molecular mass which is smaller [28].

In vertebrates, endopeptidase-24.11 was until a few years ago thought to be located exclusively in kidney microvilli, which is reflected in its official enzyme classification as kidney brush border neutral proteinase [1]. However, this enzyme is also located in membrane fractions from various tissues, including brain [1, 29]. This phosphoramidon-sensitive endopeptidase is implicated in neurotransmitter exocytosis [29], the physiological inactivation of enkephalins and substances P [1, 5], and is believed to be present at mammalian neuromuscular junctions. In brains of leeches, such peptides are present and we suggest that the leech endopeptidase-24.11-like enzyme, in conjunction with other(s) peptidase(s) like ACE or aminopeptidase, is implicated in the physiological regulation of leech neuropeptides.

REFERENCES

- Kenny, A. J. & Ingram, J. (1987) Proteins of the kidney microvillar membrane. *Biochem. J.* 245, 515-524.
- Erdős, E. G. & Skidgel, R. A. (1989) Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J.* 3, 145-151.
- Price, J. S., Kenny, A. J., Huskisson, N. S. & Brown, M. J. (1991) Neuropeptide Y (NPY) metabolism by endopeptidase-2 hinders characterization of NPY receptors in rat kidney. *Br. J. Pharmacol.* 104, 321-326.
- Choudry, Y. & Kenny, A. J. (1991) Hydrolysis of transforming growth factor- α by cell surface peptidases *in vitro*. *Biochem. J.* 280, 57-60.
- Schwartz, J.-C., Malfroy, B. & De La Baume, S. (1981) Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase ('enkephalinase') as neuropeptidase. *Life Sci.* 29, 1715-1740.
- Matsas, R., Kenny, A. J. & Turner, A. J. (1984) The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues by endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* 223, 433-440.
- Shipp, M. A., Stefano, G. B., D'Adamio, L., Switzer, S. N., Howard, F. D., Sinisterra, J., Scharrer, B. & Reinherz, E. (1990) Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase. *Nature* 247, 394-396.
- Rubin, B., Laffan, R. J., Kotler, D. J., O'Keefe, E. H., De Maio, D. A. & Goldberg, M. E. (1978) SQ 14, 225 (D-3-mercapto-2-methylpropanoyl-L-proline), a novel orally active inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 204, 271-282.
- Leung, M. K., Le, S., Houston, S. & Stefano, G. B. (1992) Degradation of met-enkephalin by hemolymph peptidases in *Mytilus edulis*. *Cell. Mol. Neurobiol.* 5, 367-378.
- Coletti-Previero, M.-A., Matras, H., Zwilling, R. & Previero, A. (1985) Enkephalin-degrading activity in arthropod hemolymph. *Neuropeptides* 6, 405-415.
- Lamango, N. S. & Isaac, R. E. (1994) Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly *Musca domestica*, that resembles mammalian angiotensin-converting enzyme. *Biochem. J.* 299, 651-657.
- Isaac, R. E. (1988) Neuropeptide degrading endopeptidase activity of locust, *Schistocerca gregaria*, synaptic membranes. *Biochem. J.* 255, 843-847.
- Salzet, M., Bulet, P., Verger-Bocquet, M. & Malecha, J. (1995) Isolation and structural characterization of enkephalin-related peptides in the brain of the Rhyncobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *FEBS Lett.* 357, 187-191.
- Malecha, J., Verger-Bocquet, M. & Tramu, G. (1989) Mise en évidence et évolution, au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motiline procine dans le ganglion supracéphalique de la sangsue *Theromyzon tessulatum*. *Can. J. Zool.* 67, 636-640.
- Davis, T. P. (1990) Methods of measuring neuropeptides and their metabolism. in *the roles of neuropeptides in stress pathogenesis*

- and systemic disease (Kaufman, J., McCubbin, A. & Nemeroff, C. B., eds) pp. 147–177, Academic Press, Inc., Orlando, FL.
16. Turner, A. J. & Dowdall, M. J. (1984) The metabolism of neuropeptides. Both phosphoramidon-sensitive and captopril-sensitive metallopeptidases are present in the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Biochem. J.* 222, 255–259.
 17. Salzet, M., Watez, C., Slomianny, M. C., Léü, B. & Siegert, K. J. (1992) ELISA for oxytocin. Highly sensitive tests for the titration of an oxytocin-like substance in the leech *Erpobdella octoculata*. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol.* 102, 483–487.
 18. Salzet, M., Bulet, P., Van Dorsselaer, A. & Malecha, J. (1993) Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. *Eur. J. Biochem.* 217, 897–903.
 19. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
 20. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
 21. Spencer-Dene, B., Thorogood, P., Nair, S., Kenny, A. J., Harris, M. & Henderson, B. (1994) Distribution of, and a putative role for, the cell-surface neutral metalloendopeptidases during mammalian craniofacial development. *Development* 120, 3213–3226.
 22. Salzet, M., Watez, C., Baert, J.-L. & Malecha, J. (1993) Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *Brain Res.* 631, 247–255.
 23. Stephenson, S. L. & Kenny, J. A. (1987) Metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes. *Biochem. J.* 241, 237–247.
 24. Laurent, V., Bulet, P. & Salzet, M. (1995) A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin I-like molecule with forms of vertebrate angiotensinogens: an hormonal system conserved in the course of evolution. *Neurosci. Lett.* 190, 1–4.
 25. Salzet, M., Bulet, P., Watez, C., Verger-Bocquet, M. & Malecha, J. (1995) Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*. Angiotensin II amide. *J. Biol. Chem.* 270, 1575–1582.
 26. Salzet, M., Bulet, P., Watez, C. & Malecha, J. (1994) FMRFamide-related peptides in the sex segmental ganglia of the Pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. Identification and involvement in the control of hydric balance. *Eur. J. Biochem.* 221, 269–275.
 27. Salzet, M., Watez, C., Bulet, P. & Malecha, J. (1994) Isolation and structural characterization of a novel peptide related to γ -melanocyte stimulating hormone from the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*. *FEBS Lett.* 348, 102–106.
 28. Littlewood, G. M., Iversen, L. L. & Turner, A. J. (1988) Neuropeptides and their peptidases: functional considerations. *Neurochem. Int.* 12, 383–389.
 29. De la Baume, S., Gros, C., Yi, C. C., Chaillet, P., Marçais-Collado, H., Costentin, J. & Schwarz, J. C. (1982) Selective participation of both 'enkephalinase' and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Life Sci.* 31, 1753–1756.

Metabolism of enkephalins in head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum* by peptidases: isolation of an enkephalin-degrading aminopeptidase

Virginie Laurent, Michel Salzet *

Laboratoire de Phylogénie Moléculaire des Annélides, Centre National de la Recherche Scientifique ER 87 CNRS, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudiniées, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59635 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Received 15 December 1995; revised 5 April 1996; accepted 5 April 1996

Abstract

Metabolism of leucine and methionine enkephalins by enzyme preparations from head parts of the leech *Theromyzon tessulatum* was investigated. Leech homogenate degraded enkephalins by cleavage of the Tyr¹-Gly² and Gly³-Phe⁴ bonds. The Tyr¹-Gly²-Gly³ was detected as a major metabolite when amastatin (aminopeptidase inhibitor) was present to prevent Tyr¹-Gly² breakdown. Around 50% of enkephalin-degrading activity was isolated in a 20 000 × g membrane fraction and was shown to be almost entirely due to an aminopeptidase activity. This enzyme, a homodimer of approx. 70 kDa, has been purified to homogeneity by a combined approach including gel permeation and anion exchange chromatographies followed by reversed-phase HPLC. This enkephalin-degrading aminopeptidase is a typical integral membrane 'zincin' metalloprotein with an apparent k_m of 30 μM, a specific activity of 12 nmol GGFM min⁻¹ mg protein⁻¹ and a catalytic efficiency (k_{cat}/k_m) of 46×10^6 mol⁻¹ min⁻¹. This enzyme is specifically inhibited by amastatin (IC₅₀ = 0.5 μM), but not by bestatin and actinonin. In leech membranes, the other degrading activities performed at the same time were due to a neuropeptide-endorpeptidase (NEP)-like enzyme attack, inhibited by phosphoramidon (IC₅₀ = 0.1 μM) and in the case of the Met-enkephalin by a combined action of an angiotensin-converting-like enzyme, inhibited by captopril (IC₅₀ = 0.2 μM) and the NEP-like enzyme. These two enzymes were previously isolated from head membranes of *T. tessulatum* and possess towards Met-enkephalin a catalytic efficiency (k_{cat}/k_m) of, respectively, 12×10^6 mol⁻¹ min⁻¹ and 78×10^6 mol⁻¹ min⁻¹. These findings constitute the first report in leeches on the nature and the sites of attack of the membrane peptidases involved in the metabolism of enkephalins and also the first biochemical evidence for a novel member of the aminopeptidase family.

Keywords: Enkephalin-degrading aminopeptidase; Enkephalin; Leech; Dipeptidylcarboxypeptidase; Metabolism

1. Introduction

Met-enkephalin (Met-Enk) and Leu-enkephalin (Leu-Enk) are both pentapeptides which differ only in the last

amino acid residue. The last amino acid is methionine for Met-Enk and leucine for Leu-Enk. Investigations in vertebrates on the enzymatic metabolism of both enkephalins have revealed that they are subjected to four different modes of degradation. The 4 types of degradation activities detected are aminopeptidase, carboxypeptidase, dipeptidylaminopeptidase and dipeptidylcarboxypeptidase implicating the neutral endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) and the angiotensin-converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) [1–8]. These enzymes that play a major role in enkephalin metabolism are dependent upon the tissue region examined, e.g., central nervous system [3,5,9], plasma [6] and kidney [1].

In Invertebrates, such peptidases (NEP, ACE) have been identified in hemolymph of the mollusc *Mytilus edulis* [10] and the arthropod *Carcinus maenas* [11] and in

Abbreviations: EAP, enkephalin-degrading aminopeptidase; EHA, enkephalin hydrolysis assay; ACE, angiotensin-converting enzyme; AI, angiotensin I; Bz, Benzoyl; CMPSA, *p*-chloromercuriphenylsulfonic acid; DIA, dot immunobinding assay; FPLC, fast protein liquid chromatography; HPLC, high performance liquid chromatography; NEP, neuropeptide endopeptidase; Met-Enk, methionine-enkephalin; Leu-Enk, leucine-enkephalin; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; TBS, Tris-HCl buffer saline; *Enzymes*:; angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1); neuropeptide endopeptidase (EC 3.4.24.11); neutral aminopeptidase (EC 3.4.11.2)

* Corresponding author. Tel.: (33) 2043-4054; Fax: (33) 2091-9039.

the nervous tissues of the insect *Schistocerca gregaria* [12]. Moreover, a neutral aminopeptidase implicated in degradation of proctolin, substance P, FMRF-amide and bradykinin has been demonstrated in *S. gregaria* [12]. In addition, enkephalin-degrading aminopeptidase(s) were detected in hemolymph of the mollusc *M. edulis* [10], the crayfish *Astacus fluviatilis* and the horse shoe crab *Limulus polyphemus* [11]. In the leech, *Theromyzon tessulatum*, a NEP-like enzyme [13] and an ACE-like enzyme [14] have been isolated from head membranes. Both enzymes hydrolyze the Gly³-Phe⁴ bond of the synthetic [D-Ala², Leu⁵]enkephalin and are implicated in the physiological inactivation of this opioid peptide [13,14] and several leech C-terminally amidated or not neuropeptides [13,14]. The two enzymes can be distinguished by their sensitivity to different inhibitors. They are both phosphoramidon-sensitive [13,14]. However, ACE-like enzyme was not totally inhibited by phosphoramidon (only 40%). By contrast, captopril completely inactivates this enzyme [14]. Existence of these peptidases was confirmed by the isolation, in parallel to purification of enkephalins from brains of the leech *T. tessulatum*, of the two dipeptides Phe-Met and Phe-Leu [15], reflecting a cleavage at the Gly³-Phe⁴ bond of enkephalins. In addition, these enzymes are known to be also involved in vertebrates in metabolism of other neuropeptides, such as angiotensins. In leeches, peptides of this family have been sequenced [16,17] and a fragment of the angiotensin II-like precursor has been characterized [18]. This precursor presents in its sequence the two processing sites of renin [19] and ACE [18], respectively.

In the present paper, we investigate the metabolism of enkephalins in leech head membranes. We determine the nature and the attack sites of the peptidases present in the leech membranes. Finally, we isolate a novel enkephalin-degrading aminopeptidase.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Mature specimens of the rhynchobdellid leech *T. tessulatum*, reared under laboratory conditions as described by Malecha et al. [20] were used in this study.

2.2. Materials

Met-enkephalin (YGGFM), Leu-enkephalin (YGGFL), [D-Ala², Leu⁵]enkephalin, YGG, FM, FL, GGFM, GGFL, Y-D-Ala-G, peptides, amino acid residues (phenylalanine, F; leucine, L; methionine, M), amastatin, bestatin, actinonin, captopril, phosphoramidon were obtained from Sigma. Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and *p*-chloro-mercuriphenylsulfonic acid (CMPSA) were purchased from Fluka.

2.3. Antisera

Polyclonal antisera directed against methionine-enkephalin (a-Met-Enk) or against leucine-enkephalin (a-Leu-Enk) raised in rabbits, kindly provided by Dr. G. Tramu (Laboratoire de Neurocytochimie Fonctionnelle, Université de Bordeaux I, Talence, France), were used in immunobinding assays. Their specificities were previously described elsewhere [15]. In short, the a-Leu-Enk did not cross-react with Met-Enk, and the a-Met-Enk showed a cross reactivity of 0.4% with Leu-Enk.

2.4. Immunoassays

Dot immunobinding assay (DIA) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were based on the protocols of Salzet et al. [21,22].

2.5. Identification of cleavage sites

Assays of peptidase activities were carried out with 5 µg of membranes incubated or not with 15 µM peptides and 10 µM inhibitors in TBS with a final volume of 100 µl. Metabolism was terminated by the addition of 30% trifluoroacetic acid (v/v). Samples were spun at 15 000 g for 15 min. Supernatants were diluted by adding 100 µl of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and degraded fragments were analyzed on a C₁₈ (250 × 2 mm, Beckman) HPLC column, with a acetonitrile linear gradient in acidified water (0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 60% in 20 min at a flow rate of 300 µl/min. The column effluent was monitored by absorbance at both 215 and 254 nm. The 254 nm wavelength is particularly well suited for our assay since it is able to detect peptide bond as well as the aromatic amino acids, Y and F. Under the described conditions, enkephalins and most of their major degradation products are separated from each other. All emerging peaks were collected manually before drying in vacuum.

2.6. Identification of the enkephalin-metabolized products

Four successive steps were performed to identify the metabolized products: (a) coelution with peptides markers in reversed-phase HPLC [23]; (b) comparison of spectral scanning between the yielded product and the corresponding peptide marker [17]; (c) cross-reaction with specific antisera in immunoassays (DIA and/or ELISA) [15]; and (d) microsequencing on a pulse liquid automatic sequentator (Applied Biosystems, model 473A). Molar ratio of the metabolized products was calculated from data given by Davis [24] on the quantification of peptides by HPLC.

2.7. Inhibitor experiments

Phosphoramidon, captopril, bestatin, actinonin and amastatin were used at a final concentration of 10 µM and

were preincubated for 30 min at 37°C with membranes before addition of 10 μ l of the peptide solution. These inhibitors are, respectively, specific to the NEP [8], the ACE [25] and the neutral aminopeptidase [26,27].

2.8. Enkephalin-degrading aminopeptidase detection

2.8.1. Enkephalin hydrolysis assay (EHA)

This assay was performed on fractions obtained after gel permeation chromatography by DIA and ELISA of Leu-Enk generated *in vitro* in the following incubation system: 200 μ l sample, 100 μ l TBS containing 4 mM 2,3-dimercaptopropanol, 3.2 mM 8-hydroxyquinoline sulfate and 10 μ M Leu-Enk and 10 μ M phosphoramidon (incubated for 90 min at 37°C). The reaction was stopped by placing incubation vessels in ice-cold water. Blanks were prepared for each sample with the same procedure without Leu-Enk. Negative controls were prepared by incubating each sample with EDTA 1 mM (10 min at 37°C) before adding Leu-Enk. Leu-Enk was cleaved at the Tyr¹-Gly² bond yielding the Y amino acid residue and the GGFL peptide. Based on the specificity of the antiserum [28], the lack of the Tyr at the N-terminal position provoked a loss of the recognition of approx. 50% by the antiserum. A comparison between a standard curve and fraction tested in presence or not of 10 μ M amastatin suggests the presence of an aminopeptidase or not, before being checked in HPLC.

2.8.2. Determination of kinetics of degradation

Kinetic parameters were determined from the regression line fitted to the data plotted as $1/V$ vs. $1/[S]$. Correlation coefficients were greater than 0.99 [29]. Values for k_{cat} were calculated assuming a molecular weight of 70, 120 and 45 kDa for the EAP (this paper), the ACE-like enzyme [14] and the NEP-like enzyme [13].

2.9. Enzyme purification

2.9.1. Membrane preparation

After anesthesia of the animals in 0.01% chlorotone, head parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. 500 head parts were placed in 25 ml (1 g/5 ml) (TBS) 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), containing 200 mM NaCl and homogenized at 4°C with a polytron (5 \times 15 s bursts on setting 9). After 30 min centrifugation at 6000 \times g, the pellet was re-extracted 6-fold with the same amount of saline solution. The combined supernatants were centrifuged at 20000 \times g for 1 h at 4°C to yield a membrane preparation. These membranes were washed by resuspension in TBS, followed by sedimentation at 20000 \times g. The washing procedure was repeated until a clear supernatant was obtained. The washed membranes were resuspended in TBS and stored at -20°C. The procedure used in this study was

performed according to Turner and Barnes [8]. Protein concentration was determined with the Bradford procedure [30] using γ -globulin as standard.

2.9.2. Treatment of leech head membranes with EDTA

Membranes were incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), containing 5 mM EDTA for 30 min at 37°C and recovered by centrifugation at 15000 \times g at 4°C for 15 min. The membrane pellet was rinsed with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and resuspended in the same buffer without EDTA.

2.9.3. Phase separation of membrane proteins with Triton X-114

Membranes (30 mg of protein) were mixed in TBS containing 0.5% (w/v) Triton X-114 and kept on ice for 30 min with occasional shaking. Detergent-insoluble material was removed by centrifugation at 20000 \times g for 1 h at 4°C. After incubation at 20°C during 15 min to induce the phase separation of Triton X-114, samples were immediately centrifuged at 6000 \times g. The supernatant was collected and the detergent layer resuspended in an equal volume of TBS. Both detergent-rich and detergent-poor fractions were assayed in EHA.

2.9.4. Purification procedure

Step I, Gel permeation chromatography. The rich-fraction was applied onto a column of Superdex G-75 (16/60, Pharmacia), pre-equilibrated with TBS containing 0.5% (w/v) Triton X-100 at a flow rate of 1 ml/min and eluted with the same buffer. The column effluent was monitored by absorbance at 280 nm. All column fractions were assayed for EAP activity.

Step II, Chromatography on Mono Q. Pool of active fractions were loaded onto a Mono Q column (HR 5/5, Pharmacia), equilibrated in TBS containing 0.5% (w/v) Triton X-100. The column was washed with the same buffer and eluted with a discontinuous linear gradient of NaCl at 0.28 M during 2 min then over 0.28–0.48 M for 15 min and finally at 0.5 M during 2 min at a flow rate of 1 ml/min.

Step III, Reversed-phase HPLC. Active fractions from the MonoQ were separated on a C₃ Ultrapore column (75 \times 4.6 mm, Beckman), equilibrated in water. Elution was performed with a discontinuous linear gradient of acetonitrile/water over 0–50% for 15 min and over 50–80% for 5 min at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored by absorbance at 226 nm. The acetonitrile was quickly removed from the eluted fractions by freeze drying using a vacuum centrifuge (Savant). Fractions were adjusted to pH 7.4 by adding TBS and presence of an EAP was detected by EHA.

All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a photodiode array detector Beckman 168.

2.9.5. Electrophoresis

Electrophoresis analysis of the proteins was performed in 10–25% SDS-polyacrylamide gradient gels as described by Laemmli [31].

3. Results and discussion

3.1. Hydrolysis of enkephalins by *T. tessulatum* membrane peptidases

Significant hydrolysis of [D-Ala², Leu⁵]enkephalin occurred only at the Gly³-Phe⁴ bond, producing the products Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu (Table 1). By contrast, Leu-Enk or Met-Enk were metabolized at two bonds, the Tyr¹-Gly² and Gly³-Phe⁴ bonds, yielding in the case of Met-Enk, the YGG, FM, GGFM peptides and for Leu-Enk, the YGG, FL, GGFL peptides. In the absence of amastatin (a potent inhibitor of aminopeptidase [26]) during the incubation, the dipeptides FM and FL were further hydrolyzed in amino acid residues F, L or F, M. Captopril (10 μM), a potent inhibitor of the peptidyl dipeptidase [25], partially inhibited (50%) the formation of Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu, when Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu was used as substrate. By contrast, this activity was abolished at 70% by phosphoramidon (10 μM), selective inhibitor of endopeptidase-24.11 [8]. These observations suggest that the leech extract contained several peptidases acting at the Tyr¹-Gly² and Gly³-Phe⁴ bonds of enkephalins.

In the case of Met-Enk and Leu-Enk, the primary attack at the Tyr¹-Gly² bond was almost completely inhibited by amastatin (10 μM), reflecting an enkephalin-degrading aminopeptidase activity. By contrast the first activity, which hydrolyzed synthetic [D-Ala², Leu⁵]enkephalin and Bz-Gly-His-Leu substrate, was sensitive to captopril (IC₅₀ = 0.2 μM) and therefore resembles mammalian ACE. This enzyme has recently been isolated from leech [14]. The second activity, which hydrolyzed [D-Ala², Leu⁵]enkephalin, but not Bz-Gly-His-Leu substrate, was sensitive to phosphoramidon (IC₅₀ = 0.3 μM) and therefore may resemble the NEP-like enzyme previously isolated in *T. tessulatum* [13].

3.2. Time-course degradation

In order to know when each enzyme attacks in leech membranes, enkephalins were incubated with membranes and supernatants were removed at time intervals (Table 2). YGG, F(L, M), GGF(L, M) and Y were detected at a high level 20 min after incubation, reflecting a combined attack of EAP and NEP-like enzyme occurring at the Tyr¹-Gly² and Gly³-Phe⁴ bonds. In the case of the Met-Enk, the attack at the Gly³-Phe⁴ bond was mainly the result of both NEP-like and ACE-like actions. By contrast, this attack on Leu-Enk and [D-Ala², Leu⁵]Enk substrates is only directed by the NEP-like action.

In mollusc and arthropods membranes, about 30% of the Met-Enk is degraded after 40 min incubation period vs.

Table 1
Effect of inhibitors on the hydrolysis of enkephalins by *T. tessulatum* head membranes

Peptide	Retention time (min)	Product formed in the absence of inhibitor (nmol)	Peptide remaining (%)		
			Phosphoramidon (10 μM)	Captopril (10 μM)	Amastatin (10 μM)
Leu-enkephalin					
L	1.3	1.5	100	100	13
F	2.9	1.3	100	100	12
Y	3.4	1.5	100	100	10
FL	3.8	0.9	28	60	100
YGG	8.9	3.5	32	58	100
GGFL	9.6	3.4	100	100	8
Met-enkephalin					
M	1.8	1.6	100	100	8
F	2.8	1.5	100	100	12
Y	3.6	1.9	100	100	15
FM	4.2	0.8	25	55	100
YGG	9.1	3.3	32	59	100
GGFM	9.9	3.6	100	100	11
[D-Ala², Leu⁵]enkephalin					
L	1.1	1.6	100	100	12
F	2.7	1.6	100	100	15
FL	3.8	0.9	15	58	100
Y-D-Ala-G	9.0	2.8	18	60	100
BZ-Gly-His-Leu					
HL	4.4	4.5	95	3	100
Bz-Gly	7.6	4.2	98	8	100

See Materials and methods for details. The amount of each product formed in the absence of inhibitors is given in nmol/h. The effect of each inhibitor on the yield of the products is expressed as a percentage of this value. The data are based on two experiments.

Table 2
Time values of enkephalins incubated with *T. tessulatum* head membranes

Peptide	Incubation time (min)						
	0	5	15	20	30	45	60
Leu-enkephalin	12	10.8	10.4	6.6	4.5	1.5	
L					0.2	0.8	1.5
F					0.3	1.1	1.3
Y			0.2	1.2	1.2	1.1	1.5
FL			0.1	0.9	1.5	0.9	0.5
YGG			0.1	1.3	1.9	2.1	2.8
GGFL			0.2	0.7	0.9	1.9	3.4
Met-enkephalin	12	10.5	10.1	6.5	4.5	1.0	
M					0.2	1.2	1.6
F					0.1	1.0	1.5
Y		0.05	0.1	0.9	1.6	1.8	1.9
FM			0.1	0.9	1.4	0.9	0.8
YGG			0.1	1.4	1.6	1.8	2.7
GGFM		0.05	0.1	1.3	1.5	2.2	2.6
[D-Ala ² , Leu ⁵]enkephalin	12	10.3	8.4	7.0	5.1	4.0	
L				0.2	0.7	1.5	1.6
F				0.3	1.1	1.1	1.6
FL		0.05	1.2	1.5	1.1	0.9	0.7
Y[D-Ala]G		0.1	1.4	1.8	2.1	2.5	2.8

See Materials and methods for details. The incubations contained, in a final volume of 100 μ l, the peptide and the membranes. Samples were incubated at 37°C for 0, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min. The amount of each product formed is given in nmol.

20 min in leeches with 50% of enkephalin degradation [10,11]. These data could indicate that the enzymes implicated in enkephalins metabolism are more efficient in leeches than in *Mytilus*, *Astacus* and *Limulus*. However, the enzymes implicated in such a phenomenon are different. In arthropods, the fastest-rising degradation fragment is YGGF from the action of a carboxypeptidase, while the GGFM fragment from action of an aminopeptidase is increasing at a comparatively slower rate [11]. In leeches and molluscs, no traces of YGGF were detected suggesting that its activity is almost masked by EAP and NEP-like enzyme attacks.

3.3. Isolation of the enkephalin-degrading enzyme

Purification steps are shown in Table 3.

Table 3
Purification of the enkephalin-degrading aminopeptidase from head membranes of the leech *T. tessulatum*

Step	Column material	Elution conditions	Specific activity (nmol GGFM/min per mg protein)	Yield (%)
1. Protein solubilization	Triton X-114 treatment	Detergent-rich fractions	1.5	100
2. Gel permeation (FPLC)	Superdex G-75 (16/60, Pharmacia)	Tris-HCl 20 mM/NaCl 200 mM (pH 8.4)	3.0	80
3. Anion exchange (FPLC)	Mono Q (HR 5/5, Pharmacia)	NaCl 0.2-0.9 (60 min) in Tris-HCl 20 mM (pH 8.4)	6.2	67
4. Reversed-phase (HPLC)	Ultrapore C ₃ (4.6 \times 75 mm, Beckman)	0-50% ACN (15 min) 50-80% ACN (5 min)	9.7	54

Experimental details are indicated in Materials and methods. FPLC, fast protein liquid chromatography; ACN, acetonitrile.

3.3.1. Phase separation of leech EAP into Triton X-114

The leech head membranes used throughout this study were washed repeatedly with ice-cold TBS, pH 7.4, to remove peripheral membrane proteins and to ensure, as far as possible, that studied EAP was an integral membrane protein. Eighty percent of the total activity was found into the detergent-rich phase, suggesting that leech EAP is a typical integral membrane protein like rat or human brain neutral aminopeptidases [26,27,32,33,35]. These enzymes are anchored in the membrane by their N-terminal side [26,27,32,33,35].

3.3.2. Purification of EAP

For its purification, EAP was solubilized by incubating leech membranes with Triton X-100, and the resulting preparation was loaded on a Superdex G-75 column. Elution of the leech enzyme activity was monitored and compared with the chromatography in the same conditions of the NEP-like enzyme (45 kDa) [13] and the ACE-like enzyme (120 kDa) [14]. Fractions eluted from the column were tested by EHA. The EAP elutes from the column at a retention time of 5.5-6 min corresponding to a molecular mass of 65-97 kDa (Fig. 1a). Proteins contained in this zone were separated by anion exchange chromatography on a FPLC Mono Q column using a discontinuous linear gradient of NaCl. In these conditions, the active enzyme detected in EHA eluted at 0.28 M NaCl (Fig. 1b). Control in SDS-PAGE indicated the presence of two proteins with a molecular mass of respectively approx. 35 and 38 kDa (Fig. 1c, lane a). Finally, the active fractions were applied to a C₃ reversed-phase HPLC column with a discontinuous linear gradient of acetonitrile/water. Two peaks were resolved; however, a single active protein in EHA at a retention time of 27 min was detected (Fig. 1c). Control of purity of the isolated enzyme was performed on SDS-PAGE in reducing conditions showing a single band at a molecular mass of approx. 35 kDa (Fig. 1c, lane b) and at approx. 70 kDa in non-denaturant electrophoresis (Fig. 1c, lane c), suggesting that the EAP is an homodimer of approx. 70 kDa with two monomers of 35 kDa (Fig. 1c). This molecular mass of 70 kDa is close to the aminopeptidase (80-90 kDa) isolated in arthropods [11], but inferior to the neutral

aminopeptidase (EC 3.4.11.2), a glycosylated dimer of 280 kDa [27,28,33,35]; nevertheless, EAP is also dimeric.

3.4. Biochemical characterization of the enkephalin-degrading aminopeptidase

At a optimum pH of 7.4 in TBS and at 37°C, EAP present in head membranes possesses a specific activity of

12 nmol GGFM/min per mg protein. Inhibition curves for amastatin, bestatin and actinonin (selective inhibitors for aminopeptidases) were generated by measuring the rate of formation of GGFM over a range of inhibitors concentrations (Fig. 2). Cleavage at the Tyr¹-Gly² bond was strongly inhibited by amastatin ($IC_{50} = 0.5 \mu\text{M}$), but was less sensitive to bestatin and actinonin. PMSF (1 mM) and

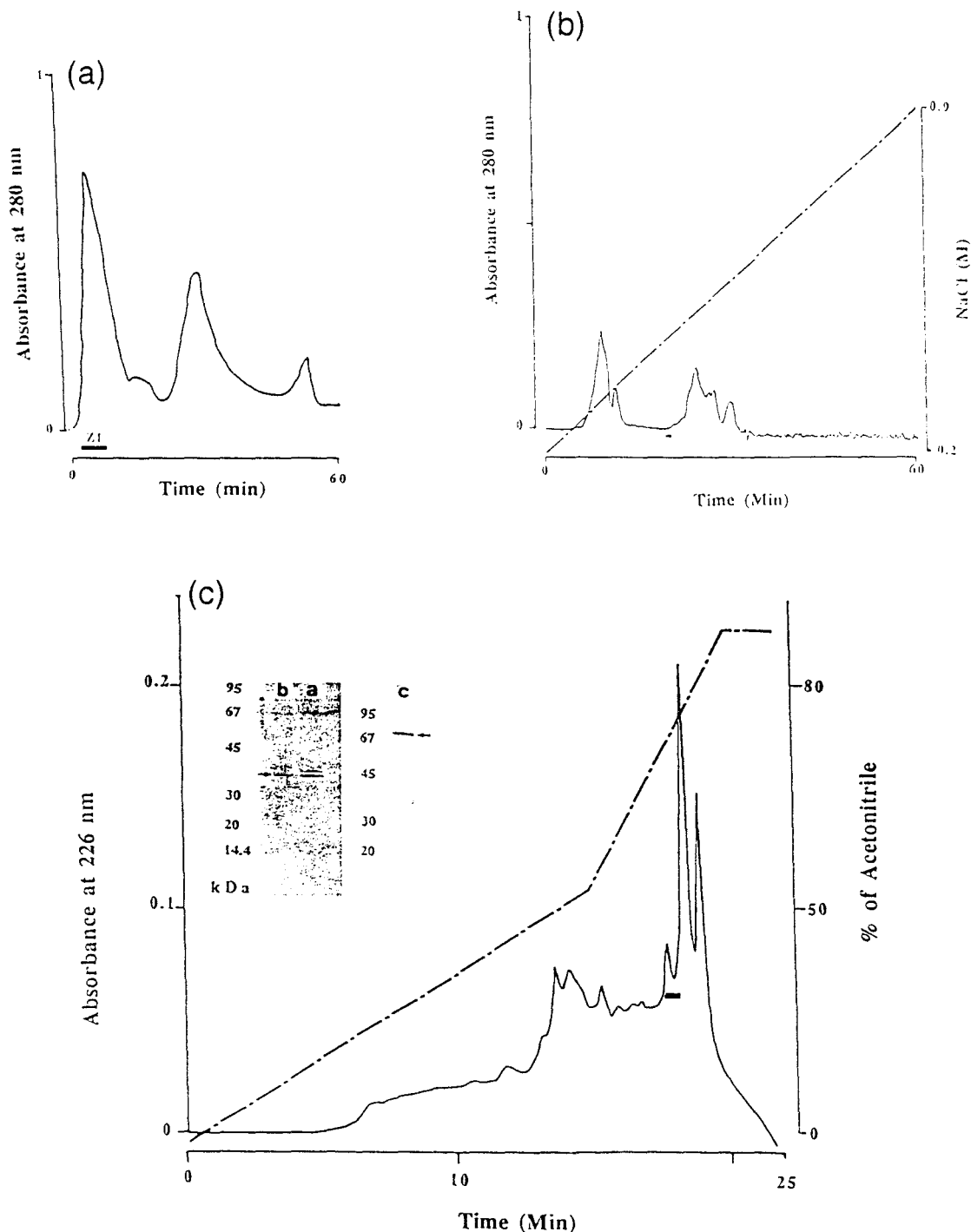


Fig. 1. Elution profiles of the EAP following purification steps. (a) Elution profile on Superdex G-75 column. (b) Elution profile on MonoQ column. (c) Final step of purification on C₃ reversed-phase column. The solid bars indicate the fractions containing the EAP. Inset photographs represent the fractions containing the EAP separated by SDS-PAGE in reducing conditions: (a) after MonoQ column separation; (b) at the final step of purification; and (c) at the final step of purification in non-denaturing electrophoresis.

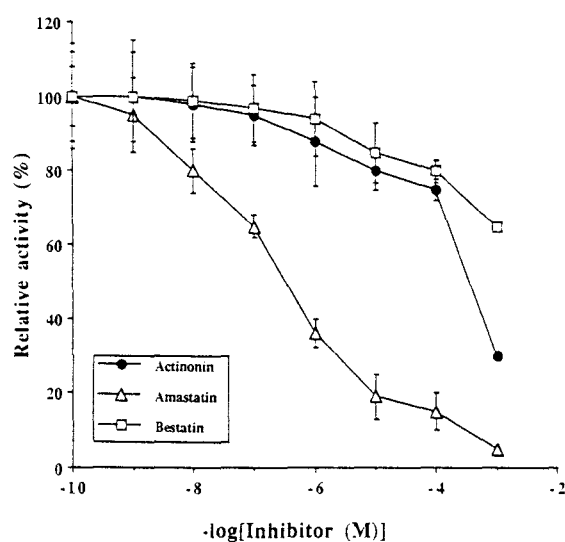


Fig. 2. Inhibition of the hydrolysis of methionine-enkephalin by aminopeptidase inhibitors. Inhibition of the cleavage of the Tyr¹-Gly² bond of Met-Enk (10 μ M) by different concentrations of aminopeptidase inhibitors (amastatin, bestatin, actinonin) was determined in the presence of 10 μ M phosphoramidon and 10 μ M captopril. Peptidase activity was measured by quantifying the peptide product Gly-Gly-Phe-Met by HPLC. Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

CMPSA (1 mM) had no effect, but presence of EDTA (1 mM) resulted in 90% inhibition. The ability of bivalent metal ions to recover enzyme activity in EHA was tested by incubating EDTA-treated membranes, which had been washed to remove excess EDTA, in the presence of different metal ions (Table 4). The addition of Zn²⁺ (100 μ M) resulted in a massive activation (300% activation relative to the activity of untreated membranes) of the EDTA-treated enzyme. No other bivalent ions gave a similar level of stimulation, although Co²⁺ and Mn²⁺ did recover part (30 and 25%, respectively) of the activity lost on treating the membranes with EDTA. The effect of EDTA, the zinc dependence and aminopeptidase inhibitors on the leech enkephalin-degrading aminopeptidase indicated that this

Table 4
Effect of bivalent metal ions on the enkephalin-degrading aminopeptidase activity of the EDTA-treated leech membranes

Metal ion	Relative activity (%)
None	3
Zn ²⁺	300
Mn ²⁺	25
Fe ³⁺	5
Co ²⁺	30
Cu ²⁺	5
Mg ²⁺	8
Ca ²⁺	9

Enzyme activity was measured using enkephalin hydrolysis assay and metal ions (100 μ M) were added to the assay mixture as either the chloride or sulfate salts. The results are expressed as the mean of duplicated assays and are relative to the reactivity of untreated membranes.

enzyme is a zinc metallopeptidase which is sensitive to inhibition by amastatin, but not bestatin and actinonin, selective inhibitors of the neutral aminopeptidase [25,26,33–35]. Moreover, the lack of inhibition of the enzyme by PMSF and CMPSA suggests that EAP is neither a serine nor a thiol peptidase.

The proctolin-degrading enzyme of the insect *S. gregaria* [12] or the Met-Enk-degrading aminopeptidase in rat brain [33] possess similar properties. However, these results differ from the ones obtained in arthropods [11]. Similar degradative enzyme activities were observed in *Astacus* and *Limulus*. Differing from mammalian serum, in which the major activity is aminopeptidase, the major activity found in these two organisms is a carboxypeptidase [11]. By contrast, the enkephalin-degrading activities found in *Mytilus* resemble those identified in leeches and mammals more than those of *Astacus* and *Limulus*, i.e., an aminopeptidase [10]. Moreover, the enkephalin-degrading enzyme isolated in arthropods acts at an optimum pH of 8 and is sensitive to bestatin (70% inhibition at 100 μ M) [11]. By its biological properties, the leech EAP seems to be more akin to the insect neuropeptide-degrading aminopeptidase than to those isolated in *Astacus* and *Limulus*.

3.5. Comparison of kinetic constants

Assuming that EAP, NEP-like and ACE-like enzymes possess a molecular mass of, respectively, 70 (this paper), 45 [13] and 120 kDa [14], kinetic parameters for Met-Enk degradation were determined with cocktail of inhibitors, i.e., amastatin and captopril for NEP-like enzyme, amastatin and phosphoramidon for ACE-like enzyme and phosphoramidon and captopril for EAP. Results show that Met-Enk was an excellent substrate for the three zinc metalloproteases (Table 5). Values of k_{cat}/k_m , an index of the efficiency of substrates are different between the 3 enzymes, EAP and NEP-like enzyme being more active than the ACE-like enzyme on enkephalins substrate. Their close k_m values, the inhibition by EDTA and the zinc dependence of their activity confirm that the 3 enzymes belong to the zinc metalloprotease superfamily possessing the HEXXH motif termed the 'zincins' [34]. Similar results were obtained in other invertebrate classes [10–12], except k_m values which are in micromolar range for leech

Table 5
Kinetic parameters for degradation of the Met-enkephalin by purified peptidases

Peptidase	Kinetic parameters		
	k_m (μ M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/k_m ($10^6/\text{mol per min}$)
ACE	80	960	12
EAP	30	1380	46
NEP	25	1950	78

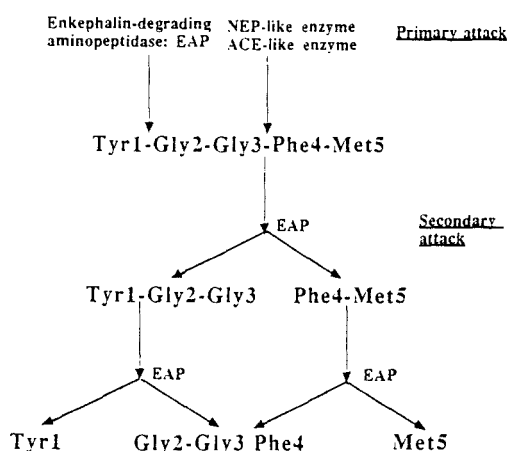


Fig. 3. Sites of cleavage of methionine enkephalins by EAP, NEP and ACE in head membranes of the leech *T. tessulatum*.

enzymes vs. millimolar range for molluscs [10] and arthropods [11].

4. Conclusion

Our findings demonstrate the existence of a novel member of the aminopeptidase family in head membranes of the leech *T. tessulatum*, an homodimer of approx. 70 kDa. This peptidase degrades in conjunction with a NEP- and an ACE-like enzymes, enkephalins at the Tyr¹-Gly² and the Gly³-Phe⁴ bonds in a primary attack. Their attacks are rapid (20 min after incubation, more than 50% of enkephalins are degraded), high (specific activities of 12 nmol GGFM/min per mg protein for EAP, 18 and 10 nmol YGG/min per mg protein for NEP- and ACE-like enzyme, respectively) and efficient (k_{cat}/k_m of, respectively, 46×10^6 , 78×10^6 and 12×10^6 mol⁻¹ min⁻¹). We propose the following diagram for enkephalin degradation in leech membranes (Fig. 3).

Acknowledgements

We are very grateful to Dr. C. Cocquerelle for reviewing the manuscript and to Annie Desmons for her technical help.

References

- [1] Almenoff, J. and Orlowski, M., Membrane-bound kidney metalloendopeptidase: interactions with synthetic substrates, natural peptides and inhibitors. *Biochemistry*, 22 (1983) 590–599.
- [2] De la Baume, S., Gros, C., Yi, C.C., Chaillet, P., Marçais-Collado, H., Costentin, J. and Schwartz, J.C., Selective participation of both 'enkephalinase' and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Life Sci.*, 31 (1982) 1753–1756.
- [3] Erdős, E.G., Johnson, A.R. and Boyden, N.T., Inactivation of enkephalins: effect of purified peptidyl dipeptidase and cultured human endothelial cells. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 18 (1978) 45–49.
- [4] Erdős, E.G. and Skidgel, R.A., Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J.*, 3 (1989) 145–151.
- [5] Malfroy, B., Swerts, J.P., Guyon, A., Roques, B.P. and Schwartz, J.C., High affinity enkephalin-degrading peptide in brain is increased after morphine. *Nature*, 276 (1978) 523–526.
- [6] Shibasaki, S., Weinberger, S.B., Ishikawa, K. and Martinez, J.L., Jr., Further characterization of the in vivo hydrolysis of [Leu] and [Met] enkephalin in rat plasma: HPLC-ECD measurement of substrate and metabolite concentrations. *Regul. Pept.*, 32 (1991) 267–278.
- [7] Schwartz, J.-C., Malfroy, B. and De La Baume, S. Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase ('enkephalinase') as neuropeptidase. *Life Sci.*, 29 (1981) 1715–1740.
- [8] Turner, A.J. and Barnes, K., Distribution and roles of endopeptidase 24. 11. *Methods Neurosci.*, 23 (1995) 344–362.
- [9] Matsas, R., Kenny, A.J. and Turner, A.J., The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues by endopeptidase-24-11. *Biochem. J.*, 223 (1984) 433–440.
- [10] Leung, M.K., Le, S., Houston, S. and Stefano, G.B., Degradation of Met-enkephalin by hemolymph peptidases in *Mytilus edulis*. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 5 (1992) 67–278.
- [11] Coletti-Previero, M.-A., Mattras, H., Zwilling, R. and Previero, A. (1985) Enkephalin-degrading activity in arthropod hemolymph, Neuropeptides, 6 405–415.
- [12] Isaac, R.E., Proctolin degradation by membrane peptidases from nervous tissues of the desert locust (*Schistocerca gregaria*). *Biochem. J.*, 245 (1987) 265–370.
- [13] Laurent, V. and Salzet, M., Isolation of a neuropeptide-degrading endopeptidase from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Eur. J. Biochem.*, 233 (1995) 186–191.
- [14] Laurent, V. and Salzet, M., A comparison of the N-terminal sequence of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin converting-like enzyme with forms of vertebrate angiotensin converting enzyme. *Neurosci. Lett.*, 198 (1995) 1–4.
- [15] Salzet, M., Bulet, P., Verger-Bocquet, M. and Malecha, J., Isolation and structural characterization of enkephalin-related peptides in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *FEBS Lett.*, 357 (1995) 187–191.
- [16] Salzet, M., Bulet, P., Watez, C., Verger-Bocquet, M. and Malecha, J., Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*. *Angiotensin II amide*. *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 1575–1582.
- [17] Salzet, M., Watez, C., Baert, J.-L. and Malecha, J., Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *Brain Res.*, 631 (1993) 247–255.
- [18] Laurent, V., Bulet, P. and Salzet, M., A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin I-like molecule with forms of vertebrate angiotensinogens: an hormonal system conserved in course of evolution. *Neurosci. Lett.*, 190 (1995) 175–178.
- [19] Laurent, V. and Salzet, M. Isolation of a renin-like enzyme from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Peptides* (1996) in press.
- [20] Malecha, J., Verger-Bocquet, M.A. and Tramu, G., Mise en évidence et évolution, au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motiline porcine dans le ganglion supracœsophagien de la sangsue *Theromyzon tessulatum*. *Can. J. Zool.*, 67 (1989) 636–640.
- [21] Salzet, M., Bulet, P., Van Dorsselaer, A. and Malecha, J., Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. *Eur. J. Biochem.*, 217 (1993) 897–903.
- [22] Salzet, M., Watez, C., Slomianny, M.C., Lëu, B. and Siegert, K.J.,

- ELISA for oxytocin. Highly sensitive tests and application for titration of an oxytocin-like substance in the leech *Erpobdella octoculata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102C (1992) 83–487.
- [23] Welling, G.W., Scheffer, A.J. and Wellig-Wester, S.. Determination of enzyme activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 659 (1994) 209–225.
- [24] Davis, T.P.. Methods of measuring neuropeptides and their metabolism. In: J. Kaufman, A. McCubbin and C.B. Nemeroff (Eds.), *The Roles of Neuropeptides in Stress Pathogenesis and Systemic Disease*. Academic Press, Orlando, FL, 1990, pp. 147–177.
- [25] Rubin, B., Laffan, R.J., Kotler, D.J., O'Keefe, E.H., De Maio, D.A. and Goldberg, M.E.. SQ 14, 225 (D-3-mercapto-2-methylpropanoyl-L-proline), a novel orally active inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 204 (1981) 271–282.
- [26] Gillespie, T.J., Konings, P.N.M., Merrill, B.J. and Davis, T.P.. A specific enzyme assay for aminopeptidase M in rat brain. *Life Sci.*, 51 (1992) 2097–2106.
- [27] Hui, K.-S., Wang, Y.-J. and Lajtha, A.. Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain membranes. *Biochemistry*, 22 (1983) 1062–1067.
- [28] Verger-Bocquet, M., Malecha, J. and Tramu, G.. Immunohistochemical localization of opioid peptides in the brain of the leech *Theromyzon tessulatam*. *Cell Tissue Res.*, 250 (1987) 63–71.
- [29] Rosenbaum, C., Cardozo, C. and Lesser, M.. Degradation of lysyl-bradykinin by endopeptidase 24.11 and endopeptidase 24.15. *Pep-tides*, 16 (1995) 523–525.
- [30] Bradford, M.M.. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyeing. *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248–254.
- [31] Laemmli, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (1970) 680–685.
- [32] Dyer, S.H., Slaughter, C.A., Orth, K., Moomaw, C.R. and Herssh, L.B.. Comparison of the soluble and membrane-bound forms of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidase from rat. *J. Neurochem.*, 54 (1990) 547–554.
- [33] Hersh, L.B.. Solubilization and Characterization of two brain membrane-bound aminopeptidase active on met-enkephalin. *Am. Chem. Soc.*, 20 (1981) 232–237.
- [34] Hooper, N.M.. Family of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.*, 354 (1994) 1–6.
- [35] Gibson, A.M., Biggins, J.A., Lauffart, B., Mantle, D. and McDermott, J.R.. Human brain leucyl aminopeptidase: isolation, characterization and specificity against some neuropeptides. *Neuropeptides*, 19 (1991) 163–168.



Métabolisme des angiotensines par les peptidases de
Theromyzon tessulatum

Article (8)

Métabolisme des angiotensines

Laurent, V. and Salzet, M. Metabolism of angiotensins by head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum* FEBS Letters, 384 (1996) 123-127.

L'étude du métabolisme de l'AII chez *T. tessulatum* est en relation directe avec l'étude de sa fonction physiologique et plus particulièrement de son rôle dans le maintien de l'équilibre hydrominéral. On sait que lors d'un repas, la sangsue peut absorber jusqu'à 8 fois son volume de sang. L'AII active est alors produite par la sangsue *T. tessulatum*. Celle-ci doit éliminer l'excès de liquide et d'ions. C'est là qu'interviennent la diurèse contrôlée par les neurohormones comme l'AII. L'AII provenant du clivage de l'AI par l'ACE est ensuite catabolisée en AIII, AII (1-7), l'AIV. Salzet et collaborateurs avaient déjà isolé ces peptides chez *T. tessulatum*, laissant présager l'existence d'un système enzymatique de catabolisme de l'AII comparable à celui des vertébrés.

Le but de cette étude du métabolisme de l'angiotensine a été d'identifier les différentes enzymes impliquées et leurs sites de protéolyses dans le catabolisme des angiotensines.

Résultats

Dans le cas de l'AI, l'action conjuguée de l'ACE et de la NEP précède celle des aminopeptidases. L'AII et l'AIII sont hydrolysées par l'endopeptidase 24. 11-like au niveau d'une même liaison : Tyr-Ile, alors que l'arginine N terminale de l'AIII est libérée par l'attaque d'une arg-aminopeptidase. Il apparaît que la NEP joue un rôle initiateur majeur dans le catabolisme des angiotensines suivi de l'action de différentes aminopeptidases (les aspartyl-, arginyl-, dipeptidyl- et neutral aminopeptidases).

Ce travail a permis non seulement de démontrer la nature des enzymes impliquées dans le métabolisme des angiotensines mais a également montré un aspect de la relation qui existe entre le repas de sang, la diurèse contrôlée par les neuropeptides telle l'AII et la régulation enzymatique grâce à la coexistence de trois activités la NEP-like, ACE-like (dipeptidyl carboxypeptidase) et différentes aminopeptidases.

Metabolism of angiotensins by head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum*

Virginie Laurent, Michel Salzet*

Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire de Phylogénie Moléculaire des Annelides, EA DRED 1027, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudiniens, S.N.3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 18 January 1996; revised version received 4 March 1996

Abstract Angiotensins (angiotensin I, angiotensin II, angiotensin II-amide) have been isolated in leeches and such peptides are involved in diuresis in these animals. To explore possible inactivation mechanisms of these peptides, angiotensins were incubated with head membranes of the leech *T. tessulatum*. Membranes derived from head parts of this leech are very rich in peptidases. They contain endopeptidase-24.11-like enzyme (NEP-like) associated with a battery of exopeptidase. The way that angiotensins are degraded by the combined attack of these membrane peptidases has been investigated. The contribution of individual peptidases was assessed by adding inhibitors (phosphoramidon, captopril and amastatin) to the membrane fractions, when they were incubated with the peptides. In the case of angiotensin I, the primary attack was performed by a combined action of the NEP-like and the ACE-like enzymes, followed by aminopeptidase attacks. Angiotensin II and III were hydrolyzed by NEP-like enzyme at the same Tyr-Ile bond, whereas the N-terminal arginine residue of angiotensin III was removed by an arginyl aminopeptidase. These results show that angiotensins are efficiently degraded by membranes and that NEP-like enzyme plays a key role in this process.

Key words: Angiotensin; Leech; Peptidase; Metabolism; Membrane

1. Introduction

Since immunocytochemical studies with polyclonal antisera raised against angiotensin II (a-AII) at the level of the leech *Theromyzon tessulatum* brain, evidence was given of neurons containing angiotensin-like material [1]. This material was isolated from *T. tessulatum* and corresponded to the vertebrate AII and AIII, as well as fragments (3–8) and (6–8) of AII [2], suggesting the existence of peptidases involved in the metabolism of AII. Moreover, in *Erpobdella octoculata*, an angiotensin II-amide, differing from the vertebrate AII by a carboxy-terminal amidation, has been sequenced [3]. Although the AII-like peptide is very similar to the vertebrate AII, its precursor seems to be different from the vertebrates one, the angiotensinogen protein of ca. 60 kDa. Western blot analyses

performed with *T. tessulatum* central nervous systems (CNS) homogenate have revealed the existence of a multiple hormone AII-like precursor of ca. 19 kDa [2]. This protein possesses at least four epitopes recognized by three different polyclonal antisera (an anti- γ -MSH, an anti-angiotensin I and an anti-angiotensin II) and by a monoclonal antibody (Tt159) specific for epitopes contained in *T. tessulatum* supraesophageal ganglia [2]. Three of the four epitopes recognized have been identified. The N-terminal part of a fragment of this precursor has recently been determined and the first 14 amino acid residues (DRVYIHPFHLXWG) reveal the existence of both angiotensin I and angiotensin II [4]. The third epitope is a peptide related to the vertebrate γ -MSH [5]. The fragment of the AII-like precursor presents in its sequence the processing sites of the metabolic enzymes: renin and angiotensin-converting enzyme (ACE) [4]. These two enzymes have been isolated and our findings demonstrate that these ectopeptidases are close to the renin and the ACE found in vertebrates, in activity, mass and N-terminal sequence [6,7], and are localized at the level of the dorsal commissure and glial cells (unpublished data). A renin-angiotensin-like system (RAS) similar to vertebrate RAS exists in leeches. Parallel to this RAS, a non-RAS would also be present in leeches. A neuropeptide endopeptidase of ca. 45 kDa (NEP-like enzyme) with characteristics close to those of endopeptidase-24.11 has been isolated from *T. tessulatum* head membranes [8].

Considering the existence of these two systems (RAS and non-RAS) in leeches, the aim of this work was to identify the different peptidases involved in angiotensins metabolism and to locate their sites of attack on these peptides.

2. Material and methods

2.1. Animals

Mature specimens of the rhynchobdellid leech *T. tessulatum*, reared under laboratory conditions as described by Malecha et al. [9], were used in this study.

2.2. Materials

Angiotensin I (DRVYIHPFHL; AI), angiotensin II (DRVYIHPF; AII), angiotensin III (RVYIHPF; AIII), DRVY, IHPF, HL, DRVYIHP, RVYIHP, VYIHPF, RVY, FHL peptides, the phenylalanine (F) residue, amastatin, captopril and phosphoramidon were obtained from Sigma.

2.3. Antisera

Two polyclonal antisera directed either against AII (a-AII) or against AI (a-AI) were generated in rabbits using synthetic human AII or AI coupled to human serum albumin via glutaraldehyde. Their specificity has been described elsewhere [1,4]. In brief, for a-AII, 100% cross-reaction with AII and 0.46% for AI were obtained. For a-AI, 100% cross-reaction with AI, 10% for AII and 0% for the synthetic porcine angiotensinogen tetradecapeptide (DRVYIHPFHLVYS) were observed.

*Corresponding author. Fax: (33) (20) 43-4054.
E-mail: salzet@pop.univ-lille1.fr

Abbreviations: AI, angiotensin I; AII, angiotensin II; AII-amide, angiotensin II-amide; a-AI, anti-angiotensin I; ACE, angiotensin-converting enzyme; AP, aminopeptidase; DIA, dot immunobinding assay; HPLC, high performance liquid chromatography; NEP, endopeptidase-24.11; RAS, renin-angiotensin system; TBS, Tris/HCl buffer saline; NAP, neutral aminopeptidase; DPAP, dipeptidyl aminopeptidase; Arg-AP, arginyl-aminopeptidase; Asp-AP, asparagyl-aminopeptidase.

2.4. Immunoassays

Dot immunobinding assay (DIA) and enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) were based on the protocols of Salzet et al. [10,11].

2.5. Membrane preparation

After anesthesia of the animals in 0.01% chlorobutanol, head parts of *T. tessulatum* were excised, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C . 500 head parts (5 g) were placed in 25 ml TBS (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, containing 200 mM NaCl) and homogenized at 4°C with a polytron (5 \times 15 s bursts on setting 9). After 30 min centrifugation at 10000 rpm at 4°C , the pellet was reextracted six times with the same amount of saline solution. The combined supernatants were centrifuged at 20000 rpm for 1 h at 4°C to yield a membrane pellet. These membranes were washed by resuspension in TBS, followed by sedimentation at 20000 rpm. The washing procedure was repeated until a clear supernatant was obtained. The washed membranes were resuspended in TBS and stored at -20°C . Protein concentration was determined with the Bradford procedure using γ -globulin as standard [12].

2.6. Identification of cleavage sites

Assays of peptidase activities were carried out with 15 μg of membranes incubated or not with 10 μM peptides and 10 μM inhibitors in TBS with a total volume of 100 μl . Reactions were terminated by addition of 30% trifluoroacetic acid (v/v). Samples were centrifuged at 12000 rpm for 15 min. Supernatants were diluted by adding 100 μl of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and degraded fragments were analyzed on a narrow-bore C_{18} (250 mm \times 2 mm, Beckman) HPLC column, with a linear gradient of acetonitrile in acidified water (0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 80% in 30 min at a flow rate of 300 $\mu\text{l}/\text{min}$. Emerging peaks were detected by absorbance at 215 nm and collected manually before being dried in vacuo.

2.7. Analysis of peptide products

Identification of the metabolized products of the angiotensins was performed (a) by coelution with marker peptides in reversed-phase HPLC [13], (b) by reaction with specific antisera in immunoassays (DIA and/or ELISA) and (c) by Edman degradation on a pulse-liquid

automatic sequencer (Applied Biosystems, model 473A). Molar ratios of the products were calculated from data given by Stephenson and Kenny [14] on the quantification of peptides by HPLC.

2.8. Inhibitor experiments

Phosphoramidon, captopril and amastatin were used at a final concentration of 10 μM and were preincubated for 30 min at 37°C with membranes before addition of 10 μl of the peptide solution. These inhibitors are respectively specific for endopeptidase-24.11 [15], ACE [16] and aminopeptidases [17].

2.9. Kinetics of degradation

Kinetic parameters were determined from the regression line fitted to the data plotted as $1/V$ vs. $1/[S]$. Correlation coefficients were greater than 0.99 [18]. K_{cat} values were calculated assuming a molecular weight of 45 kDa for the purified NEP-like enzyme [8].

3. Results and discussion

Results obtained with head membrane preparations are identical to those obtained with membrane preparations of CNS. However, in order to have sufficient material for these studies, head parts including the whole of the CNS were used.

3.1. Metabolism of angiotensins

After 1 h incubation of AI, AII and AIII peptides with membranes, the three angiotensins yielded multiple products which were collected, then dried in vacuo. The peptides or amino acids identified using ELISA, coelution with marker peptides and microsequencing are shown in Table 1.

3.2. Effect of inhibitors on the pattern of angiotensin hydrolysis (Table 1)

In trying to understand the way in which angiotensins are

Table 1
Effect of inhibitors on the hydrolysis of angiotensins by *T. tessulatum* head membranes

Peptide	Retention time (min)	Product formed in the absence of inhibitor (nmol)	Peptide remaining (%)		
			Phosphoramidon (10 μM)	Captopril (10 μM)	Amastatin (10 μM)
<i>Angiotensin I</i>					
HL	3.3	1.66	70	52	48
F	3.9	1.3	8	93	20
IHP	4.8	0.8	12	100	100
DRVY	6.4	1.5	12	100	100
DRVYIHP	10.3	1.2	13	100	100
VYIHP	11.5	0.3	32	95	100
FHL	12.7	1.75	15	88	100
DRVYIHPF	15.3	2.53	60	25	100
<i>Angiotensin II</i>					
HP	2.7	1.68	80	95	30
F	3.6	1.45	86	100	80
DRVY	6.2	2.6	3	100	100
HPF	7.5	1.2	2	100	100
DRVYIHP	10.7	0.78	100	100	100
RVYIHPF	11.3	0.5	100	100	30
IHPF	11.7	2.3	4	100	100
<i>Angiotensin III</i>					
F	3.8	1.8	80	100	100
RVY	4.5	2.8	5	100	100
RVYIHP	9.9	0.7	100	100	100
IHPF	11	3.2	12	100	100
VYIHPF	11.8	0.8	100	100	34

See section 2 for details. The amount of each product formed in 60 min in the absence of inhibitors is given in nmol h $^{-1}$ mg protein $^{-1}$. The effect of each inhibitor on the product yield is expressed as a percentage of this value. The data are based on four experiments.

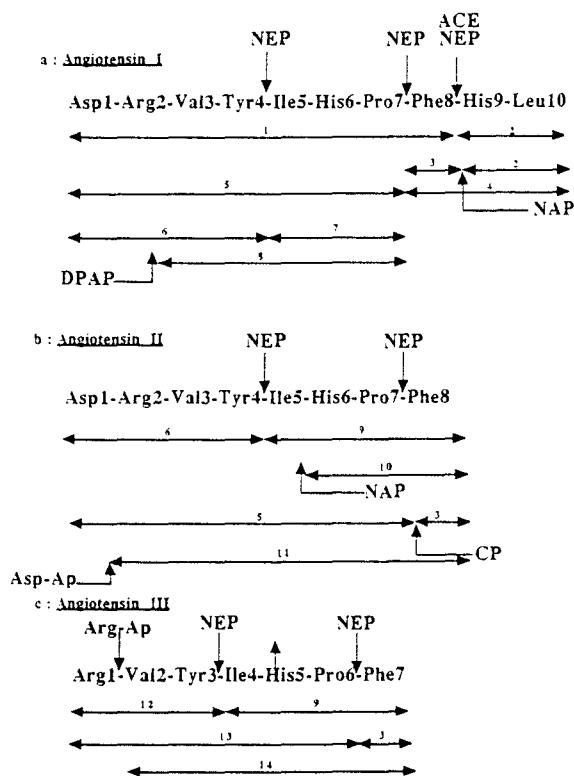


Fig. 1. Identities of the products formed by incubation of angiotensins with *T. tessulatum* membranes. The numbered peptides correspond to the HPLC peaks and were identified by coelution with peptide markers in HPLC, antisera recognition and spectral scanning comparison. (1) DRVYIHPF; (2) HL; (3) F; (4) FHL; (5) DRVYIHP; (6) DRVY; (7) IHP; (8) VYIHP; (9) IHPF; (10) HPF; (11) RVYIHPF; (12) RVY; (13) RVYIHP; (14) VYIHPF. The enzymes acting on the angiotensin metabolism are the following: ACE: angiotensin-converting enzyme; AP: aminopeptidase; Asp-AP: aspartyl aminopeptidase; Arg-AP: arginyl aminopeptidase; CP: carboxypeptidase; DPAP: dipeptidyl aminopeptidase; NAP: neutral aminopeptidase; NEP: neuro peptide-degrading endopeptidase.

metabolized by leech membranes, we can be hampered by some degree of ignorance concerning enzymes that may be involved. However, three enzymes have previously been well characterized in *T. tessulatum* head membranes: the renin-like, the ACE-like, and the endopeptidase-24.11-like (NEP-like) enzymes [6–8]. This background knowledge gives us some confidence in attributing the attack to one or more of the peptidases known to be present in *T. tessulatum* head membranes. Such conclusions clearly depend on the specificity of the inhibitors employed. By employing 10 μ M phosphoramidon, the leech NEP activity completely disappears. By contrast, the ACE-like enzyme remains active. 10 μ M captopril are sufficient to stop the leech ACE activity but have no effect on the NEP-like enzyme. In the case of the aminopeptidases (AP), amastatin, a potent inhibitor [8], was used and blocked at least the neutral aminopeptidase (NAP) (unpublished data).

3.2.1. Angiotensin I (Fig. 1a). The main product (DRVYIHPF: AII) resulting from hydrolysis of the Phe⁸-His⁹ bond was suppressed for 75% by captopril, 40% by phosphoramidon and 95% by a cocktail of phosphoramidon and captopril,

reflecting attack by both ACE-like and NEP-like enzymes. Hydrolysis at the Pro⁷-Phe⁸ bond yielding the DRVYIHP peptide was suppressed for 87% by phosphoramidon and unaffected by other inhibitors. The second fragment (FHL) yielded by this attack was transiently detected and was rapidly metabolized to HL peptide and Phe residue. The production of the peptide HL was suppressed for 58% by captopril and only 30% by phosphoramidon. This peptide is generated by both the ACE-like and the NEP-like enzymes followed by an AP attack inhibited by amastatin, liberating the Phe residue. Peptides DRVY and IHP from attacks at Tyr⁴-Ile⁵ and Pro⁷-Phe⁸ bonds by a NEP-like enzyme were about 88% suppressed by phosphoramidon. The N-terminal dipeptide DR was not detected, even in the presence of amastatin. However, peptide VYIHP has been isolated, reflecting an attack at the Arg²-Val³ bond by a dipeptidyl aminopeptidase (DPAP).

3.2.2. Angiotensin II (Fig. 1b). Conversion of AII (DRVYIHPF) in AIII (RVYIHPF) by cleavage at the Asp¹-Arg² bond is about 70% suppressed by amastatin reflecting an attack by an aspartyl aminopeptidase (Asp-AP). However, the main attack on AII occurs at the Tyr⁴-Ile⁵ bond generating DRVY and IHPF peptides. This attack is wholly suppressed by phosphoramidon. The IHPF peptide was rapidly degraded to either IHP and F or HPF. Appearance of these peptides is inhibited by phosphoramidon and amastatin, reflecting a NEP-like enzyme and an AP action, successively. None of the inhibitors used suppressed the formation of DRVYIHP. As compared to what is found in vertebrates, these results could be consistent with a degradation by a carboxypeptidase P which hydrolyses Pro-Xaa bonds [14,19].

3.2.3. Angiotensin III (Fig. 1c). Three points of primary attack were revealed. The N-terminal arginine residue was removed to yield the VYIHPF peptide, partially suppressed by amastatin. Phenylalanine was released from the C-terminus, and this cleavage was inhibited 20% by phosphoramidon. The main attack was at the Tyr³-Ile⁴ bond, yielding the RVY and the IHPF peptides and this was strongly inhibited (88%) by phosphoramidon.

3.3. Site of attack (Table 2)

3.3.1. Angiotensin I. In addition to the conversion of AI to AII by the combined action of ACE-like and NEP-like enzymes at the Phe⁸-His⁹ bond, during the first 15 min. AI is degraded by the NEP-like enzyme at the Tyr⁴-Ile⁵ and Pro⁷-Phe⁸ bonds. Then, between 15 and 30 min, this last event becomes the most important and peptide products are further degraded by a DPAP which attacks at the Arg² level and by a neutral aminopeptidase (NAP) (recently characterized, unpublished data) which cleaves at the Phe⁸-His⁹ bond the metabolized product (FHL) coming from the previous NEP-like enzyme attack.

3.3.2. Angiotensin II. AII, one of the biologically active peptides in leeches, is only degraded at 50% when 30 min have elapsed. AII is firstly cleaved by an aspartyl aminopeptidase (Asp-AP) which carries off the Asp¹ amino acid in AIII, then by the NEP-like action on the same bonds as in the second attack of the AI. The latter enzyme seems to cleave at the Ile⁵ level. Early in the course of the reaction, a carboxypeptidase begins to take off the Phe⁸ residue, which inactivates AII.

3.3.3. Angiotensin III. The Asp-AP already mentioned at-

Table 2
Time course of formation of peptides upon treatment with *T. tessulatum* head membranes

Peptide	Incubation time (min)						
	0	5	10	15	30	45	60
<i>Angiotensin I</i>	8.3	8	6	5	2.6	2	
HL				0.3	0.8	1.2	1.4
F					0.9	1.1	1.1
IHP		0.05	0.1	0.1	0.3	0.4	0.5
DRVY		0.2	0.5	0.8	1.1	1.5	1.5
DRVYIHP			0.3	0.6	0.9	1.2	1.1
VYIHP						0.1	0.2
FHL		0.1	0.4	0.7	0.9	0.9	1.4
DRVYIHPF (AII)		0.5	1.2	1.4	1.4	1.7	2.1
<i>Angiotensin II</i>	9.5	9.3	8	6.8	5	2.2	
HP					0.2	1.2	1.7
F		0.05	0.1	0.2	0.7	1	1.5
DRVY				0.5	1.3	1.6	2.6
HPF				0.6	0.8	1.2	1.2
DRVYIHP		0.1	0.1	0.2	0.4	0.5	0.8
RVYIHPF		0.3	0.5	0.8	0.6	0.5	0.5
IHPF			0.5	0.8	1.3	1.7	2.3
<i>Angiotensin III</i>	10.5	10	9.2	7	5.1	2.4	
F				0.3	0.8	1.2	1.9
RVY				0.8	1.5	2.2	3.3
RVYIHP			0.1	0.4	0.5	0.7	0.9
IHPF		0.1	0.6	1.3	1.6	2.5	3.2
VYIHPF		0.5	0.6	0.6	0.7	0.8	0.9

See section 2 for details. Samples were incubated at 37°C for 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min. The amount of each product formed is given in nmol.

tacks the Asp¹-Arg² bond of AII to produce AIII, the other active angiotensin in leeches [1]. As soon as AIII is yielded, the first enzymes to begin its degradation are an arginyl aminopeptidase (Arg-AP) and then the NEP-like enzyme. Indeed, VYIHPF (AIV) is the major product obtained after 5 min. By contrast, after 10 min, the amount of VYIHPF is constant while IHPF has greatly increased.

3.3.4. Summary of the kinetic scheme (Fig. 1). Finally, it appears to us that the main attack is done by the NEP-like enzyme. The metabolized products are then degraded by AP in a secondary attack. The AP attacks, at the Phe-Xaa, the Arg-Xaa and the Asp-Xaa bonds, would not be performed by the same AP. According to the background knowledge in vertebrates, two types of AP could be implicated in such cleavages, i.e. a NAP and acidic aminopeptidases [19]. In leech membrane, an enkephalin-degrading aminopeptidase close to the NAP has been isolated and characterized (unpublished data). This enzyme cleaves peptides at the Tyr-Xaa, Phe-Xaa bonds and could also be implicated in degradation of angiotensins at the Phe-Xaa bond. The other cleavages at the Arg-Xaa and Asp-Xaa could be due to acid aminopeptidases as in vertebrates.

3.4. Comparison of kinetic constants for purified NEP-like enzyme

Purified NEP-like enzyme according to Laurent and Salzet [8] was used to follow the hydrolysis of angiotensins. With a K_m of 72 μM for AI, 110 μM for AII and 85 μM for AIII occurring at the Pro⁷-Phe⁸ and Tyr¹-Ile² bonds of angiotensins, these values are in line with those obtained on bradykinin (92 μM), lysylbradykinin (186 μM), and substance P (32

μM) with vertebrate NEP [14,18]. However, among the three angiotensins, the NEP-like enzyme seems to cleave preferentially AII, then AIII and AI. K_{cat} values (4480 min^{-1} ; 5225 min^{-1} ; 4259 min^{-1}) obtained for angiotensins AI, AII and AIII, respectively confirm the preceding hypothesis. NEP-like K_{cat} values are in line with those registered with vertebrate NEP on bradykinin (6360 min^{-1}) or substance P (5060 min^{-1}) [18]. The ratio K_{cat}/K_m ($10^6/\text{mol per min}$) corresponding to the catalytic efficiency of the enzyme are the following: 62.2, 47.5, 50.1 for AI, AII and AIII, respectively. Compared to K_m values, NEP-like K_{cat}/K_m reflects a better efficiency of this enzyme towards AI than towards AIII and AII. These results could be explained by the fact that NEP-like enzyme attacks AI at the level of three bonds instead of two bonds in the case of AII and AIII. In AI, cleavages mediated by NEP-like enzyme were on the amino side of F and are consistent with the known specificity of vertebrate NEP, for cleavages on the amino side of hydrophobic residues [18]. Moreover, as regards experiences conducted with vertebrate NEP on different substrates, the ratio K_{cat}/K_m changes with the substrate used, e.g. K_{cat}/K_m : 69 for bradykinin, 16.7 for lysylbradykinin, 158 for substance P [14,18]. As suggested by Rosenbaum et al. [18], residues in the P2 through P4 positions also contribute to substrate binding, whereas those in a more N-terminal position contribute little to this process. The kinetics of degradation of AII and AIII are equivalent, because they possess the same N-terminal sequence except for a lack of an Asp residue in AIII. In the case of AI, its N-terminal part is identical to the ones of AII and AIII, but its C-terminal side is different. Its C-terminal extension (FHL) allows the NEP-like enzyme to attack the Phe residue at both sides (N and C). These arguments could explain the degradation kinetics constants of AI compared to those of AII and AIII.

4. Conclusion

In the first 15 min, about 30% of AI, AII and AIII are metabolized. However, among this 30% degradation, a high percentage, ca. 20%, is attributed to the conversion of AI into AII, of AII into AIII and of AIII into AIV, the three active peptides in leech osmoregulation [1]. These results are in line with those of Zerbst-Boroffka [20]. This author has demonstrated by physiological experiments conducted in *Hirudo medicinalis* an 8-fold increase of the urine volume excreted 15 min after a blood meal, which persisted for many hours. Moreover, we have established that the AII amount greatly increased just after a blood meal [1] and we speculate that AII, AIII and IV increase diuresis by acting on their different targets as tegument, stomach or nephridia [1,3]. These data allow us to present the kinetic scheme of the relations existing between a blood meal, effective diuresis and the central nervous system (CNS) in which the angiotensin metabolism takes place. According to Wenning [21], stimulation of abdominal stretch receptors during feeding would cause hormonal release from the CNS. One of the hormone systems implicated in such a phenomenon is the angiotensins in leeches [1–3]. If we try to connect this physiological event to the enzymes involved in metabolism of angiotensins in CNS, we can distinguish three implicated enzymes: the ACE-like, the NEP-like enzymes and the AP whose efficiencies are in line with those of vertebrates [19].

The main enzyme participating in the degradation of the

angiotensins is the NEP-like enzyme. This peptidase acts firstly to yield the AII and secondly to inactivate AI, AII, AIII, by the action at Tyr¹-Ile⁵ and Pro⁷-Phe⁸ bonds. The metabolized products are then cleaved by the action of AP. These enzymes could constitute the degradative pattern of angiotensins. In addition, our findings have led us to discover the existence of a different AP, confirmed with the use of amastatin. First, a DPAP seems to play a role at the N-terminal side of AI and its existence in invertebrates is sustained by recent results obtained in Cnidaria [22]. Moreover, existence of an Asp-AP is sustained by the presence of AIII and by its diuretic activity in *T. tessulatum* [1]. For the Arg-AP, we established its presence in head membranes by detection of the AIV peptide. These different enzymes would be implicated at a high level in degradation of AI, AII and AIII. 30 min after their release and could be activated by a feedback after AII action on its targets. However, only the localization of these enzymes in the CNS would allow us to confirm this hypothesis and further immunocytochemical experiences with antisera raised against these purified enzymes are needed.

Acknowledgements: We are very grateful to Annie Desmons for her technical help.

References

- [1] Salzet, M., Verger-Bocquet, M., Watez, C. and Malecha, J. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* 101A, 83-90.
- [2] Salzet, M., Watez, C., Baert, J.-L. and Malecha, J. (1993) *Brain Res.* 631, 247-255.
- [3] Salzet, M., Bulet, P., Watez, C., Verger-Bocquet, M. and Malecha, J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 1575-1582.
- [4] Laurent, V., Bulet, P. and Salzet, M.A. (1995) *Neurosci. Lett.* 190, 175-178.
- [5] Salzet, M., Watez, C., Bulet, P. and Malecha, J. (1995) *FEBS Lett.* 348, 102-106.
- [6] Laurent, V. and Salzet, M. (1995) *Neurosci. Lett.* 198, 60-64.
- [7] Laurent, V. and Salzet, M. (1995) *Peptides* 16, 1351-1358.
- [8] Laurent, V. and Salzet, M. (1995) *Eur. J. Biochem* 233, 186-191.
- [9] Malecha, J., Verger-Bocquet, M., A. and Tramu, G. (1989) *Can. J. Zool.* 67, 636-640.
- [10] Salzet, M., Bulet, P., Van Dorsselaer, A. and Malecha, J. (1993) *Eur. J. Biochem.* 217, 897-903.
- [11] Salzet, M., Watez, C., Slomianny, M.C., Léü, B. and Siegert, K.J. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* 102C, 483-487.
- [12] Bradford, M.M.A. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [13] Welling, G.W., Scheffer, A.J. and Wellig-Wester, S. (1994) *J. Chromatogr. B* 659, 209-225.
- [14] Stephenson, S.L. and Kenny, J. (1987) *Biochem. J.* 241, 34-247.
- [15] Turner, A.J. and Dowdall, M.J. (1984) *Biochem. J.* 222, 255-259.
- [16] Guyene, T.T., Devaux, C., Ménard, J. and Corvol, P. (1976) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43, 1301-1306.
- [17] Hui, K.-S., Wang, Y.-J. and Lajtha, A. (1983) *Biochemistry* 22, 1062-1067.
- [18] Rosenbaum, C., Cardozo, C. and Lesser, M. (1995) *Peptides* 16, 523-525.
- [19] Campbell, D.J., Lawrence, A.C., Kladis, A. and Duncan, A.-M. (1995) *Methods Neurosci.* 23, 328-343.
- [20] Zerbst-Boroffka, I. (1973) *J. Comp. Physiol.* 84, 185-204.
- [21] Wenning, A. (1986) *Zool. Beitr. N.F.* 30, 379-392.
- [22] Grimmelhuizen, C.J.P. (1995) 12th International Symposium on Neurosecretion, p. 16.

DISCUSSION

RAS de la sangsue *Theromyzon tessulatum*

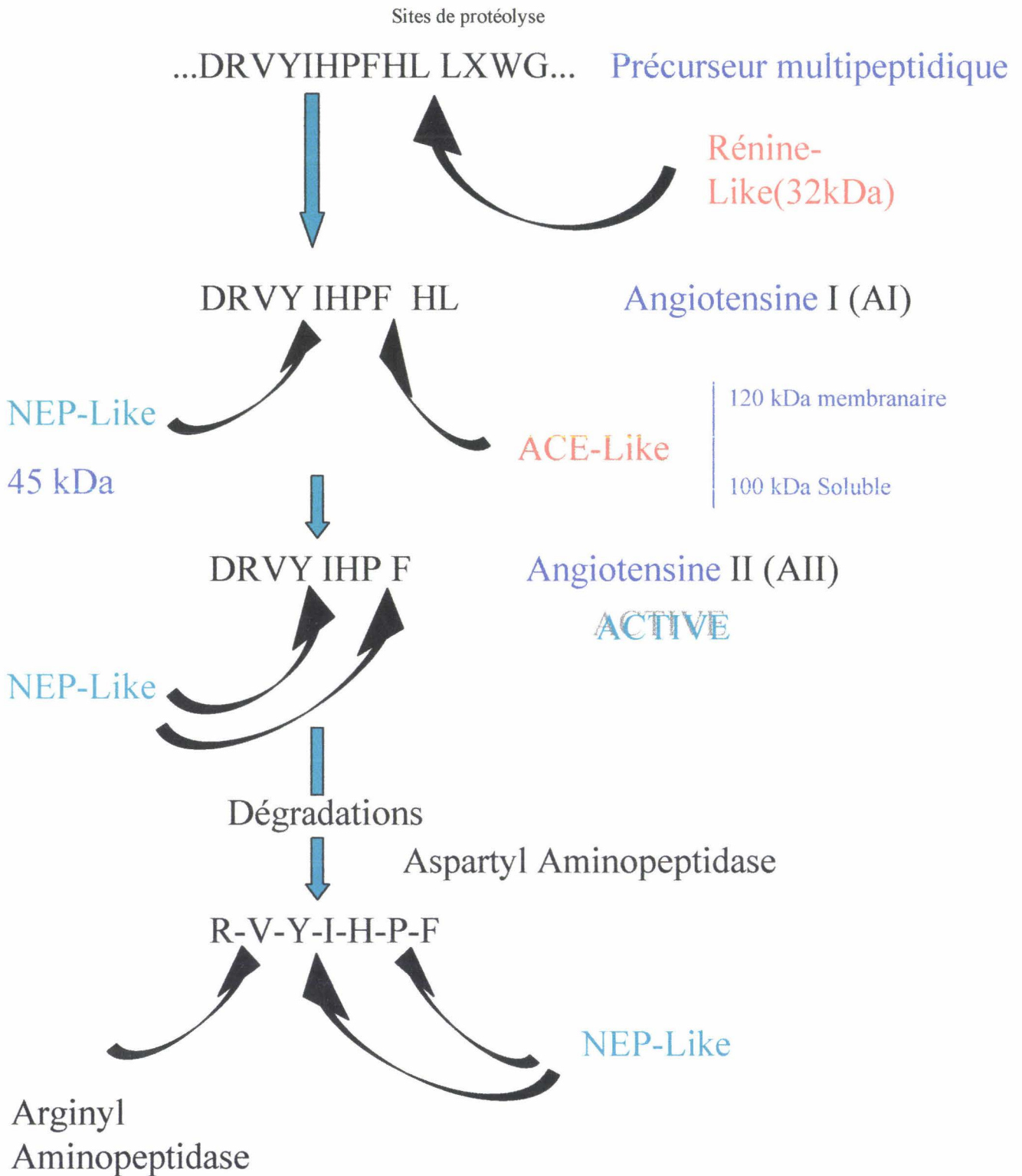


Figure 17:

DISCUSSION

1) Le RAS (Fig. 17)

Chez les Hirudinées, l'AII et son précurseur de nature multi-peptidique ont été isolés du système nerveux central (SNC) de même que les fragments (3-8) et (6-8) de l'AII. Le précurseur une protéine de 19 kDa porte des épitopes distincts reconnus par des anticorps polyclonaux différents (anti- γ MSH, anti-AII, anti-ACTH, etc.) et un anticorps monoclonal (Tt159) spécifique d'épitopes de protéines contenues dans les ganglions supraoesophagiens de *T. tessulatum*. Deux des épitopes ont été identifiés à partir du SNC, il s'agit de l'AII (Salzet, *et al.*, 1993) de la γ MSH (Salzet, *et al.*, 1995).

Ces résultats nous permettaient d'envisager la présence de l'AI et des sites de protéolyse de l'ACE et de la rénine sur ce précurseur multi-peptidique de l'AII de sangsue. Nos premiers résultats ont conduit à la mise en évidence et la purification d'une molécule apparentée à l'AI de mammifères. Une molécule de 11 kDa a en effet été isolée. Sa séquence N terminale présente une identité parfaite avec l'AI sur les 11 premiers acides aminés et 78.5 % d'homologie avec la séquence N terminale de l'angiotensinogène (A_0) des vertébrés (Fig 17). La structure primaire de l'AI est donc largement conservée au cours de l'évolution, sauf pour les résidus en position 1, 5, 9. De façon surprenante, l'acide aminé en position 5, l'isoleucine, est présent de la sangsue jusqu'aux élasmobranches, puis changé en valine chez tous les vertébrés sauf chez l'homme. En ce qui concerne les acides aminés 1 et 5, cela pourrait être dû à des transitions génétiques transitoires intervenues au cours de l'évolution puisque l'on retrouve les mêmes acides aminés chez la sangsue et l'homme. Ces résidus semblent fondamentaux pour l'activité biologique. En effet, l'AII est plus ou moins performante en fonction de l'espèce. Chez les mammifères et les oiseaux, le résidu Asp, en position 1 de l'AI et de l'AII, confère en terme d'activité vasopressive à ces peptides, une efficacité deux fois plus grande que l'Asn 1 de l'AI et de l'AII des poissons (Peach, 1977 ; Henderson, *et al.*, 1981 ; Takei, *et al.*, 1993). Or, les acides aminés en position 1 et 5 sont les mêmes chez la sangsue et l'homme. On peut donc penser que les acides aminés liés à une activité biologique performante ont été finalement conservés, après des variations transitoires observées chez des espèces autres que les Hirudinées et l'homme. Quant à l'acide aminé en position 9, il diffère d'une espèce à l'autre et semble moins indispensable à l'activité

biologique du peptide. De plus, au niveau de la séquence de l'AI, on remarque la présence des deux sites de protéolyse des enzymes de conversion de l'angiotensine II : la **rénine et l'ACE**. Notre travail s'est donc poursuivi par la caractérisation de ces deux enzymes chez la sangsue.

2) Molécule apparentée à la rénine : **rénine-like**

La première enzyme clef impliquée dans le RAS : la rénine, a été isolée de la sangsue *T. tessulatum* et ceci pour la première fois chez un invertébré. Cette enzyme présente en électrophorèse SDS-PAGE, une masse moléculaire de 32 kDa. Cette masse est inférieure à celle de la rénine humaine (44 kDa) (Corvol et Ménard, 1988) ou de la rénine de poisson (48 kDa) (Uva *et al.*, 1992). Cette rénine-like présente une activité maximale à 37° C mais reste quand même active à 4° C. Cela peut s'expliquer par le fait que *T. tessulatum* est une sangsue capable de vivre en eau froide et que cette enzyme doit donc travailler à basse température. Des résultats similaires ont été obtenus chez les poissons arctiques *Chionodraco hamatus* et *Pagothenia bernachii*. (Uva *et al.*, 1992). Ces auteurs ont montré que la rénine des poissons arctiques peut convertir l'A₀ en AI à une température de 0°C. L'étude de l'impact du pH sur l'hydrolyse du tétradécapeptide (TDP), substrat synthétique spécifique de la rénine humaine par la rénine-like, montre que celle-ci fonctionne à un pH optimal de 7.4. Ces résultats sont en accord avec ce qui est observé chez les vertébrés (Poulsen et Nielsen, 1985). La rénine-like travaille donc à pH neutre. Cette donnée est un argument supplémentaire en faveur de l'existence d'une rénine-like et non d'une protéase acide chez les Hirudinées.

L'étude de l'hydrolyse du TDP permet de voir que l'enzyme pure agit sur ce substrat. La courbe d'activité de la rénine-like en fonction du temps montre que la moitié du TDP est convertie en 15 minutes, reflétant une activité forte et rapide de cette enzyme. L'utilisation de la pepstatine A inhibiteur spécifique de la rénine des vertébrés, lors de l'hydrolyse du TDP, confirme l'existence de cette enzyme chez la sangsue. En effet, le maximum d'inhibition (90 %) par la pepstatine A est obtenu pour 26 µM d'inhibiteur (Ic50 : 4.6 µM), ceci indique la haute spécificité de la rénine-like pour la séquence Leu¹⁰-Leu¹¹ du TDP mais aussi la faible efficacité de cet inhibiteur vis à vis de l'enzyme. En effet, il faut une quantité élevée d'inhibiteur (environ 5 µM pour avoir 50 % d'inhibition, valeur comparable à celle trouvée chez les mammifères) pour que l'inhibition de l'activité spécifique de la rénine-like vis à vis du TDP (1,35 pmol d' AI/mg/min de protéine) soit presque totale. Par ailleurs, cette activité est plus importante que celles enregistrées chez les poissons arctiques (1,49 x 10⁻⁵ pmol d'

AI/mg/min pour *P.bernachii* et $2,86 \times 10^{-5}$ pmol d' AI/mg/min pour *C.hamatus*) mais moins élevée que celle du serpent *Bothrops jararaca* (4,82 pmol/mg/min).

Quant à l'hydrolyse du TDP, elle a lieu seulement au niveau de la liaison Leu¹⁰-Leu¹¹ produisant l'AI et le térapeptide Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴. Le Km de la rénine-like (22 µM à 37° C) est comparable à celui de la rénine humaine (33 µM) mais l'enzyme est cependant moins active que celle du chien (Km de 7 µM) (Burton et Quinn, 1988). D'autre part, la rénine-like de la sangsue a une valeur de Kcat (2.7 mol. AI par mole de rénine-like et par minute) obtenue avec le TDP inférieure à celle de la rénine humaine (Kcat de 13) ou de la rénine canine (Kcat de 12) (Cumin, *et al.*, 1987). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les paramètres cinétiques de l'hydrolyse de l'A_O diffèrent en fonction du type d'A_O utilisé. C'est ainsi que Cumin *et al.* (1987) après Skeggs *et al.* en 1968, ont montré que la rénine porcine coupe la liaison Leu¹⁰-Leu¹¹ du TDP synthétique et le peptide minimal reconnu et coupé est l'octapeptide : his⁶-pro⁷-phe⁸-his⁹-leu¹⁰-leu¹¹-val¹²-tyr¹³. Ceci montre la haute spécificité de la rénine vis à vis du TDP. Le rapport Kcat/Km (10^{-6} /mol/min) reflétant l'efficacité catalytique de l'enzyme est faible dans le cas de l'hydrolyse du TDP par la rénine-like (0,12), de même pour le rapport Kcat/Km, de $0.12 \cdot 10^{-6}$ /mol/min.

Cependant, des expériences réalisées avec la rénine humaine sur différents substrats montrent que l'activité catalytique (Kcat/Km) change en fonction du substrat utilisé (Corvol et Ménard, 1988). L'une des raisons expliquant ces résultats est la séquence de l'A_O elle-même. Celle-ci diffère en effet beaucoup des autres substrats au niveau des sites de clivage et de la liaison Leu¹⁰-Leu¹¹, par ses résidus situés du côté C terminal. Ceci est également valable pour la rénine-like. En effet, la partie N terminale du fragment de précurseur de l'AII-like possède le site de clivage Leu¹⁰-Leu¹¹ comme le TDP. Cependant, les acides aminés qui entourent ce site sont différents (X¹² W¹³ G¹⁴ vs V¹² Y¹³ S¹⁴) de ceux du TDP. De plus, on peut penser que le reste de la séquence du précurseur de l'AII-like joue un rôle important dans la spécificité de la rénine-like comme c'est le cas de l'affinité de la rénine humaine pour l'A_O.

En conclusion, nos travaux démontrent l'existence d'une enzyme de type rénine chez les Hirudinées. Ces résultats ont été validés récemment par Salzet et Stefano (1997a) puisqu'en se basant sur des critères biochimiques et en utilisant une colonne d'affinité pepstatine A-sepharose, ils ont pu l'isoler et déterminer ses 124 premiers acides aminés. L'enzyme présente 26.5 % d'identité de séquence avec les rénines de mammifères. Les séquences consensus DTGSS des aspartyl protéases qui entourent le site actif sont également présentes confirmant ainsi que la molécule isolée appartient à cette famille.

Figure: 18

MOLECULE APPARENTEE A L 'ACE

Comparaison de la séquence N-terminale de l 'ACE-like
de sangsue avec celles isolées dans le règne animal.

	1	23
Sangsue	G	LDPELSPGCFSADEAGAQLFAE
Insecte	LDPEIEEVISSRDHEELAYYWE	
Cochon d 'Inde sérum	LDPELQPG?	FSADEAGAQLFAQ
Homme End, SP	LDPGLQPGN	FSADEAGAQLFAQ
Homme (ACE somatique)	LDPGLQPGN	FSADEAGAQLFAQ
Rat (ACE somatique)	LDPGLQPGN	FSADEAGAQLFAD
Rat (Poumon)	LDPGLQPGN	FSADEAGAQLFAQ
Souris (ACE somatique)	LDPGLQPGN	FSPDEAGAQLFAE
Souris (Poumon, rein)	LDPGLQPGN	FPADEAGAQLFAQ
Bœuf (ACE somatique)	LDPALQPGN	FPADEAGAQLFAE
Lapin (ACE somatique)	LDPGLLP	GDFAADEAGARLFAE
Cochon (Rein)	LDPSALQPC	FATADEAGAQLFAQ

De plus, compte tenu qu'il existe chez la sangsue une molécule présentant la séquence de l'AI et le site de clivage Leu¹⁰-Leu¹¹, on peut émettre l'hypothèse du clivage *in vivo* par l'ACE-like, de la protéine de 19 kDa isolée du SNC de *T. tessulatum*, pour libérer l'AI. Les résultats obtenus *in vitro* ont confirmé cette hypothèse. Le taux de libération de l'AI est de 850 pmol AI/min/mg de rénine (Salzet et Stefano, 1997a).

Nos résultats plaident donc en faveur de l'existence d'une enzyme de type rénine bien conservée au cours de l'évolution. On pouvait penser qu'un système RAS complet conduisant à la libération des angiotensines actives était également présent chez la sangsue. Afin de valider cette hypothèse, la mise en évidence et la caractérisation biochimique d'une ou plusieurs molécules apparentées à l'ACE et capables de libérer de l'angiotensine active, s'avéraient nécessaires.

3) L'ACE-like

3-1) La structure de l'ACE

Chez les vertébrés, une des enzymes impliquées dans la conversion de l'AI en AII est une peptidyl dipeptidase connue sous le nom d'Angiotensine Converting Enzyme (ACE). Celle-ci est présente sous deux formes, une forme membranaire majeure et une forme soluble. En se basant sur les travaux réalisés chez les mammifères (Corvol *et al.*, 1995) et récemment chez les insectes (Lamango *et al.*, 1996), l'ACE membranaire de la sangsue a été purifiée. Elle présente en électrophorèse une masse moléculaire proche de celle de l'ACE testiculaire (ACEt) des mammifères (M=90-110 kDa) (Bernstein *et al.*, 1988 ; Ehlers *et al.*, 1992) ou de celle des insectes (M= 87 kDa) (Lamango et Isaac, 1994). Elle est cependant plus petite que celle issue des tissus somatiques (ACEs) de mammifères (M=150-180 kDa) (El-Dorry, *et al.*, 1982 ; Kenny et Ingram, 1987). Les ACE-like des insectes, des mollusques et des sangsues sont proches des ACE testiculaires, ce qui est en accord avec l'hypothèse de Langford *et al.*, (1991) et Lattion *et al.*, (1989). Ces auteurs ont proposé que l'isoenzyme testiculaire (plus petite) pourrait correspondre à la protéine codée par le gène ancestral qui a donné naissance chez les mammifères grâce à une duplication, au gène exprimé dans les cellules somatiques. Les faibles différences de masse observées entre l'ACE-like des sangsues, celle des insectes et l'ACE t des vertébrés, de même que la séquence peptidique de l'extrémité N-terminale de l'ACE de sangsue semblent confirmer cette hypothèse. En effet, la séquence N-terminale de l'ACE-like de sangsue présente 83% d'homologie avec les ACEt et 87% avec celle du cochon d'Inde isolée du sérum (Fig 18).

Arbre phylogénétique des ACE ayant un seul site catalytique

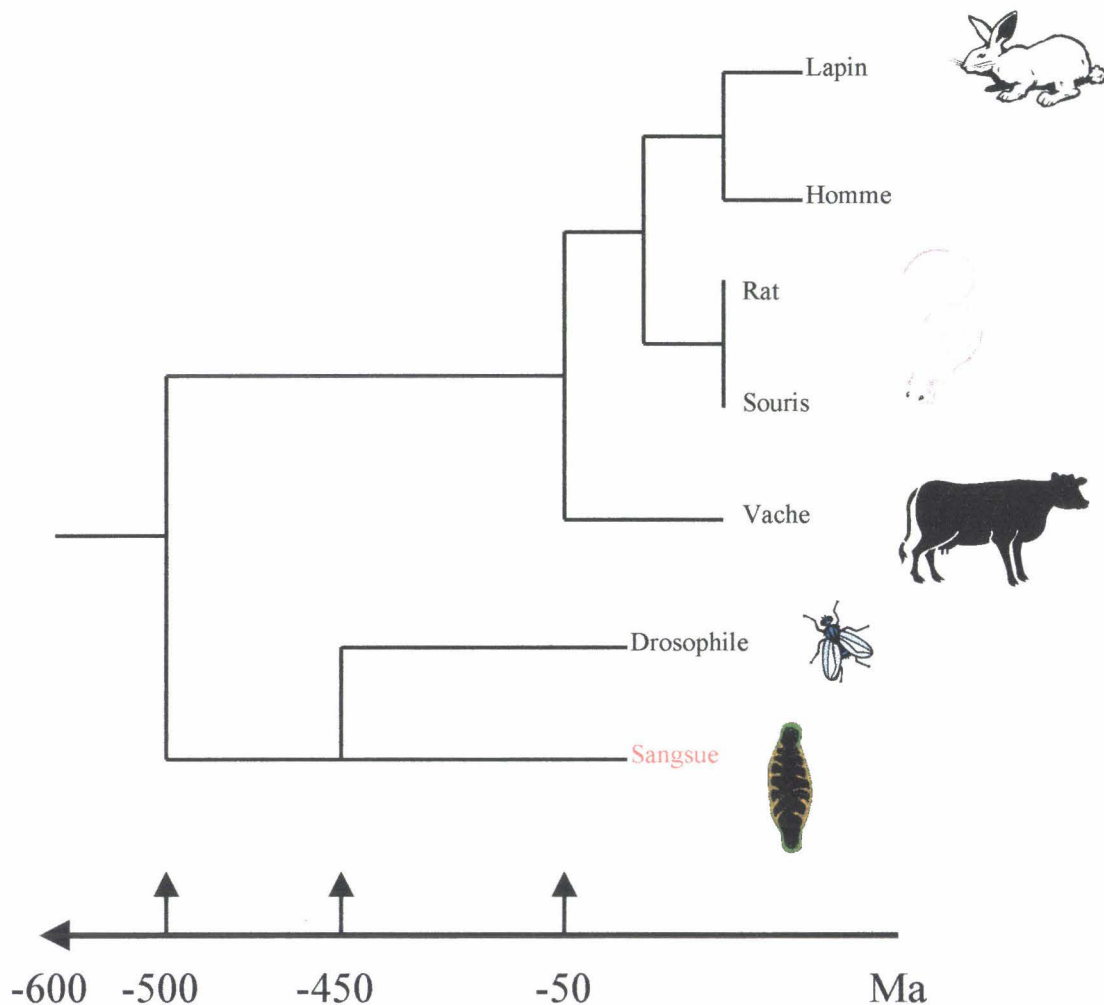


Figure 19: Dendrogramme représentant les ACE à un seul domaine catalytique.

Ce dernier a été réalisé à l'aide du programme informatique Genebee V.1 L'ACE de sangsue pourrait être sur la lignée évolutive ayant conduit aux ACEs à un seul domaine catalytique.

L'ACE des insectes divergerait de l'ACE de sangsues et aurait subi une duplication de son gène pour donner deux domaines identiques.

La comparaison de la séquence de l'ACE-like de sangsue avec celles des vertébrés (Fig 18) laisse apparaître des différences au niveau des acides aminés 4, 6, 9, 11, 22 et 23. L'ACE de sangsue présente sur sa partie N terminale 67% d'homologie avec toutes les ACE isolées du règne animal, reflétant donc une grande conservation de cette séquence au cours de l'évolution. Les différences qui opposent l'ACE de sangsue aux ACE des vertébrés peuvent être expliquées par l'existence de transitions génétiques. Une telle hypothèse a déjà été évoquée par Ryan *et al.* (1993) dans le cas de l'ACE du cochon d'Inde. En effet, celle-ci ne se différencie de l'ACE humaine que par deux résidus, l'un en position 4 et l'autre en position 22. Elle contient un acide glutamique à la place d'une glycine en position 4. Deux des 4 codons qui codent pour la glycine, GGA et GGG sont similaires à ceux codant pour l'acide glutamique, GAA et GAG. Une transition de G en A peut donc être suggérée. La même remarque peut être faite pour les résidus 6, 9 et 23 dans le cas de l'ACE-like de sangsue. En effet, les acides aminés en position 6 et 23, deux acides glutamiques dans l'ACE de sangsue, sont remplacés par des glutamines chez les vertébrés (Fig.18). Les codons GAA et GAG pour l'acide glutamique pourraient avoir subi une modification pour donner le codon GAC de la glutamine. Quant à l'acide aminé en position 9, l'isoleucine (codée notamment par CTA ou TTA), est remplacée par une asparagine (dont les codons sont CAA et TAA). On peut dans ce cas suggérer l'existence d'une transition de T en A. Notre hypothèse est confirmée par le fait que l'ACE de porc qui se différencie le plus des autres ACEs des vertébrés, présente une sérine en position 4, une alanine en position 5 et une cystéine en position 9 comme l'ACE de sangsue.

3-2) Aspect phylogénétique (Fig. 19)

Sur la base de l'ensemble des séquences d'ACE aujourd'hui connues, et en tenant compte à la fois de l'apparition des premiers coelomates triploblastiques (estimée à – 500 millions d'années), de la séparation entre les invertébrés et les vertébrés (estimée à – 270 millions d'années), nous proposons l'arbre phylogénétique de la figure 19. Il correspond à une modification de celui de Cornell, *et al.* (1995), pour l'ACE d'insectes. L'ACE-like de sangsue semble proche des ACE t ne possédant qu'un seul site catalytique (domaine C). En effet chez l'homme, les domaines N et C de l'ACE somatique sont très similaires et le fait que les exons 4-11 et 17-24 du gène de l'ACE humaine qui codent pour les domaines N et C soient vraiment proches en taille puis possèdent la même phase de codons au niveau des chevauchements introns-exons, indiquent que le gène ancestral de l'ACE est à un seul

domaine. On note par contre dans la séquence de l'ACE d'insecte, l'absence d'une région hydrophobe près de l'extrémité C terminale, ce qui diffère radicalement de l'ACE mammalienne. En outre, le gène de l'ACE de drosophile est beaucoup plus petit que le gène correspondant chez les mammifères. Il pourrait donc ressembler à la forme ancestrale qui aurait peut être déjà été dupliquée chez les insectes (Cornell, *et al.*, 1995). En effet, Taylor et son équipe ont montré qu'un deuxième gène est présent pendant l'embryogenèse, chez la drosophile. Il code pour une ACE-like apparemment soluble et à un seul domaine catalytique. Selon les auteurs, les deux ACE différentes de la drosophile sont codées par deux gènes issus de la duplication d'un gène ancestral et qui aurait subi ensuite une divergence. La duplication pourrait avoir eu lieu chez un ancêtre commun aux vertébrés et aux invertébrés, avant l'émergence des insectes. Cet événement aurait alors été suivi d'un réarrangement du gène, soit parmi les premiers vertébrés, soit parmi les espèces invertébrées précédant la classe des insectes.

Une deuxième hypothèse à envisager est que deux duplications indépendantes ont eu lieu, une première chez les invertébrés et une seconde parmi les vertébrés. Cette dernière hypothèse semble la plus vraisemblable. Cependant, un problème supplémentaire réside dans le fait que les deux ACEs de drosophile sont plus divergentes entre elles que les domaines N et C de l'ACE de mammifères. Cette différence pourrait refléter la pression supplémentaire de facteurs liés à l'évolution ou alors à un problème de purification (cette dernière hypothèse est peu probable car les deux copies sont soumises aux mêmes étapes de purification). Il semble plus vraisemblable que les deux copies soient le résultat d'une sélection favorisant différents rôles de l'enzyme dans l'organisme (Taylor, *et al.*, 1996).

L'ACE est une très ancienne molécule conservée au cours de l'évolution depuis au moins 500 millions d'années. L'ACE-like de sangsue et celle des mollusques sont également proches des ACE t à un seul domaine catalytique (le domaine C). De plus, elles doivent être issues d'un gène proche du gène ancestral qui a subi plus tard la duplication connue chez les vertébrés. Ce qui semble intéressant, c'est la présence d'une ACE-like unique à la fois sous forme membranaire et soluble chez la sangsue. La duplication observée entre les ACEs de la drosophile n'aurait peut être eu lieu qu'après la divergence des annélides et des mollusques, ce qui reste à démontrer. En effet Chez *Coenorhabditis elegans*, deux ACE viennent d'être mises en évidence mais elle apparaissent non fonctionnelles (Coates, communication personnelle).

3-3) La glycosylation de l'ACE

Les deux formes de l'ACE de sangsue : membranaire et soluble, analysées à l'aide de la technique de l'acide périodique de Schiff (APS) semblent appartenir à la famille des glycoprotéines. Les propriétés de certains types de polysaccharides peuvent entraîner des modifications de la voie de synthèse de la protéine glycosylée ou encore la durée de sa demi-vie. Les résultats obtenus chez les vertébrés permettent de mesurer l'importance d'une telle variation de structure des protéines, pouvant entraîner la répartition de glycoprotéines distinctes selon les tissus. Les différences de taille propres à chaque type d'enzyme (ACE s ou ACE t par exemple) seraient essentiellement dues à la glycosylation. En effet, les structures primaires indiquent que l'ACE pulmonaire (l'ACE p) contient 11 sites potentiels de N-glycosylation et l'ACE t : 5 (Kumar *et al.*, 1989 ; Thekkumkara *et al.*, 1992).

L'ACE t possède des sites potentiels de O-glycosylation constitués par un groupe de thréonines du côté N terminal. L'ACE nouvellement synthétisée acquiert les deux types de glycosylation (O et N) avant son clivage et sa sécrétion. Un blocage complet de la glycosylation entraîne un rapide « turn-over » intracellulaire d'ACE sous glycosylée. Cependant, l'ACE synthétisée sans glycosylations (N ou O) peut subir un transport puis un clivage et une sécrétion normaux. La protéine sous ou non glycosylée est donc une enzyme active. La glycosylation joue peut être un rôle dans le transport de l'ACE lors du processus de sécrétion mais n'affecte pas directement le clivage / sécrétion de l'enzyme. Les ACEs partiellement glycosylées (sans O-glycosylation) sont donc stables et peu susceptibles de subir une protéolyse. Les chaînes oligosaccharidiques de l'ACE semblent tout de même nécessaires au niveau du réticulum endoplasmique pour la protéger d'une dégradation protéolytique. Ceci est particulièrement vrai pour les chaînes N-oligosaccharidiques. D'autre part, les résidus glycosyl- très nombreux sur l'ACE pourraient conférer un accès différent aux sites de protéolyse.

La glycosylation post-traductionnelle est dépendante de l'organe où l'ACE est produite. Dans certains cas, les changements de glycosylation de l'ACE lui confèrent des propriétés biochimiques différentes (Bevilacqua, *et al.*, 1996). Finalement, divers travaux montrent que les deux types de glycosylations n'interviennent pas pour le « folding » propre à l'ACE t qui conduit à la forme enzymatique active (Hooper et Turner, 1987).

3-4) Forme soluble de l'ACE et sa sécrétase

Chez la sangsue, les résultats obtenus lors de l'isolement de l'ACE-like en utilisant le Triton X-114 suggèrent que cette enzyme est facilement solubilisée des membranes (Fig 20). De ce fait, il est difficile de garder cette protéine dans sa conformation originelle. Comme l'ont montré Turner et Dowdall (1984) chez *Torpedo marmorata*, une protéase sensible à l'EDTA et à la 1, 10 phénanthroline est associée aux préparations de membranes et pourrait jouer le rôle de sécrétase vis à vis de la molécule apparentée à l'ACE.

Chez les mammifères, cette enzyme libère l'ACE soluble de l'ACE membranaire après clivage au niveau d'une séquence « stalk » de 11 résidus située à 3 résidus du domaine proximal extracellulaire et à 8 résidus de la membrane plasmique. La sécrétase ne coupe que si le substrat est ancré à la membrane. Elle ne clive l'enzyme que si la séquence « stalk » est respectée et non pas, par rapport à une distance définie de la membrane plasmique. Enfin, la sécrétase semble se positionner elle-même par rapport au domaine proximal extracellulaire de l'ACE mais une accommodation spatiale des protéines est nécessaire pour avoir une orientation appropriée du squelette peptidique dans le site actif (Hooper, Karran et Turner, 1997). Une protéase similaire pourrait également exister au niveau des membranes plasmiques des insectes. Elle serait donc responsable de la solubilisation des ACE-like des invertébrés.

Chez le lapin, on trouve une forme soluble active de l'ACE dépourvue de queue C terminale. Elle est présente dans beaucoup de fluides corporels et même dans le sérum. Ainsi, plusieurs modifications post-traductionnelles interviennent au cours de la biosynthèse de l'ACE. La liaison peptidique clivée lors de ce processus a été identifiée en séquençant les résidus N terminaux de la queue C terminale purifiée. Celle-ci reste dans la cellule après sécrétion de l'ACE et des résidus C terminaux de l'ACE t. Le clivage peut intervenir à deux niveaux différents. La coupure principale se fait entre l'arginine⁶⁶³ et la sérine⁶⁶⁴, et le clivage alternatif mineur se déroule entre l'arginine⁶⁷³ et la valine⁶⁷⁴. Beldent et collaborateurs (1995) ont montré que l'ACE p (pulmonaire) humaine présente dans le plasma ou dans le milieu de cellules CHO transfectées, était également sécrétée par clivage. Dans ce cas il se produit après l'arginine 1137, un résultat qui laisse prévoir que le fragment COOH terminal restant au niveau de la membrane aurait une taille de 14 kilobases. Par conséquent, il est possible que le premier clivage produise une queue C terminale de 8 kilobases à la fois chez l'homme et le lapin et que la protéine extracellulaire soit clivée une seconde fois du côté

C terminal pour l'ACE p humaine et pas chez le lapin (Beldent, *et al.*,1995 ; Ramchandran, et Sen, 1995 ; Ramchandran, *et al.*,1996).

On observe plusieurs sites de clivage pour la sécrétase dans la séquence de l'ACE de lapin et ceux-ci diffèrent du site de clivage majeur de l'ACE humaine. Ces différences pourraient être dues à la présence de sites potentiels de N-glycosylation en ce qui concerne l'ACE humaine. Les auteurs montrent que les ACE t d'un coté, et l'activité sécrétase de l'autre, sont colocalisées au niveau membranaire. Pourtant, si le clivage protéolytique de l'ACE se passe au niveau de la membrane plasmique, on ne peut exclure la possibilité de clivages intervenant dans un compartiment spécialisé de vésicules à proximité de la membrane plasmique via un processus de dégradation / recyclage comme cela a été décrit pour l'APP (α -Amyloide protein precursor)(Haass, *et al.*,1993 ; Beldent, *et al.*, 1995).

Chez les invertébrés, le même processus a été démontré. Les études réalisées chez *M. domestica* (Lamango, et Isaac, 1994) montrent que l'ancrage à la membrane de l'ACE et sa région cytosolique sont nécessaires pour que le clivage protéolytique se fasse au niveau de la membrane plasmique. Il est également possible qu'une partie du domaine N terminal près de la membrane, interagisse avec la partie de l'ACE accessible aux protéases. Cette région est située entre la fin de la partie globulaire du domaine C et le domaine transmembranaire hydrophobe. L'autre possibilité est que le domaine N prenne lui-même la conformation de la sécrétase (ancrée elle aussi à la membrane) par des interactions protéines-protéines.

Une température élevée et/ou un milieu très alcalin et certainement d'autres facteurs, provoquent un changement de conformation de l'enzyme créant un pont qui relie les deux domaines catalytiques. La structure de l'enzyme modifiée devient alors accessible aux protéases. Le site de clivage a été identifié au site Arg¹¹³⁷-Leu¹¹³⁸. Si on change l'arginine¹¹³⁷ en glutamine, on ne modifie pas le processus. La sécrétase peut donc s'accommoder du changement sinon elle utilise un site alternatif de clivage. Il semble que la sécrétase soit un partenaire flexible. D'autre part, deux familles de sécrétases pourraient exister. Elles posséderaient des domaines catalytiques similaires à ceux des enzymes (ectopeptidases) de types I (ex : l'ACE) et II (ex : la NEP) et ne cliveraient que les protéines qui leurs sont topologiquement corrélées. Le clivage protéolytique de protéines transmembranaires apparaît en fait limité à celles de type I et II, dans lesquelles le site de clivage est généralement proche de la surface membranaire. De cette façon, la majeure partie de la protéine est libérée dans le milieu extracellulaire généralement sous sa forme fonctionnelle.

Dans le cas d'une interaction protéine-protéine le domaine N terminal de l'ACE pourrait affecter la conformation de la sécrétase elle-même membranaire. Le domaine N

Figure 20:

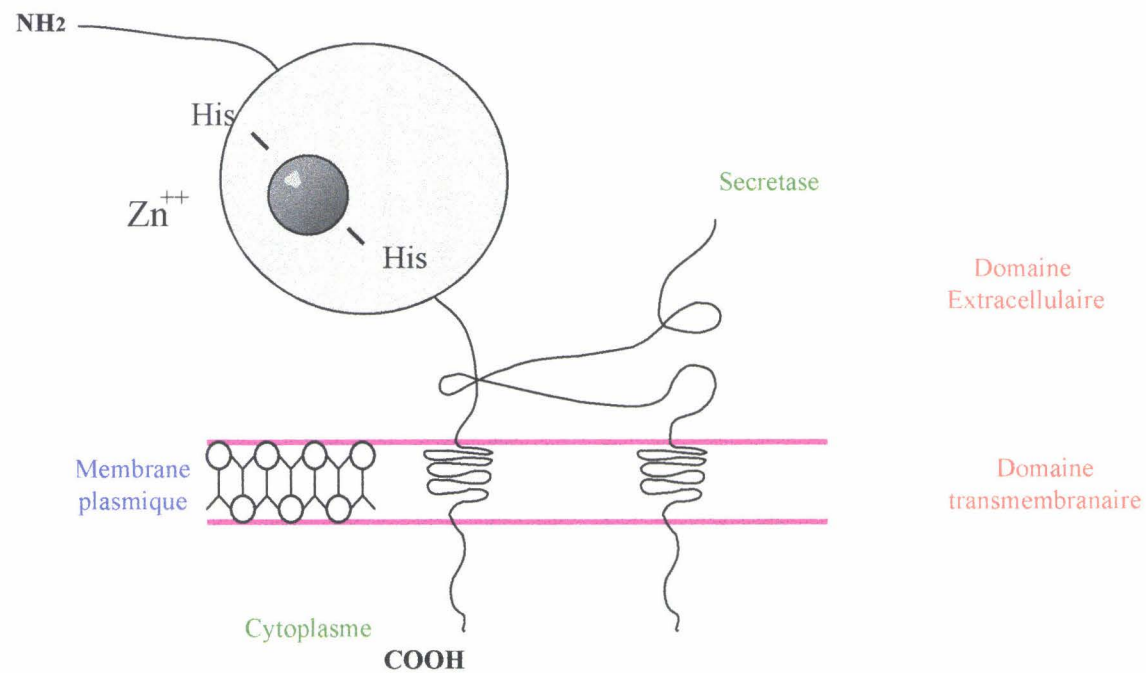


Schéma de l'ACE-like de *Theromyzon tessulatum* et de l'action possible d'une sécrétase.

terminal pourrait agir comme un inhibiteur conformationnel de la solubilisation protéique via des interactions structurales entre la partie « stalk » de l'ACE et la sécrétase elle-même. On peut en effet concevoir un changement de conformation au niveau du site de clivage de l'ACE conduisant à une solubilisation croissante de l'ACE dans certaines circonstances biologiques (Beldent, *et al.*, 1995 ; Ehlers, *et al.*, 1996). Le récent clonage de l'ACE de la drosophile par Cornell et collaborateurs en 1995, a montré que le gène codant cette enzyme membranaire peut également coder une forme plus hydrophile et ceci sans avoir recours à une sécrétase comme chez les vertébrés (Ramchandran et Sen, 1995).

L'ACE-like de sangsue existe sous deux formes : une ACE membranaire et une ACE soluble de plus petite taille, mais seul le séquençage du cDNA de l'ACE de sangsue permettra de conclure quant à sa nature et à son mécanisme de solubilisation (Fig 20). La mise en évidence d'une activité sécrétase chez la sangsue, pourrait être réalisée si l'on tient compte des propriétés biochimiques de cette enzyme sensible à l'EDTA et à la 1, 10 phénanthroline. On sait que l'inhibition de la sécrétase due à l'EDTA est réversible lorsqu'on ajoute du magnésium, du zinc ou encore du manganèse. Son activité est inhibée par des inhibiteurs particuliers : le TAPI-2, le BB94 (batimastat) et le BB2116. Le BB94 est très efficace et également plus spécifique que les autres inhibiteurs. On sait également que l'ACE des vertébrés est colocalisée avec sa sécrétase et que cette dernière peut être libérée sous une forme active de la membrane, par l'action de la trypsine. On pourrait donc utiliser les propriétés biochimiques de la sécrétase et ses inhibiteurs spécifiques pour l'étudier chez *T. tessulatum*.

Toutes ces données, devraient permettre de faire la lumière sur la nature exacte du processus de solubilisation de l'ACE-like chez les Hirudinées. Les deux formes soluble et membranaire existent au niveau des neurones et des cellules gliales du système nerveux central, ainsi qu'au niveau de l'aire neurohémale (Vandenbulcke *et al.*, 1997). En microscopie électronique on observe la présence d'ACE-like à la fois dans les neurones, en périphérie des granules de sécrétion et dans l'aire neurohémale. Ces résultats laissent supposer l'existence de deux ACE : une membranaire et une circulante. La présence de ces deux enzymes permet de penser qu'elles ont peut être des rôles distincts. Le rôle d'endopeptidase est le mieux connu concernant cette enzyme. Nos résultats confirment ce rôle pour l'ACE de sangsue et l'ACE de *Mytilus edulis* (Laurent, *et al.*, 1997).

3-5) Activité des ACE-like

3-5-1) Propriétés des ACE-like

Les propriétés conservées au cours de l'évolution comme l'activation de l'ACE par le chlore et la forte affinité de cette enzyme pour la bradykinine, semblent confirmer l'homologie de l'ACE-like avec l'ACE testiculaire. L'effet du NaCl sur l'activité de l'ACE dépend de la nature du substrat et du pH auquel l'expérience est réalisée (Shapiro, *et al.* 1983a ; Shapiro, *et al.*, 1983b ; Bunning, *et al.*, 1983 ; Bunning, *et al.*, 1990 ; Wei, *et al.*, 1991 ; Jaspard, *et al.*, 1993). Or, l'activité de l'ACE-like est strictement dépendante de la présence de Cl⁻ comme l'ACE de l'insecte et celles des vertébrés (Bénéteau-Burnat, *et al.*, 1994). Elle est maximale pour une concentration de 0.3 M NaCl comme dans le cas des ACE t. Cela semble résulter des changements de conformation après la fixation du Cl⁻ à une lysine critique qui stabilise le complexe enzyme-substrat.

Les conditions optimales de l'activité de cette enzyme sont une température de 37° C et un pH de 8.4. Cependant, elle reste active à basse température. Cela peut s'expliquer de la même façon que pour la rénine. *T. tessulatum* est une sangsue capable de vivre en eau froide et cette enzyme doit donc travailler à basse température. Des résultats similaires ont été obtenus chez les poissons arctiques *Chionodraco hamatus* et *Pagothenia bernachii* (Uva, *et al.*, 1992). Finalement, les essais de l'activité de l'ACE-like en présence d'EDTA et d'ions métalliques bivalents confirment que cette enzyme est une « Zincin » métallopeptidase. Comme les ACEs des vertébrés et des insectes, celle de la sangsue est capable de cliver le substrat : Bz-Gly-His-Leu en deux peptides : Bz-Gly et His-Leu avec une activité spécifique de 1.5 +/- 0.45 nmol de Bz-Gly/min/mg. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le rein ou le plasma des poissons arctiques (Uva, *et al.*, 1991 ; Uva, *et al.* ; 1992). Cependant, ces valeurs sont inférieures à celles obtenues chez l'insecte *M. domestica* (7.61 nmol/min/mg) (Lamango et Isaac, 1994) ou chez les mammifères (ca 10 nmol/min/mg) (El-Dorry, 1982 ; Corvol *et al.*, 1995). La valeur de Km (3.35 mM) qui représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat est proche de celle de *M. domestica* (1.91 mM) (Lamango et Isaac, 1994) ou de celles des ACE circulantes de mammifères provenant des tissus endothélial et testiculaire.

La détermination des paramètres cinétiques de l'ACE-like de sangsue révèle une activité spécifique élevée vis à vis de l'AI. En revanche, son Km (830 µM) est très supérieur à ceux relevés avec les ACE mammaliennes (10-50 µM) suggérant une affinité faible pour l'AI.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat : (1) soit l'AI n'est pas le principal substrat de l'ACE-like ; (2) soit l'activité enzymatique a été modifiée au cours des différentes étapes de purification. Cependant, le rapport K_{cat}/K_m ($153 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) de l'ACE-like correspondant à son activité de catalyse est proche de celui des ACE de mammifères ($147\text{-}189 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), ce qui démontre une grande efficacité de l'ACE-like vis à vis de l'AI. Ce résultat vient renforcer de récentes études immunocytochimiques obtenues avec l'anti-AI et l'anti-AII au niveau du cerveau de *T. tessulatum*. Peu de cellules immunoréactives à l'anti-AI ont été détectées par opposition au grand nombre de neurones contenant de l'AII mis en évidence dans le cerveau de cette sangsue (Salzet *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent un clivage rapide de l'AI en AII par l'ACE de *T. tessulatum* et notamment après un repas de sang. En effet, à ce stade le taux d'AII augmente de façon significative (Salzet *et al.*, 1992).

D'autre part, on peut suggérer que l'ACE de sangsue possède un rôle d'endopeptidase qui s'étendrait, comme dans le cas de l'ACE de vertébrés, au métabolisme de beaucoup de peptides dont l'extrémité C terminale est bloquée par une amidation : RF amide (Salzet *et al.*, 1994a), lysine conopressine (Salzet, *et al.*, 1993a) ou γ MSH-like (Salzet *et al.*, 1994b). L'amidation C terminale de tels peptides semble indispensable à leur activité biologique et l'hydrolyse au niveau d'un site proche de l'extrémité C terminale conduit à leur inactivation. Une hydrolyse significative par l'ACE-like a été observée dans le cas de la D[Ala²-Leu⁵] enképhaline (DALA) (K_{cat}/K_m : $12 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), du substrat Bz-GHL (K_{cat}/K_m : $148 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) et de la bradykinine (K_{cat}/K_m : $2200 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour l'ACE des vertébrés (Corvol *et al.*, 1995) et celle des insectes (Lamango *et al.*, 1996).

Les deux formes, soluble et membranaire, montrent des activités comparables. Il nous semble donc difficile de savoir si elles jouent toutes les deux un rôle d'endopeptidase. Cependant, les données récentes montrent l'existence d'un site de protéolyse à l'ACE au niveau du précurseur de 11 kDa (isolé du système nerveux central) contenant le peptide apparenté à l'AI (Laurent *et al.*, 1995a). Quant au précurseur apparenté à la POMC isolé à partir des cellules immunitaires, il possède l'AII du côté C terminal. Celle-ci est flanquée d'acides aminés hydrophobes qui sont des sites protéolytiques spécifiques à cette enzyme (Salzet *et al.*, 1997a). L'étude de l'hydrolyse *in vitro* de cette molécule par l'ACE-like n'a pas encore été réalisée. On ne peut donc pas conclure quant à l'action de l'ACE-like sur la POMC.

En résumé, si cette enzyme peut convertir l'AI en AII, elle peut également agir comme une endopeptidase en dégradant d'autres peptides actifs comme les enképhalines. Ceci d'autant plus que la forme circulante semble prédominante. Cette hypothèse est étayée par le fait que deux peptides : Phe-Leu et Phe-Met qui proviennent des peptides Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu et Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, ont été isolés durant la purification d'enképhalines à partir de cerveaux de *T. tessulatum* (Salzet *et al.*, 1995b). Cette enzyme montre une préférence pour les liaisons impliquant des acides aminés hydrophobes : Leu, Trp, Tyr et plus particulièrement Phe.

L'ACE de *T. tessulatum* clive par ailleurs, la D [Ala², Leu⁵] enképhaline (DALA) en deux peptides, le Tyr-D-Ala-Gly et le Phe-Leu avec une activité spécifique élevée de 10.5 nmol de Tyr-D-Ala-Gly/min/mg. Cette enzyme est sensible à un inhibiteur de métalloprotéases : le phosphoramidon, mais elle n'est inhibée qu'à 40 %. En revanche le captopril, un inhibiteur de l'ACE des mammifères l'inhibe presque complètement (80 %, $I_{c50} = 200$ nM). Cette inhibition est totale lorsqu'on ajoute au captopril 10 μ M de phosphoramidon. La valeur de l' I_{c50} est comparable à celle de l'insecte *Musca domestica* (400 nM) mais est 100 fois inférieure à celle de l'ACE du rein de porc (Turner *et al.*, 1987). Ceci pourrait être dû aux sous sites de l'enzyme qui interagissent avec l'inhibiteur. Le mélange de différents inhibiteurs montre qu'ils ont un effet additif avec 95 % d'inhibition pour le clivage de Gly³-Phe⁴ contre 40 % pour le phosphoramidon seul (10 μ M) et 70 % pour le captopril seul (10 μ M).

Contrairement à ce que l'on imagine souvent, les interactions entre un substrat naturel (par ex. la met-enképhaline) et ses peptidases ou ses récepteurs ne sont pas nécessairement optimisées, c'est à dire que de nombreux sites susceptibles d'être occupés restent libres. Dans ces conditions, les petites molécules synthétiques que sont les inhibiteurs même si elles n'occupent pas tous les sites d'une protéine, ont parfois des affinités et des sélectivités élevées car toutes les interactions stabilisatrices sont satisfaites. C'est vraisemblablement le cas du captopril. Nos résultats montrent que l'activité de l'enzyme purifiée présente une grande ressemblance avec celle de l'ACE des mammifères (El-Dorry *et al.*, 1982) et celle de l'ACE-like des insectes (Ng et Vane, 1967 ; Lamango et Isaac, 1994 ; Cornell *et al.*, 1995 ; Lamango *et al.*, 1996 ; Nyberg, *et al.*, 1997).

3-5-2) Inhibition naturelle de l'ACE-like

De récents travaux effectués au laboratoire, ont montré l'existence d'un nouveau neuropeptide : le Leech Osmoregulator Factor (LORF)(Salzet *et al.*, 1996a,d ; 1997d). Ce peptide exerce un effet antidiurétique chez *T. tessulatum* et serait un des facteurs responsables de la prise d'eau consécutive au troisième repas. Ce peptide est présent dans le cerveau humain et du rat (Salzet *et al.*, 1997d). Le LORF dont la séquence est IPEPYVWD amide est un substrat à la fois pour l'ACE et pour la NEP. Quand il est clivé, le térapeptide libéré : IPEP semble inactiver ces enzymes comme le font les MIF (PLG-amide) ou les Tyr-MIF (YPLG-amide) (Kastin, *et al.*, 1994). Ce résultat met pour la première fois en évidence, l'existence d'inhibiteurs naturels pour les métallopeptidases chez les invertébrés.

Chez les vertébrés, il existe une régulation naturelle de l'ACE. Elle est en fait neutralisée de façon significative par des inhibiteurs naturels apparentés aux peptides opioïdes, dérivés de l'hémoglobine : les hémorphines (Cerpa-Poljak, *et al.*, 1997), casomorphines (Meisel, 1997). Cette inhibition serait en partie responsable de l'effet hypotenseur observé après des exercices physiques soutenus. Lors d'un repas de sang, la sangsue absorbe une quantité de sang qui peut entraîner une augmentation énorme du volume (dans un rapport de 1 à 10) de l'animal. Le RAS intervient alors pour libérer l'Angiotensin II peptide diurétique, qui participe à la régulation du rejet massif de l'eau et des ions en excès contenus dans le sang ingéré. Or, ce sang pourrait contenir des hémorphines. Il serait intéressant de voir si ces opioïdes particuliers peuvent agir chez la sangsue par un feedback négatif sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

4) La molécule apparentée à la Neutral Endopeptidase (NEP) : NEP-like

4-1) Structure de la NEP-like

L'endopeptidase neutre (NEP) est une endopeptidase impliquée dans le clivage de nombreux oligopeptides au niveau de l'extrémité N terminale de leurs résidus hydrophobes (Phe, Leu, Trp, Tyr et en particulier la phénylalanine (Phe)). Chez la sangsue, l'enzyme apparentée à la NEP est responsable de l'hydrolyse de la D [Ala²-Leu⁵] enképhaline. Elle intervient au niveau de la liaison Gly³-Phe⁴ pour donner les peptides Tyr-D-Ala-Gly et Phe-Leu. Cette activité est inhibée par le phosphoramidon, un inhibiteur puissant de l'endopeptidase neutre. Cet inhibiteur est un métabolite de *Streptomyces* et a d'abord été identifié comme celui de la thermolysine, enzyme dont la NEP est assez proche du point de vue de sa structure. En l'absence d'épiamastatine (un inhibiteur spécifique de l'aminopeptidase neutre) pendant l'incubation, le dipeptide Phe-Leu est hydrolysé par une aminopeptidase présente dans l'extrait de sangsue. D'autre part, l'enzyme apparentée à l'endopeptidase neutre ne clive pas le substrat chromogénique spécifique de l'ACE-like, le Bz-GHL, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur de l'existence de deux enzymes distinctes : l'ACE-like et la NEP-like chez *T. tessulatum*.

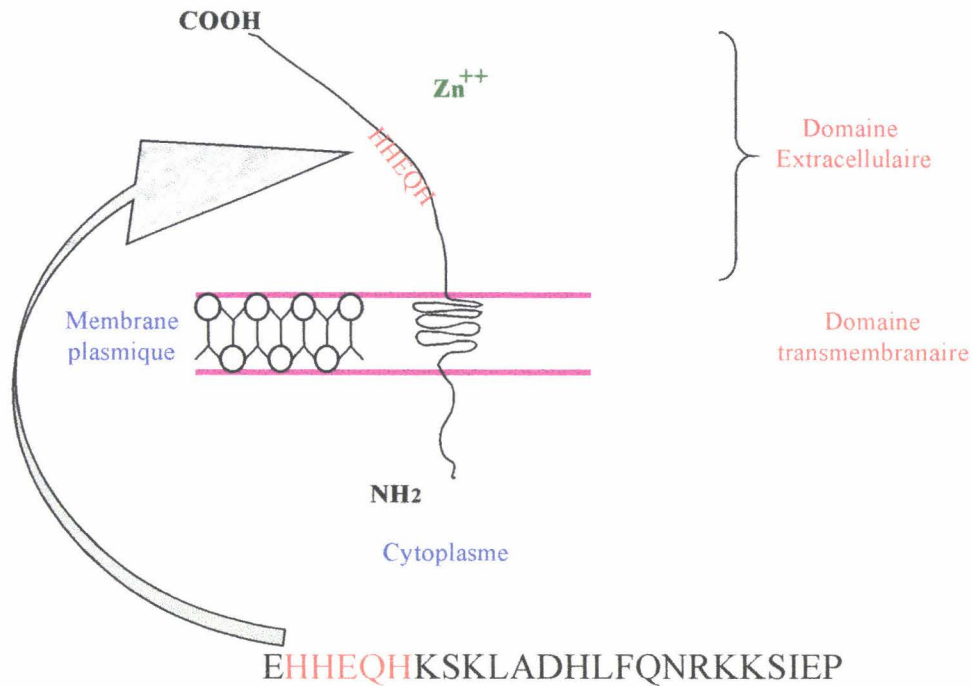
Cette mise en évidence d'une NEP-like chez la sangsue a été suivie de son isolement. L'enzyme pure présente une masse moléculaire d'environ 45 kDa en électrophorèse SDS-PAGE. Elle est donc plus petite que la NEP isolée du rein des mammifères (de 94 kDa). En dépit de ce résultat, la NEP-like semble similaire à l'endopeptidase neutre. Elle est présente dans le surnageant après l'extraction au Tris/NaCl, ce qui suggère qu'elle est ancrée à la membrane plasmique des cellules par une courte chaîne hydrophobe. Chez les vertébrés, ce domaine hydrophobe est situé à l'extrémité N terminale alors que le domaine C terminal glycosylé et extracellulaire contient le site actif dépendant du zinc (Erdos et Skidgel, 1989).

En ce qui concerne la NEP-like, sa structure peptidique sera entièrement obtenue par microséquençage utilisant la dégradation automatique d'Edman. En premier lieu, 20 résidus d'un fragment de la séquence N terminale du domaine extracellulaire ont été déterminés : **EHHEEQKSKLADHLFQNRKKSIEP** (Fig 21). La molécule purifiée chez la sangsue *T. tessulatum* correspond à la protéine soluble compte tenu de son mode de purification (utilisation du détergent Triton X 114). Elle comporte une séquence consensus de type

HEXXH, présente dans l'endopeptidase neutre au niveau du site actif de l'enzyme. En effet on retrouve dans la NEP-like les deux histidines nécessaires à la fixation du zinc et l'acide glutamique impliqué dans l'activité catalytique. En outre, son activité enzymatique est similaire à celle de la NEP des vertébrés vis à vis de substrats tels que les enképhalines. Elle est de plus inhibée de façon efficace par le phosphoramidon. Sa taille fait la moitié de celle des mammifères mais elle est comme celle-ci, ancrée à la membrane plasmique par une courte chaîne hydrophobe. On peut donc proposer le schéma suivant de sa structure (Fig 21).

Ces résultats nous permettent d'envisager un lien de parenté de la NEP-like avec les Endothelin-Converting Enzyme (ECE), impliquées non seulement dans le métabolisme de l'endothéline mais également dans celui de neuropeptides comme la bradykinine, ce qui montre l'importance de la complémentarité des activités enzymatiques de la NEP et de l'ACE (Turner et Tanzawa, 1997).

Figure 21 :



Structure de la NEP-Like

4-2) Activité de la NEP-like

L'activité de l'enzyme est optimale à pH neutre et à 37° C. En effet, l'incubation de la NEP avec son substrat à 37° C entraîne la libération de 80 % des peptides après 15 minutes. Cependant, elle reste active à 4° C. Ceci peut s'expliquer de la même façon que pour la rénine-like et l'ACE-like. La sangsue *T. tessulatum* est un animal qui vit en eaux froides, son métabolisme y est donc adapté.

L'enzyme pure clive le D [Ala²-Leu⁵] enképhaline (DALA) avec une activité spécifique de 29 nmol de Tyr-D-Ala-Gly par minute et par mg de protéine, et un Km de 95 μM. L'utilisation du phosphoramidon permet de bloquer la réaction à 80 % avec un Ic50 de 0.1 μM. Cette valeur est comparable à celle du criquet *S. gregaria*, mais elle est supérieure à celle de la NEP mammalienne (Ic50 = 2 nM). Ces données laissent penser que l'on est en présence d'une enzyme proche de l'endopeptidase neutre. Chez les invertébrés, des molécules apparentées à la NEP ont été isolées de *S. gregaria* (Isaac, 1988), d'*Astacus*, de *Limulus* et de

Mytilus (Coletti-Previero, *et al.*, 1985 ; Leung, *et al.*, 1992), mais également d'*Ascaris* (Sajid et Isaac, 1995). Leurs activités sont comparables à celles de la molécule apparentée à l'endopeptidase neutre chez la sangsue.

Chez les Hirudinées, les enképhalines ont été isolées et séquencées (Salzet *et al.*, 1995a). On peut donc supposer que l'enzyme proche de l'endopeptidase neutre trouve dans ces peptides, un substrat privilégié. Cette hypothèse est en accord avec la présence dans le cerveau de *T. tessulatum*, des dipeptides Phe-Leu et Phe-Met issus de la dégradation des enképhalines (Salzet *et al.*, 1995a). En outre, d'après ce que l'on connaît chez les vertébrés la NEP-like doit être capable d'hydrolyser un certain nombre de neuropeptides et hormones comme les angiotensines, la substance P, la bradykinine, l'ocytocine et la vasopressine (Erds et Skidgel, 1989). De plus, Turner et Tanzawa (1997) n'hésitent pas à la qualifier de « cholinestérase » des synapses peptidergiques. Knight et Klee (1978) ont montré par ailleurs que les enképhalines sont également soumises à une dégradation par une aminopeptidase associée aux membranes contenant les récepteurs aux opioïdes. Cette catalyse par l'aminopeptidase est responsable de la courte durée d'action des enképhalines (Knight et Klee, 1978). Une molécule apparentée à l'aminopeptidase neutre des mammifères a également été mise en évidence dans le système nerveux de la sangsue et pourrait intervenir dans le métabolisme des enképhalines (Laurent, *et al.*, 1996b).

4-2-1) La NEP-like et le système nerveux

Chez la sangsue la NEP-like agit comme une endopeptidase, elle doit être capable de cliver l'AI. C'est ce que notre étude a confirmé. La NEP-like clive l'AI au niveau de Phe⁸-His⁹ pour donner l'AII et le dipeptide His-Leu avec une activité spécifique de 1.23 nmol d'AII/min/mg de protéine et un Km de 330 µM. De plus, des résultats supplémentaires obtenus à partir de cerveaux de *T. tessulatum*, montrent que la NEP-like dégrade ensuite l'AII au niveau de Tyr⁴-Ile⁵ pour donner les fragments 1-4 et 5-8 de l'AII. Néanmoins, la comparaison entre les activités spécifiques de la NEP-like vis à vis de l'AI et de la D[Ala²-Leu⁵] enképhaline indique que l'enzyme entre de préférence dans le métabolisme des enképhalines plutôt que dans celui des angiotensines. Cela constitue un argument supplémentaire en faveur de l'existence de la NEP-like. Par ailleurs, les valeurs de Km obtenues pour l'AI et la D [Ala²-Leu⁵] enképhaline sont en accord avec celles de la NEP contenue dans le cerveau de porc vis à vis de substrats comme la bradykinine (92 kDa) et la substance P (32 kDa) (Stephenson et Kenny, 1987). L'endopeptidase 24.11 possède en fait

une spécificité fortement orientée. L'affinité de l'enzyme est très élevée pour la substance P et les enképhalines et très faible pour l'angiotensine, la cholécystokinine et la neurotensine (Turner *et al.*, 1985 ; Schwartz *et al.*, 1986). Les neuropeptides isolés jusqu'à présent chez la sangsue et qui peuvent constituer des substrats de la NEP-like, incluent l'AI (Laurent *et al.*, 1995a), l'AII-amide (Salzet *et al.*, 1995a), les RF-amides (Salzet *et al.*, 1994a), les enképhalines (Salzet *et al.*, 1995b) la γ MSH-like (Salzet *et al.*, 1994b) et la lysine-conopressine (Salzet *et al.*, 1993a). L'endopeptidase-like apparaît donc impliquée dans le métabolisme de ces neuropeptides variés et la présence dans le SNC, des produits de dégradation des enképhalines et des angiotensines confirme cette hypothèse.

D'autre part, les travaux réalisés au laboratoire chez *T. tessulatum*, ont permis d'isoler 3 précurseurs de peptides opioïdes à partir de cellules immunitaires : une POMC-like (Salzet *et al.*, 1997a) une prodynorphine-like (Salzet et Stefano, 1997b) et une proenképhaline-like (Fig 22) (Salzet et Stefano, 1997e). Les récentes études de la maturation de ces précurseurs ont montré l'implication possible d'au moins la NEP-like dans la libération de différents peptides dont la met-enképhaline. Ces nouvelles données viennent renforcer l'hypothèse de l'implication d'un certain nombre d'enzymes dans la maturation des précurseurs de neuropeptides chez un animal aussi primitif que *T. tessulatum*. Il est important de noter que cette enzyme est située dans le système nerveux central de la sangsue, comme l'ACE. Chez les vertébrés, elle a longtemps été référencée comme la protéinase neutre des bordures en brosse du rein. Or, elle possède un rôle intéressant dans le cerveau des mammifères puisqu'elle intervient dans l'exocytose de neurotransmetteurs (De La Baume, *et al.*, 1982), l'inactivation physiologique des enképhalines et de la substance P (Schwartz, *et al.*, 1981 ; Kenny et Ingram, 1987). Enfin, elle semble présente au niveau des jonctions neuromusculaires de mammifères. Il est généralement admis que l'endopeptidase 24.11 est présente dans la membrane plasmique de la cible (Marcel, *et al.*, 1990 ; Barnes, *et al.*, 1992). Cependant, d'après Barnes et collaborateurs (1992) l'enzyme pourrait également être présente en position présynaptique. Dans le cerveau de sangsues, l'endopeptidase 24.11-like pourrait donc jouer un rôle tout aussi important dans le métabolisme de divers neuropeptides en collaboration avec l'ACE-like et l'aminopeptidase mise en évidence dans une autre étude (Laurent et Salzet, 1996b). Ceci est illustré par le cas du RAS où la production de l'AII par l'ACE peut être relayée par la NEP-like chez la sangsue comme chez les vertébrés.

Chez les vertébrés, les enképhalines, peptides endogènes produiraient des effets analgésiques par une interaction avec leurs récepteurs des neurones nociceptifs de la corne dorsale de la moelle. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la NEP (thiorphan,

phosphoramidon, kétorphan) en mélange, entraînent une augmentation importante de la concentration endogène des enképhalines qui agiraient à la fois sur les récepteurs δ et μ en induisant des effets analgésiques très importants (Lecomte, *et al.*, 1986). Elles agiraient plus spécifiquement sur les comportements émotionnels contrôlés par les récepteurs δ . On constate que la distribution de la NEP est parallèle à la distribution des récepteurs aux opiacés dans le système nerveux central. La NEP inactive les enképhalines en les dégradant et stoppe ainsi leurs effets analgésiques via les récepteurs μ et δ . Le thiorfan qui inhibe l'endopeptidase neutre, est lui-même inhibé par la naloxone. Ceci a permis de montrer l'implication des enképhalines dans la nociception (Lecomte, *et al.*, 1986). L'étude de Yaksh et collaborateurs (1989) indique que le cerveau qui stocke une quantité importante de (met₅)enképhaline n'est pas affecté par l'inhibition de la NEP. Ce sont les effets extracellulaires du peptide (ou de ces peptides) qui sont régulés par le blocage de l'enzyme. Plusieurs études montrent en effet que la NEP est largement présente au niveau des membranes synaptiques cérébrales et non dans les vésicules (De La Baume, *et al.*, 1981). L'enzyme est extracellulaire et dirigée vers la fente synaptique (Yaksh et Chipkin, 1989).

La NEP-like intervient également dans le métabolisme des enképhalines chez la sangsue, et ces données permettent de supposer que cette enzyme, en jouant son rôle dans le catabolisme des enképhalines, participe à des mécanismes liés à la fois au système nerveux et au système immunitaire de *T. tessulatum*.

4-2-2) La NEP-like et le système immunitaire

Si les enképhalines ont un rôle essentiel au niveau du cerveau, elles sont également régulées par la NEP dans les cellules immunitaires. Dans des études utilisant la met-enképhaline comme substrat, l'endopeptidase neutre a été trouvée dans les neutrophiles de la circulation sanguine périphérique, les cellules positives pour l'antigène CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen) et dans une lignée cellulaire promyélocytaire (HL60) (Casale, *et al.*, 1994-1995). La présence de la CD10 (Class Differentiation 10 cell) au niveau de la surface des lymphocytes et des thymocytes immatures suggère également l'implication de l'enzyme dans la régulation de peptides intervenant dans les processus de différenciation du thymus (Guérin, *et al.*, 1997). En fait, le rôle principal de la NEP est d'inhiber partiellement la réponse des cellules immunitaires en réduisant la concentration

d'inhiber partiellement la réponse des cellules immunitaires en réduisant la concentration locale de substrats peptidiques spécifiques. Cette enzyme a une forte affinité pour les peptides chémoattractants de type : Formyl-Met-Ile-Leu-Phe ou enképhaline. En cas d'infection, les bactéries élaborent durant la synthèse protéique, des peptides formyl-méthionyl qui sont à la fois chimioattractants et activateurs des leucocytes mammaliens. La réponse des neutrophiles au Formyl-Met-Leu-Phe (peptide majeur) est alors régulée par l'endopeptidase 24.11 qui dégrade ce peptide (Lesser, *et al.*, 1996).

La CD10 est également produite par les macrophages alvéolaires, les monocytes, les lymphocytes T et B. Les auteurs montrent que l'enzyme clive le peptide chimiotactique au niveau de la liaison Met-Leu. L'inhibition de cette enzyme bloque le chimiotactisme mais n'altère pas la motilité non directionnelle, ce qui suggère que l'hydrolyse du peptide par l'endopeptidase 24.11 est essentielle pour une réponse chimiotactique. Un chimiotactisme décroissant pourrait être dû à une augmentation locale des concentrations du peptide s'accompagnant d'un accroissement de l'adhérence des neutrophiles.

Sa localisation à la surface cellulaire suggère qu'elle peut aussi moduler les activités d'autres peptides bioactifs incluant la substance P qui se fixe au récepteur du peptide formylé, et la dynorphine qui sont des substrats de l'enzyme et qui interagissent avec les neutrophiles pour stimuler leur activité. Les peptides formyl méthionylés sont rapidement clivés par l'enzyme, excepté le Formyl-Met-Ile-Leu-Phe. Ce résultat laisse penser que l'endopeptidase 24.11 exprimée par les neutrophiles et les monocytes pourrait ne pas être la première enzyme responsable de la dégradation de ce térapeptide (Isaac, 1988).

Une fois ces données acquises, on peut essayer de comprendre comment cette enzyme est impliquée dans la régulation du système nerveux et du système immunitaire chez les Hirudinées. Récemment, Stefano et collaborateurs (1997) ont montré qu'elle intervenait dans le catabolisme de peptides issus de la proenképhaline-like au niveau des cellules immunitaires. Elle irait également jouer un rôle dans le devenir des peptides issus des autres précurseurs : la POMC-like (Salzet, *et al.*, 1997a) et la Prodyn-like (Fig. 22) (Salzet et Stefano, 1997). En ce qui concerne le précurseur de l'AII, elle viendrait cliver l'AI en différents points (Laurent et Salzet, 1996a), puis l'AII en collaboration avec l'ACE-like. On notera que le RAS est présent au niveau des immunocytes de la sangsue c'est à dire les coelomocytes et les cellules gliales (résultats non publiés obtenus en collaboration avec F. Vandembulcke et M. Verger-Bocquet). L'utilisation d'un anticorps anti-NEP devrait permettre de statuer sur le cas de la NEP-like et d'étudier ensuite son action d'endopeptidase vis à vis des peptides produits par les cellules immunitaires.

CONCLUSION

CONCLUSION

En m'appuyant sur les acquis du laboratoire, c'est à dire l'isolement de l'AII (Salzet, *et al.*, 1992) et de son précurseur chez les Hirudinées, mon travail a conduit à la mise en évidence de molécules apparentées à la rénine, l'ACE, la NEP et l'aminopeptidase neutre.

Des tests incluant l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et de substrats de ces enzymes, ainsi que la recherche des paramètres cinétiques et des conditions optimales d'activité de ces molécules, ont mené à leur isolement et leur caractérisation. Nos travaux ont permis de reconstituer, et ceci pour la première fois chez un invertébré, un système hormono-enzymatique complet : le RAS, similaire à celui des mammifères. Ils ont également montré l'implication d'autres molécules telle la NEP-like et la molécule apparentée à l'aminopeptidase neutre, dans le métabolisme des neuropeptides.

La conservation au cours de l'évolution de l'activité enzymatique de l'ACE-like et de la NEP-like depuis la séparation des Annélides des autres métazoaires démontre leur importance dans le fonctionnement du système nerveux. Notre travail apporte des informations fondamentales pour la compréhension du rôle de ces deux enzymes. En effet, chez la sangsue, elles n'agissent pas seulement comme des neuropeptidases adaptées à des molécules de petite taille mais aussi comme endopeptidases, carboxypeptidases et convertases sur le précurseurs de neuropeptides. La même observation a été faite chez les insectes (Isaac, *et al.*, 1997). Ce nouvel aspect de leur activité contribuera peut être à une meilleure compréhension de certaines voies métaboliques. Cette nouvelle approche de leur activité a abouti à des observations similaires chez les vertébrés (Weigent, *et al.*, 1997).

L'ensemble de nos résultats laisse entrevoir l'importance de l'ACE-like dans le système nerveux central et apparemment aussi, dans un autre système, le système immunitaire. Ce dernier système est relativement simple chez la sangsue et apparaît comme un bon modèle pour les études actuellement entreprises au laboratoire sur la base de mes résultats. Deux populations de cellules immunitaires sont détectées et semblent posséder comme les leucocytes humains, des cytokines (Hugues, communication personnelle) et des précurseurs de neuropeptides (Salzet et Stefano, 1997d,e ; Salzet, *et al.*, 1997a,c).

Ces enzymes participent à de nombreuses fonctions comme le maintien, par exemple, de l'équilibre hydrominéral, de la reproduction, ou de la défense de l'organisme. Dans ce cadre, l'ACE-like et la NEP-like semblent avoir un rôle très large. En effet, nos résultats sont

en faveur du fait que la sangsue est à un stade de l'évolution où ses principales fonctions semblent contrôlées par des molécules « ubiquitaires ». Cette situation est différente de celle des mammifères où de nombreuses enzymes, telle la chymase (responsable d'une partie de la production d'AII au moins au niveau du cœur) peuvent relayer l'ACE et l'endopeptidase neutre. Nous apportons en effet les connaissances indispensables à l'étude de l'implication de ces enzymes dans la régulation du métabolisme des neuropeptides mis en évidence à la fois dans le système nerveux et le système immunitaire des Hirudinées.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Almenoff, J., Wilk, S. et Orlowski, M. Membrane bound pituitary metalloendopeptidase apparent identity to enkephalinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 102 : 206-214, 1981.
- Almenoff, J. et Orlowski, M. Membrane bound kidney neutral metalloendopeptidase : Interaction with synthetic substrate, natural peptides, and inhibitors. **Biochemistry.** 22, 590-599, 1983.
- Almenoff, J. et Orlowski, M. Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metalloendopeptidase. Comparison with Thermolysin-like kidney neutral metalloendopeptidase . **J. Neurochem.** 42 : 151-157, 1984.
- Baert, J.-L., Britel, M., Sautière, P. et Malécha, J. Ovohemerythrin, a major 14-kDa yolk protein distinct from vitellogenin in leech. **Eur. J. Biochem.** 209, 563-569, 1992.
- Barnes, K, *et al.* Membrane localization of endopeptidase-24.11 and peptidyl dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) in the pig brain : a study using subcellular fractionation and electron microscopic immunocytochemistry. **Neuroscience** 27, 799, 1992.
- Barrett, A.J., *Proteolytic Enzymes : Aspartic and Metallo Peptidases*, **Methods in Enzymology**, vol. 248, 283-305, 1996.
- Baudin, B., Timmins, P.A., Drouet, L., Legrand, Y., et Baumann, F. C. Molecular weight and shape of angiotensin-converting enzyme. A neutron scattering study. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 154, 1144-1150 ; 1988.
- Baudin, B., Berard, M., Carrier, J.L., Legrand, Y. et Drouet, L. ; Vascular Origin Determines Angiotensin I-Converting Enzyme Expression in Endothelial Cells. **Endothelium**, vol.5, pp. 73-84 ;1997.
- Beldent, V., Michaud, A., Wei, L., Chauvet, M.-T., et Corvol, P. Proteolytic release of human angiotensin converting enzyme, **J. Biol. Chem.** 268, 26428-26434, 1993.

- Beldent, V., Michaud, A., Bonnefoy, C., Chauvet, M-T et Corvol, P. Cell surface localization of proteolysis of human endothelial Angiotensin Converting Enzyme. **J. Biol. Chem.** Vol. 270, n°48 pp. 28962-28969, 1995.
- Bénéteau-Burnat, B., Tahraoui, A., Barbut, F., Giboudeau, J. et Baudin, B. Physicochemical and immunological comparisons between angiotensin I converting enzymes purified from different mammalian species. **Comp. Biochem. Physiol.** Vol, 109 ; n°4, 623-635, 1994.
- Bernier, S.G., et Guillemette, G. L'angiotensine IV : une nouvelle hormone du système rénine-angiotensine. **Médecine/Sciences**, Vol. 35, n° 5 ; 609-612 , 1996.
- Bernstein, K.E., Martin, B.M., Bernstein, E.A., Linton, J., Stricker, G. The isolation of Angiotensin-Converting Enzyme cDNA : **J. Biol. Chem.** Vol. 263, n° 23 pp.11021-11024, 1988.
- Bevilacqua, M., Vago, T., Rogolino, A., Conci, T., Santoli, E. et Norbiato, G. Affinity of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE), inhibitors for N and C binding sites of human ACE is different in heart, lung, arteries, and veins. **Journal of Cardiovascular Pharmacology.** Vol. 28, 494-499, 1996.
- Breitbart, R.E. Alternative splicing : a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. **Annu. Rev. Biochem.** 56, 467-495, 1987.
- Bunning, P. et Riordan, J.F. Activation of angiotensin converting enzyme by monovalent anions. **Biochemistry.** 22, 110-116, 1983.
- Bunning, P., Kleemann, S.G., Riordan, J.F. Essential residues in angiotensin converting enzyme : modification with 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene. **Biochemistry.** 29, 10488-10492, 1990.
- Burton, J., Quinn, T. The amino acid residues on the C terminal side of the cleavage site of angiotensinogen influence the species specificity of reaction with renin, **Biochem. Biophys. Acta.** 952 : 8-12,1988.

- Cambien, F., Poirier, O., Lecerf, L., Evans, A., Cambou, J.P., Arveiler, D., Luc, G., Bars, L., Richard, S., Tiret, L., Amouyel, P., Alhenc-Gelas, P. et Soubrier, F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. **Nature**. (London) 359, 641-644, 1992.
- Campbell, D.J. Angiotensin peptides in the brain. **Adv. Exp. Med. Biol.** 377 : 349-355, 1995.
- Campbell, D.J. Effects of losartan on angiotensin and bradykinin peptides and angiotensin converting enzyme. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 26 (2), 233-240, 1995.
- Carretero, O.A. et Scicli, A.G. Zinc metallopeptidase inhibitors. A Novel Antihypertensive Treatment. **Editorial Comment**. Vol. 68, 366-371, 1991.
- Casale, L., Cardozo, C., Kalb, J. Lesser, M. Quantitation of endopeptidase 24.11 and endopeptidase 24.15 in human blood leukocytes. **Enzyme and Protein**. 48 : 143-148 ; 1994-1995.
- Cerpa-Poljak, A., Lahnstein, J., Mason, K.E., Smythe, G.A. et Duncan, M.W. Mass spectrometric Identification and Quantification of Hemorphins Extracted from Human Adrenal and Pheochromocytoma Tissue. **Journal of Neurochemistry**. 68, 1712-1719, 1997.
- Chassagne, C., Servant, M.J., Meloche, S. Récepteurs de l'angiotensine II : rôles dans le contrôle de la croissance cellulaire et mécanismes de transmission du signal. **Médecine/Sciences**. 12, 1351-60, 1996.
- Chipkin, R.E., Latranyi, M.B. et Iorio, L.C. Potentiation of stress-induced analgesia (SIA) by Thiorfan and its block by naloxone. **Life Sci**. 31 : 1189-1192, 1982.
- Chipkin, R.E., Berger, J.G., Billard, W., Iorio, L.C., Chapman, R. et Barnett, A. Pharmacology of SCH 34826, an Orally Active Enkephalinase inhibitor Analgesic. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Vol. 245, n° 3 : 829-838, 1988.
- Cleland, S.J., Reid, J.L. The Renin-Angiotensin System and the heart : a historical review. **Heart**. Suppl. 3, 76 : 7-12, 1996.

- Coletti-Previero, M.-A., Matras, H., Zwillig, R. et Previero, A., Enkephalin-degrading activity in arthropod hemolymph. **Neuropeptides**. 6, 405-415, 1985.
- Conroy, J.M., Hartley, J.L., et Soffer, R.L. Canine pulmonary angiotensin-converting enzyme. Physicochemical, catalytic and immunological properties. **Biochem. Biophys. Acta**. 524 (2): 403-412, 1978.
- Cooper, E.L. Rinkevich, B., Uhlenbruck, G., Valembois, P. Invertebrate immunity : Another viewpoint. **Scand J. Immunol**. 35 : 247-266, 1992.
- Coquerel, A., Dubuc, I., Menard, J.F., Kitjabi, P. et Cosyentin, J. Naloxone-insensitive potentiation of neurotensin hypothermic effect by the enkephalinase inhibitor Thiorfan. **Brain Res**. 398 : 386-389, 1986.
- Cornell, M.J., Williams, T.A., Lamango, N.S., Coates, D, Corvol, P., Soubrier, F., Hoheisel, J., Lehrach, H., Isaac, R. E. Cloning and Expression of an Evolutionary conserved Single-Domain Angiotensin Converting Enzyme from *Drosophila melanogaster*. **J. Biol. Chem**. Vol. 270, n°23, pp. 13613-13619, 1995.
- Corvol, P., Ménard, J. Renin inhibition : Immunological procedures and renin inhibitor peptides, **Kidney Int**. 34 Suppl. 26 : S73-S79,1988.
- Corvol, P., Williams, T.A., Soubrier, F. Peptidyl dipeptidase A : Angiotensin I-Converting Enzyme. In : Barrett, A. J., ed. **Methods in enzymology**. V. 248, Academic Press, pp. 283-305, 1995.
- Costerousse, O., Allegrini, J., Lopez, M., Alhenc-Gelas, F. Angiotensin-Converting Enzyme in human circulating mononuclear cells : genetic polymorphism of expression in T lymphocytes. **Biochem. J**. 290 : 33-40, 1993.
- Csikos, T., Gallinat, S., et T., Unger : Extrarenal aspects of angiotensin II function. **Eur. J. of Endocrinology**. 136 349-358, 1997.
- Cumin, F., Le Nguyen, D., Castro , B., Ménard, J., Corvol, P. Comparative enzymatic study of human renin acting on pure natural or synthetic substrates. **Biochem. Biophys. Acta**. 913 : 10-19,1987.

- Cushman, D.W. et Cheung H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochem. Biophys. Acta.** 250, 261-265, 1971.
- Deddish, P.A., Wang, L-X, Jackman, H.L., Michel, B., Wang, J., Skidgel, R.A. et Erdos, E.G. Single domain ACE (kininase II) : Characterization and properties. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** : vol. 279, n°3, 1582-1589, 1996.
- De La Baume, S, Patey, G. et Schwartz, J.C. Subcellular distribution of enkephalin-dipeptidyl carboxypeptidase (enkephalinase) in rat brain. **Neuroscience.** 6 : 315-321, 1981.
- De Lombaert, S., Blanchard, L., Stamford, L.B., Sakane, Y., Berry, C., Ghay, R.D. et Trapani, A.J. Dual inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase by tricyclic benzazepone thiols. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.** Vol. 6, n°23, pp. 2875-2880, 1996.
- Deschodt-Lanckman, M. et Strosberg, A.D. In vitro degradation of the C terminal octapeptide of cholecystokinin by « enkephalinase A ». **FEBS Letters.** Vol. 52, n°1, 109-113, 1983.
- Ehlers, M.R.W., et Riordan, J.F. Angiotensin converting enzyme : new concepts concerning its biological role. **Biochemistry.** 28, 5311-5318 ; 1989.
- Ehlers, M.R.W., Fox, E.A., Strydom, D.J., Riordan, J.F. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme : the testis isoenzyme is identical to the C terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 86 : 7741-7745, 1989.
- Ehlers, M. R. W., Chen, Y-N. P., et J. F. Riordan The unique N terminal sequence of testis angiotensin-converting enzyme is heavily O-glycosylated and unessential for activity or stability. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 183, 199 ; 1992.
- Ehlers, M.R.W., Schwager, S.L.V., Scholle, R.R., Manji, G.A., Brandt, W.F., et Riordan, J.F. Proteolytic release of membrane-bound angiotensin converting enzyme : Role of the juxtamembrane stalk sequence. **Biochemistry.** Vol.35, number 29, 9549-9559, 1996.

- Eisenlohr, L.C., Bacik, I., Bennink, J.R., Bernstein, K., Yewdell, J.W. Expression of a membrane protease enhances presentation of endogenous antigens to MHC class I-restricted T lymphocytes. **Cell**. 71 963-972, 1992.
- El Dorry, H.A., Bull, H.G., Iwata, K., Thornberry, N.A., Cordes, E.H., Soffer, R.L. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. **J. Biol. Chem.** 257 : 14128-14133, 1982.
- Erdos E.G. et Skidgel R.A. The angiotensin I-converting enzyme. **Lab. Invest.** 56, 345-348, 1987.
- Erdos, E.G. et Skidgel, R.A. Neutral endopeptidase 24.11 (enképhalinase) and related regulators of peptides hormones. **FASEB**. 3, 145-151, 1989.
- Erdos, E.G. Angiotensin-converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. **Hypertension**. 16, 363-370, 1990.
- Erickson, R.P., Kessler, S, Kromling, H. et Sen, G.C. Species variation in the testicular Angiotensin converting enzyme promoter studied in transgenic mice. **Molecular Reproduction and Development** vol. 44 : 324-331, 1996.
- Esther, C.R., *et al.* The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. **J. Clin. Invest.** 99(10), 2375-2385, 1997.
- Fagny, C., Michel, A., Léonard, I., Berkenboom, G., Fontaine, J., et Deschodt-Lanckman, M. In vitro degradation of Endothelin-1 by Endopeptidase 24.11 (Enkephalinase). **Peptides**. Vol.12, pp. 773-778, 1991.
- Fulcher, I.S., Matsas, R., Turner, A.J., et Kenny, A.J. Kidney neutral endopeptidase and the hydrolysis of enkephalin by synaptic membranes show similar sensitivity to inhibitors. **Biochem. J.** 203 : 519-522, 1982.
- Fulcher, I.S. et Kenny, A.J. Proteins of the kidney microvillar membranes. The amphipatic forms of endopeptidase purified from pig kidney. **Biochem. J.** 211, 743-753, 1983a.
- Fulcher, I.S., Chaplin, M.F. et Kenny, A.J. Endopeptidase 24.11 purified from pig intestine is differentially glycosylated from that in kidney. **Biochem. J.** 215 : 317-323, 1983b.

- Gafford, J.T., Skidgel, R.A., Erdos, E.G., et Hersch, L.B. Human kidney « Enkephalinase », a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. **Biochemistry**. 22 : 3265-3271, 1983.
- Gorenstein, C., et Snyder, S.H. Two distinct enkephalinases : solubilization, partial purification and separation from angiotensin-converting enzyme. **Life Sci**. 25 : 2065-2070 ; 1979.
- Gros, C., Souque, A., et Schwartz, J.C. Inactivation of atrial natriuretic factor in mice in vivo : crucial role of enkephalinase (E.C.3.4.24.11). **European Journal of Pharmacology**. 179, 45-56, 1990.
- Guérin, S., Mari, B., Belhacene, N., Rossi, B., Peyron, J.-F., et Auberger, P. CD10 (Endopeptidase 24.11) is a Thymic Peptide-Degrading Enzyme Possibly Involved in the Regulation of Thymocyte Functions. **Cellular Immunology**. 175, 85-91, 1997.
- Haass, C. Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. **Cell** 75, 1039-1042, 1993.
- Henderson, I.W., Oliver, J.A., Mc Keever, A. et Hazon, N. Phylogenetic aspects of the renin-angiotensin system. In G. Pethes et V.L. Frenyo (Eds). **Advances in animal and comparative physiology**. New York, Pergamon press, pp. 355-363, 1981.
- Hernandez-Presa, M., Bustos, C., Ortego, M., Tunon, J., Renedo, G., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Prevents Arterial Nuclear Factor- κ B Activation, Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression, and Macrophages Infiltration in a Rabbit Model of Early Accelerated Atherosclerosis. **Circulation**. 95 : 1532-1541, 1997.
- Hooper, N.M., Kenny, A.J., et Turner, A.J. The metabolism of neuropeptides. Neurokinin A (substance K) is a substrate for endopeptidase 24.11 but not for peptidyl dipeptidase A (angiotensin-converting enzyme. **Biochem. J**. 231, 357-361, 1985.

- Hooper, N.M., Turner, A.J. Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl dipeptidase A (angiotensin-converting enzyme) from pig brain : a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. **Biochem. J.** 241, 625-633, 1987.
- Hooper, N.M., Karran, E.H., et Turner, A.J. Membrane protein secretases. **Biochem. J.** 321, 265-279, 1997.
- Hudgin, R.L., Charleson, S.E., Zimmerman, M., Mumford, R., Wood, P.L. Enkephalinase : selective peptide inhibitors. **Life Sciences**, vol.29, pp. 2593-2601, 1981.
- Hugues, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. et Morris, H.R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature.** 258, 577-579, 1975.
- Isaac, R.E. Neuropeptide degrading endopeptidase activity of Locust, *Schistocerca gregaria*, from synaptic membranes. **Biochem. J.** 255, 843-847, 1988.
- Iwai, N., Inagami, T., Ohmichi, N., Kinoshita, M. Renin is expressed in rat macrophages and monocytes cells. **Hypertension.** 27, 399-403, 1996.
- Jackson, T.R., Blair, L.A.C., Marshall, J., Coedert, M., et Hanley, M.R. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. **Nature.** 335, 437-440, 1988.
- Jan Danser, A.H., Van Kesteren, C.A.M., Bax, W.A., Tavenier, M., Derkx, F.M.M., Saxena, P.R., Schalckamp, M.A.D.H. Prorenin, Renin, Angiotensinogen, and Angiotensin-Converting Enzyme in normal and failing human hearts. **Circulation.** 96 : 220-226, 1997.
- Jaspard, E., Wei, L. et Alhenc-Gelas, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. **J. Biol. Chem.** 268, 94996-9503, 1993.
- Johnson, A.R. et Erdos, E.G. Metabolism of vasoactive peptides by human endothelial cells in culture. Angiotensin I converting enzyme (kininase II) and angiotensinase. **J. Clin. Invest.** 59, 684-695, 1977.

- Kajstura, J., Cigola, E., Malhotra, A., Li, P., Cheng, W., Meggs, L.G., et Anversa, P. Angiotensin II induces Apoptosis of adult ventricular Myocytes in vitro. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 29, 859-870, 1997.
- Kastin *et al.* Role of glycosylation in the biosynthesis and activity of rabbit testicular ACE. **Biochemistry.** 1994.
- Kasturi, S., Jabbar, M.A., Sen, G.C. et Sen, I. Role of glycosylation in the biosynthesis and activity of rabbit testicular Angiotensin Converting Enzyme. **Biochemistry.** Vol. 33, n° 20, 6228-6234, 1994.
- Kerr, M.A., et Kenny, A.J. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. **Biochem. J.** 137 , 477-488 ;1974a.
- Kerr, M.A., et Kenny, A.J. The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. **Biochem. J.** 137 : 489-495, 1974b.
- Kenny, A.J. et Maroux, S. Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. **Physiol. Rev.** 62, 91-128 ; 1982.
- Kenny, A.J., et Fulcher, I.S., Mac Gill, K.A. and Kershaw, D. **Biochem. J.** 211, 755-762 ; 1983.
- Kenny, A.J. et Ingram, J. Proteins of the kidney microvillar membrane. **Biochem. J.** 245, 515-524, 1987.
- Kitabji, P., Dubuc, I., Nouel, D., Costentin, J., Cuber, J.-C., Fulcrand, H., Doulut, S., Rodriguez, M., et Martinez, J. Effects of Thiorfan, bestatin and a novel metallopeptidase inhibitor JMV 390-1 on the recovery of NT and NN (neuromedin) released from mouse hypothalamus. **Neuroscience letters.** 142; 200-204, 1992.
- Knight, M. et Klee, W.A. The relationship between Enkephalin degradation and Opiate receptor occupancy. **J. Biol. Chem.** Vol. 253, n°11, pp. 3843-3847, 1978.

- Kozlowski, S., Corr, M., Shirai, M. Multiple pathways are involved in the extracellular processing of MHC class I-restricted peptides. **J. Immunol.** 151 : 4033-4044 ; 1993.
- Kozlowski, S., Corr, M., Takeshita, T. Serum angiotensin I converting enzyme activity processes a human immunodeficiency virus 1 gp 160 peptide for presentation by major histocompatibility complex class I molecules. **J. Exp. Med.** 175 : 1417-1422 ; 1992.
- Krege, J.H., John, S.W.M., Langenbach, L.L., Hodgins, J.B., Hagaman, J.R., Backman, E.S., Jennette, J.C., O'Brien, D.A., Smithies, O. Male-Female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. **Nature.** 375 : 146-148, 1995.
- Krizanova, O., Orlicky, J., Masanova, Cs., Juhaszova, M., et Hudecova, S. Angiotensin I modulates Ca-transport systems in the rat heart through Angiotensin II. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 29, 1739-1746 ;1997.
- Kumar, R.S., Kusari, J., Roy, S.N., Soffer, R.L., Sen, G.C. Structure of testicular angiotensin-converting enzyme : a segmental mosaic isoenzyme. **J. Biol. Chem.** 264, 16754-16758, 1989.
- Lamango, N.S., Isaac R.E., Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the house fly *Musca domestica*, that resembles mammalian Angiotensin-Converting Enzyme. **Biochem J.** 299 : 651-657, 1994.
- Lamango N.S., Sajid, M., Isaac, R.E. The endopeptidase activity and the activation by Cl⁻ of ACE is evolutionary conserved, Purification and Properties of an ACE of the housefly, *Musca domestica*. **Biochem. J.** 314 : 639-646, 1996.
- Langford, K.G., Shai, S.-Y., Howard, T.E., Kovac, M.J., Overbeek, P.A., Bernstein, K.E. Transgenic mice demonstrate a testis specific promoter for angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.** 266 : 15559-15562, 1991.
- Lanzillo, J.J., Stevens, J., Tumas, J., et Fanburg, B.L. Spontaneous change of human plasma angiotensin I converting enzyme isoelectric point. **Archs Biochem. Biophys.** 277, 434-439 ; 1983.

- Lanzillo, J.J., Stevens, J., Dasarathy, Y., Yotsumoto, H., et Fanburg, B.L. **J. Biol. Chem.** 260, 14938-14944, 1985.
- Lattion, A.L., Soubrier, F., Allegrini, J., Hubert, C., Corvol, P., et Alhenc-Gelas, F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. **FEBS**. Vol. 252, number 1, 2, 99-104 ; 1989.
- Laurent, V., Bulet, P., et Salzet, M. A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin-like molecule with forms of vertebrate angiotensinogens : a hormonal system conserved in the course of evolution. **Neurosciences Letters**. 190, 175-178 ; 1995.
- Laurent, V., et Salzet, M. Metabolism of angiotensins by head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum*. **FEBS Letters**. 384 123-127, 1996a.
- Laurent, V. et Salzet, M. Metabolism of enkephalins in head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum* by peptidases : isolation of an enkephalin-degrading aminopeptidase. **Regulatory Peptides**. 65, 123-131, 1996b.
- Laurent, V., Stefano, G.B., Salzet, M. Leech angiotensin converting enzyme. **Trends in comparat. Neurosc. and Endocrinol.** sous presse.
- Le Bien, T.W. et Mac Cormack, R.T. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10) : Emancipation from a functional enigma. **Blood**. 73, 625-635, 1989.
- Lecomte, J.M., Costentin, J., Vlaiculescu, A., Chaillet, P., Marcais-Collado, H, Llorens-Corte, Leboyer, M. et Schwartz, J.C. Pharmacological properties of acetorfan, a parenterally active « enkephalinase » inhibitor. **J. Pharmac. Exp. Ther.** 237 : 937-944, 1986.
- Lesser, M., Fung, K., Almenoff, P.L., Rosenbaum, C., et Cardozo, C. Hydrolysis of N-Formylmethionyl Chemotactic Peptides by Endopeptidase 24.11 and Endopeptidase 24.15. **Peptides**. vol.17, n°1, pp.13-16, 1996.
- Leung, M.K., Sissi, L., Houston, S. et Stefano, G.B. Degradation of met-enkephalin by hemolymph peptidases in *Mytilus edulis*. **Cell. Mol. Neurobiol.** 5, 367-378, 1992.

- Lieberman, J. Elevation of serum angiotensin-converting enzyme (ACE) level in sarcoidosis. **Am. J. Med.** 59, 365-372, 1975.
- Macagno, E.R. Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. **J. Comp. Neurol.** 190, 283-302, 1980.
- Mac Kelvey, J.F., et Blumberg, S. Inactivation and metabolism of neuropeptides. **A. Review Neurosc.** 9, 415-434, 1986.
- Malecha, J., Verger-Bocquet, M., et Tramu, G. Mise en évidence et évolution, au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motiline porcine dans le ganglion supraoesophagien de la sangsue *Theromyzon tessulatum*. **Can. J. Zool.** 67, 636-640, 1989.
- Malecha, J. L'osmorégulation chez l'Hirudinée rhynchobdelle *T. tessulatum* (O. F. M.) Localisation expérimentale de la zone sécrétrice d'un facteur de régulation de la balance hydrique. **Gen. Comp. Endocrinol.** 49, 344-351, 1983.
- Malfroy, B., Swerts, J.P., Guyon, A., Roques, B.P. et Schwartz, J.C., High affinity enkephalin degrading peptidase in brain is increased after morphine. **Nature.** 276 : 523-526, 1978.
- Malfroy, B., et Schwartz, J.C. Purification and substrate specificity of rat kidney « enkephalinase ». **Life Sci.** 31, 1745-1748, 1982a.
- Malfroy, B., Schwartz, J.-C. Properties of « Enkephalinase » from rat kidney ; comparison of dipeptidyl carboxypeptidase and endopeptidase activities. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 106, 276-285, 1982b.
- Marcel, D., Pollard, H., Verroust, P., Schwartz, J.C., et Beaudet, A. Electron microscopic localization of immunoreactive enkephalinase (E. C. 3. 4. 24. 11) in the neostriatum of the rat. **J. Neurosc.** 10 : 2804-2817 ; 1990.
- Marchalonis, J., Schluter, S.F. Development of an immune system. In Primordial immunity : Foundations for the Vertebrate Immune System. **Ann. NY Acad. Sci.** 712, 1-12, 1994.

- Matsas, R., Fulcher, I.S., Kenny, A.J., et Turner, A.J. Substance P and Leu-enképhaline are hydrolysed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Vol. 80, pp.3111-3115, 1983.
- Matsas, R., Turner, A.J. et Kenny, A.J. Endopeptidase 24.11 and aminopeptidase activity in brain synaptic membranes are jointly responsible for the hydrolysis of cholecystokinin octapeptide (CCK8). **FEBS.** 1761, vol.175, n°1 ;1984.
- Mauborgne, A., Bourgoïn, S., Benoliel, J.J., Hamon, M., et Cesselin, F. Is substance P released from slices of the rat spinal cord inactivated by peptidase(s) distinct from both 'enkephalinase' and 'angiotensin-converting enzyme' ?. **Neurosciences letters.** 123, 221-225, 1991 .
- Meisel, H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. John Wiley and sons, **Inc. Biopoly.** 43 : 119-128, 1997.
- Meng, Q.C., et Oparil, S. Purification and assay methods for angiotensin-converting enzyme. **Journal of Chromatography A** 743 105-122, 1996.
- Mieczyslaw, Marcinkiewicz, Seidah, N.G. et Chrétien, M. Les convertases des prohormones et le système nerveux. **Médecine/Sciences** , n°5 ; 9 : 553-561 ; 1993.
- Muller, D.N., Bohlender, J., Hilgers, K.F., Dragun, D., Costerousse, O., Ménard, J., Luft, F.C. Vascular Angiotensin Converting Enzyme expression regulates local Angiotensin II. **Hypertension.** 29 ; 98-104, 1997.
- Murphy, T.J., Alexander, R.W., Grendling, K.K., Runge, M.S., et Bernstein, K.E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-I angiotensin II receptor. **Nature.** 351, 233-236 ; 1991.
- Ng, K.K et Vane, J.R. Conversion of Angiotensin I to Angiotensin II. **Nature.** (London), 216 762-766, 1967.
- Nyberg, F., Sanderson, K et Glamsta, E.L. The hemorphins : a new class of Opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. **Inc. Biopoly.** 43 : 147-156, 1997.

- Okawara, Y. Enhancement of water intake by captopril (SQ14225), an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, in the goldfish, *Carassius auratus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 69, 114-118 (1988).
- Oparil, S., Meng, S.D., Sun, Y.F., Chen, et L.J. Dell'Italia. Vascular Endothelium : Response to Injury. **Plenum, New York**, p. 205 ; 1996.
- Papapetropoulos, A., Antonov, A., Virmani, R., Kolodgie, F.D., Munn, D.H., Marczin, N., Ryan, J.W., Gerrity, R.G., Catravas, J.D. Monocyte- and Cytokin- induced downregulation of angiotensin converting enzyme in cultured human and porcine endothelial cells. **Circ. Res.** 79 ; 512-523, 1996.
- Peach, M.J. Renin-Angiotensin system : Biochemistry and mechanisms of action. **Physiol. Rev.** 57, 313-370, (1977).
- Perich, R.B., Jackson, B., et Johnston, C.I. : Structural constraints of inhibitors for binding at two active sites on somatic angiotensin converting enzyme. **Eur. J. Pharmacol.** 266 : 201-211, 1994.
- Phillips, M.I., Kimura, B, et Raizada, M. Measurement of brain peptides : angiotensin and atrial natriuretic peptide in tissue and cell culture. **Regul. Pept.** 43 : 177-204, 1991.
- Pierzchalski, P., Reiss, K., Cheng, W., Cirielli, C., Kajstura, J., Nitahara, J. A., Rizk, M., Capogrossi, M. C., Anversa, P. p53 induces Myocyte Apoptosis via the activation of the renin- angiotensin system. **Experimental Cell Res.** 234, 57-65, 1997.
- Poulsen, K., Nielsen, A.H. In Robertson, J. I. S. et Nicholls, M. G. (eds). The measurement of renin. **Gower Medical Publishing.** London, 13.1-13.12, 1985.
- Pozsgay, M., Michaud, C., Liebman, M., et Orlowski, M., Substrate and inhibitor studies of thermolysin-like neutral endopeptidase from kidney membrane fractions : Comparison with bacterial thermolysin. **Biochemistry.** 25 : 1292-1299 ;1986.
- Ramchandran, R. et Sen, I. Cleavage processing of ACE by a membrane- associated Metalloprotease. **Biochemistry.** 34 : 12645-12652 ;1995.

- Ramchandran, R., Kasturi, S., Douglas, J.G., et Sen, I., Metalloprotease-mediated cleavage secretion of pulmonary ACE by vascular endothelial and kidney epithelial cells. **Am. J. Physiol. 271. Heart Circ. Physiol.** 40 : H744-H751, 1996.
- Rawlings, N.D. et Barrett, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem. J.** 290, 205-218, 1993.
- Relton, J.M., Gee, N.S., Matsas, R., Turner, A.J., Kenny, A.J. Purification of endopeptidase 24.11 (enkephalinase) from pig brain by immunoabsorbent chromatography. **Biochem. J.** 215 519-523, 1983.
- Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.C., Socora, E., Lecomte, J.M., Malfroy, B., Llorens-Cortes, C. et Schwartz, J.C. The enkephalinase inhibitor Thiorfan shows antinociceptive activity in mice. **Nature.** vol.288, 286-288 ; 1980.
- Roques, B.P. La lutte contre la douleur et l'endopeptidase neutre. **Pour la Science.** N°140, 40-49, 1989.
- Roques, B.P. et Beaumont, A. Neutral endopeptidase 24.11 inhibitors : from analgesics to antihypertensives ? **TIPS**, vol.11, 1990.
- Rosenbaum, C., Cardozo, C., et Lesser, M. Degradation of Lysylbradykinin by Endopeptidase 24.11 and Endopeptidase 24.15. **Peptides.** vol. 16, n°3, pp. 523-525, 1995.
- Rousseau, A., Michaud, A., Chauvet, M-T, Lenfant, M. et Corvol, P. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.** 270, 3656-3661 ; 1995.
- Ryan, J.W., Valido, F.A., Chung, A.Y.K., Ripka, J.E., Peterson, C.M. et Urry, R.L.
A comparison of guinea pig serum angiotensin converting enzyme with forms of angiotensin converting enzyme from human, rat and rabbit tissues. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 196 : 509-514, 1993.
- Saavedra, J.M. Brain and pituitary angiotensin. **Endocrine reviews.** 13 : 329-380, 1992.

- Sadhukhan, R. et Sen, I. Different glycosylation requirements for the synthesis of enzymatically active angiotensin converting enzyme in mammalian cells and yeast. **Journal of Biochemistry**. vol. 271, n° 11, pp. 6429-6434, 1996a.
- Sadhukhan, R., Sen, G.C., et Sen, I. Synthesis and Cleavage-Secretion of Enzymatically Active Rabbit Angiotensin-Converting Enzyme in *Pichia pastoris*. **The J. Biol. Chem.** Vol. 271, n° 31 ; pp. 18310-18313, 1996b.
- Sajid, M et Isaac, R.E. Identification and properties of a neuropeptide-degrading endopeptidase (neprilysin) of *Ascaris suum* muscle. **Parasitology**. 111, 599-608, 1995.
- Salzet M., Verger-Bocquet M., Watzet C., Malecha, J., Evidence for angiotensin-like molecules in the central nervous system of the leech *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). A possible diuretic effect. **Comp. Biochem. Physiol.** 101A, 83-90, 1992.
- Salzet, M., Bulet, P., Van Dorsselaer, A., Malecha, J. Isolation, structural characterization and biological function of a Lysin-conopressin in the central nervous system of the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*, **Eur. J. Biochem.** 217 : 897-903, 1993a.
- Salzet, M., Watzet, C., Baert, J-L., et Malecha, J. Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. **Brain Res.** 631 : 247-255, 1993b.
- Salzet, M., Watzet, C., Verger-Bocquet, M., Beauvillain, J.C., et Malecha, J. Oxytocin-like peptide : a novel epitope colocalized with the FMRFamide-like peptide in the supernumerary neurons of the sex segmental ganglia of leeches-morphological and biochemical characterization ; putative anti-diuretic function. **Brain Research.** 601, 173-184, 1993.
- Salzet, M., Bulet, P., Watzet, C., Malecha, J. FMRF-amide related peptides in the sex segmental ganglia of the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. Identification and Involvement in the control of the hydric balance. **Eur. J. Biochem.** 221 : 269-275, 1994a.

- Salzet, M., Watzet, C., Bulet, P., Malecha, J. Isolation and structural characterization of a novel peptide related to γ - melanocyte stimulated hormone from the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*. **FEBS Lett.** 348, 102-106, 1994b.
- Salzet, M., Watzet, C., Verger-Bocquet, M., Malecha, J. Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata* : Angiotensin II-amide. **J. Biol. Chem.** 270, 1575-1582, 1995a.
- Salzet, M., Bulet, P., Verger-Bocquet, M., Malecha, J. Isolation and structural characterization of Enkephalin related peptides in the brain of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. **FEBS Letters.** 357 : 187-191, 1995b.
- Salzet, M., Verger-Bocquet, M., Bulet, P., Clauss, W., Malecha, J. Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata* : The leech osmoregulator factor. **J. Biol. Chem.** 271, 7237-7243, 1996a.
- Salzet, M., Verger-Bocquet M., Bulet, P., Beauvillain, J.-C., Malecha, J. Purification, sequence analysis and cellular localization of an opioid related to the α neoeendorphin from the nervous system of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. **J. Biol. Chem.** 271(22), 13191-13196, 1996b.
- Salzet, M., Verger-Bocquet, M. Biochemical evidence of the sodium influx stimulating related peptide in the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*. **Neurosci. Lett.** 213, 161-164, 1996c.
- Salzet, M., Vandenbulcke, F., Verger-Bocquet M. Structural characterization of osmoregulator peptides from the brain of the leech *Theromyzon tessulatum* : IPEPYVWD and IPEPYVWD-amide. **Mol. Brain. Res.** 43, 301-310, 1996d.
- Salzet, M., Salzet-Raveillon, B., Cocquerelle, C., Verger-Bocquet, M., Pryor, S.C., Rialas, C.M., Laurent, V., et Stefano, G.B. Leech Immunocytes contain Proopiomelanocortin : Nitric Oxide mediates Hemolymph Proopiomelanocortin Processing. **J. Immunology.** 159 : 5400-5411, 1997a.

- Salzet, M, Stefano, G.B. First biochemical evidence for an enzyme related to mammalian renin in an invertebrate the leech *Theromyzon tessulatum*. **Mol. Cell. Endocrinol.** 131, 1-8, 1997b.
- Salzet, M , Stefano, G.B., Biochemical evidence for a dynorphin precursor in Invertebrates. **Mol. Brain Res.**, sous presse, 1997c.
- Salzet, M., Salzet-Raveillon, B., Sautière, P., Lesage, J., Beauvillain J.C., Bilfinger, T.V., Rialas, C., Bjenning, C., Stefano, G.B., Isolation and characterization of a leech neuropeptide in rat brains : coupling to nitric oxide release in leech, rat and human tissues. **Mol. Brain Res.** sous presse, 1997d.
- Salzet, M., Stefano, G.B. Isolation and biochemical characterization of proenkephalin from invertebrate immunocytes : Delta opioid binding sites in leech immunocytes. **Brain Res.** 768, 224-232, 1997e.
- Saward, L., et Zahradka, P. Angiotensin II activates Phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.** 81, 249-257, 1997.
- Scharrer, B. Recent progress in comparative Neuroimmunology, **Zool. Science** 9. 1097-1100 1992.
- Schwartz, J.C., Malfroy, B et De La Baume, S. Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase (« enkephalinase ») as neuropeptidase. **Life Sci.** 29, 1715-1740, 1981.
- Schwartz, J.C., De La Baume, S., Bouthenet, M-L, Giros, B., Gros, C., Llorens-Cortes, C., Pollard, H., Sales, N., Solhonne, B., Costentin, J., Lecomte, J.M. Neuropeptidases responsables de l'inactivation des enképhalines et pharmacologie de leurs inhibiteurs. **J. Pharmacol.** vol. 17, suppl. II, 104-122, 1986.
- Sen, G.C., Thekkumkara, T.J., et Kumar, R.S. Angiotensin-converting enzyme : Structural relationship of the testicular and the pulmonary forms. **J. Cardiovas. Pharmacol.** 16 : S14-S18 ; 1990.
- Shapiro, R., Holmquist, B., Riordan, J.F. Anion activation of angiotensin-converting enzyme : dependance on nature of substrate. **Biochemistry.** 22, 3850-3857, 1983a.

- Shapiro, R., et Riordan, J.F. Critical lysine residue at the chloride binding site of angiotensin converting enzyme. **Biochemistry**. 22, 5315-5321, 1983b.
- Shiota, N., Fukamizu, A., Takai, S., Okunishi, H., Murakami, K. et Miyazaki, M. Activation of Angiotensin-II forming Chymase in the cardiomyopathic hamster heart. **Journal of Hypertension**. 15, 431-440, 1997.
- Shipp, M.A., Stefano, G.B., D'Adamio, L., Switzer, S.N., Howard, F.D., Sinisterra, J., Scharrer, B., et Reinherz, E. Downregulation of Enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11. **Nature**. 347 : 394-396, 1990.
- Skeggs.L.L, Kahn, J.R. et Shumway, N.P. Preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **J. Exp.Med**. 103 295 –299, 1956.
- Skeggs, L.T, Lentz, K.E., Kahn, J.R. et Hochstrasser, H. Kinetics of the reaction of renin with nine synthetic peptides substrates. **J. Exp. Med**. 128 : 12-34, 1968.
- Skidgel, R.A., Engelbrecht S., Johnson A.R. et Erdos E.G. Hydrolysis of Substance P and Neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. **Peptides**. 5, 769-776, 1984.
- Skidgel, R.A. et Erdos E.G. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme : Release of the NH₂ and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 82, 1025-1029, 1985.
- Skidgel, R.A., Erdos, E.G. The broad substrate specificity of human AI-converting enzyme. **Clin. Exp. Hypertens**. Part A 9, 243, 1987.
- Skidgel, R.A., et Erdos, E.G. : Biochemistry of angiotensin converting enzyme. In the renin angiotensin system. ed. by J. I. S. Robertson and M. G. Nicholls. Vol. 1, pp. 10.1-10.10. **Gower Medical Publishing**. London, 1993.
- Smith, L.C., Davidson, E.H. The echinoid immune system and the phylogenetic occurrence of immune mechanisms in deuterostomes. **Immunol. Today**. Vol.13, 356-362, 1992.

- Sonnenberg, J.L., Sakane, Y, Jeng, A.Y., Koehn, J.A., Ansell, J.A., Wennogle, L.P. et R.D., Ghai. Identification of protease 3. 4.24.11 as the major Atrial Natriuretic Factor Degrading Enzyme in the rat kidney. **Peptides**. Vol. 9, pp.173-180, 1988.
- Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., Corvol, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 85 : 9386-9390, 1988.
- Soubrier, F., Hubert, C., Testut, P., Nadaud, S., Alhenc-Gelas, F., et Corvol, P. : Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme :I. Biochemistry and structure of the gene. **J. Hypertension**. 11 ; 471-476, 1993a.
- Soubrier, F., Wei, L., Hubert, C., Clauser, E., Alhenc-Gelas, F. et Corvol, P. :Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme II. Structure-Fonction. Gene polymorphism and clinical implications. **J. Hypertension**. 11, 599-604, 1993b.
- Stefano, G.B., Paemen, L.R., et Hughes Jr, T.K. Autoimmunoregulation : differential modulation of CD10/neutral endopeptidase 24.11 by tumor necrosis factor and neuropeptides. **Journal of Neuroimmunology**. 41, 9-14, 1992.
- Stefano, G.B., Scharrer, B., Smith, E.M., Hughes, Jr., Magazine, H.I., Bilfinger, T.V., Hartman, A.R., Fricchione, G.L., Liu, Y., et Makman, M.H. Opioid and Opiate Immunoregulatory Processes. **Critical reviews in Immunology**. 16 : 109-144, 1996a.
- Stefano, G.B., Scharrer, B., Bilfinger, T.V., Salzet, M., Fricchione, G.L. Novel view of opiate tolerance. **Advances in Neuroimmunology**. Vol. 6, 265-277, 1996b.
- Stefano, G.B., Salzet, B., Salzet, M. Identification and characterization of the leech CNS cannabinoid receptor : coupling to nitric oxide release. **Brain Res**. 753, 219-224, 1997a.
- Stefano, G.B., Salzet-Raveillon, B., Salzet, M., Leech CNS Cannabinoid receptor is coupled to nitric oxide release : high sequence homology with mammals, **Brain Res**. 753, 219-224, 1997b.

- Stefano, G. B., Salzet, B., Rialas, C. M., Pope, M.E., Kustka, A., Neenan, K., Pryor, S., Salzet, M. Morphine and anandamide stimulated nitric oxide production inhibits presynaptic dopamine release. **Brain Res.** 763 63-68,1997c.
- Stefano, G.B., Salzet, B., Fricchione, G.L. The implications of enkelytin and opioid peptide presence on Proenkephalin A in Invertebrates and Vertebrates : Immunoactivation, bactericidal activity and pain. **Immunology Today**, 1997d.
- Stephenson, S.L. et Kenny, A.J. Metabolism of Neuropeptides hydrolysis of angiotensins, bradykinin, substance P and Oxytocin by pig kidney microvillar membranes. **Biochem. J.** 241, 237-247, 1987.
- Stephenson, S.L. et Kenny, A.J. The hydrolysis of α -human natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase 24.11. **Biochem. J.** 243 : 183-187, 1987.
- Suzuki, M.M., et Cooper, E.L. Spontaneous cytotoxic Earthworm Leukocytes Kill K562 Tumor Cells. **Zoological Science.** 12 : 443-451, 1995.
- Takayanagi, Ohnaka, K., Sakai, Y., Nakao, R., Yanase, T., Haji, M., Inagami, T., Furuta, H., Gou, D.F., Nakamuta, M. and Nawata, H. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 183, 910-916, 1992.
- Takei, Y., Hasegawa, Y., Watanabe, T.X., Nakajima, K., et Hazon, N. A novel angiotensin I isolated from an elasmobranch fish. **J. Endocrinol.** 139 : 281-285, 1993.
- Taylor C.A.M., Coates, D., Shirras, A.D. The *Acer* gene of *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. **Gene.** 181 191-197, 1996.
- Thekkumkara, T.J., Livingston, I.W., Kumar, R.S., et Sen, G.C. Use of alternative polyadenylation site, for tissue-specific transcription of two angiotensin-converting enzyme. **Nucleic Acids Res.** 20, 683-687, 1992.
- Turner, A.J., Matsas, R., et Kenny, A.J. Are there neuropeptide-specific peptidases ? **Commentary Biochemical pharmacology.** Vol.34, n°9, pp.1347-1356, 1985.

- Turner, A.J. et Dowdall, M.J. The metabolism of neuropeptides both phosphoramidon-sensitive and captopril-sensitive metallopeptidases are present in the electric organ of *Torpedo marmorata*. **Biochem. J.** 222, 255-259, 1984.
- Turner, A.J., Hryszko, J., Hooper, N.M., Dowdall, M.J. : Purification and characterization of a peptidyl dipeptidase resembling angiotensin converting enzyme from the electric organ of *Torpedo marmorata*. **J. Neurochem.** 48, 910-916, 1987.
- Turner, A.J. et Tanzawa, K. Mammalian membrane metallopeptidases : NEP, ECE, KELL, and PEX. **FASEB.** 11, 355-364, 1997.
- Uva, B.M., Masini, M.A., Hazon, N., O'Toole, L.B., Henderson, I.W., Ghiani, P. Renin and angiotensin converting enzyme in Elasmobranchs. **Gen. Comparat. Endocrinol.** 86 : 407-412, 1992.
- Uva, B.M., Masini, M.A., Devechi, M., Napoli, L. Renin-angiotensin in Antarctic fishes. **Comp. Biochem. Physiol.** 100A 897-900 ; 1991.
- Vanha-Pertulla, T., Mather, J.P., Bardin, C.W., Moss, S.B. et Bellve, A.R. Localization of the angiotensin-converting enzyme activity in testis and epididymis. **Biol. Reprod.** 33, 870-877, 1985.
- Vandenbulcke, F., Laurent, V., Verger-Bocquet, M., Stefano, G.B., et Salzet, M. Biochemical identification and ganglionic localization of leech angiotensin-converting enzymes. **Mol. Brain Res.** Vol.49, Iss 1-2, pp. 229-237, 1997.
- Velletri, P.A., Aquilano, D.R., Bruckwick, E., Tsai-Morris, C.H., Dufau, M.L., et Lovenberg, W. Endocrinological control and cellular localization of rat testicular angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1). **Endocrinology.** 116, 2516-2522, 1985.
- Verger-Bocquet, M., Watez, C., Salzet, M., Tramu G., Malecha, J., Immunohistochemical identification of peptidergic neurons in compartment 4 of the supraoesophageal ganglion of the leech *Theromyzon tessulatum* (O.F.M). **Can. J. Zool.**, 70, 856-865, 1992.
- Verger-Bocquet, M., Salzet, M. Tissue ACTH-like immunoreactivity is confirmed by ELISA. **Animal Biology.** sous presse, 1997.

- Vida, T.A., et Hersh, L.B. Glycosylation Variants of Endopeptidase 24.11 (« Enkephalinase »). **Neuropeptides**. 21, 245-255, 1992.
- Villard, E., Soubrier, F. Molecular biology and genetics of the angiotensin-I-converting enzyme : potential implications in cardiovascular diseases. **Cardiovascular Research**. 32, 999-1007, 1996.
- Wacksman, G., Hamel, E., Fournié-Zaluski, M.C. et Roques, B.P. Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase « enkephalinase » and of μ and δ opioid receptors in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 83 : 1523-1527 ; 1986 b.
- Webb, R.A. Intralamellar neurohemal complexes in the cerebral commissure of the leech *Macrobdella decora* (say, 1824) : an electron microscope study. **J. Morph.** 163, 157-165, 1980.
- Weigent, D.A., et Blalock, J.E. Production of Peptide Hormones and Neurotransmitters by the Immune System. **Neuroimmunoendocrinology**, 3rd rev ed. **Chem. Immunol.** Basel, Karger, vol.69, pp. 1-30, 1997.
- Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P. et Clauser, E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **J. Biol. Chem.** 266, 9002-9008, 1991.
- Welches, W.R., Brosnihan, K.B., et Ferrario, C.M. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes : Angiotensin Converting Enzyme, prolyl endopeptidase and Neutral Endopeptidase 24.11. **Life Sciences**. Vol.52, pp.1461-1480, 1993.
- Wilkialis, J. Investigations of biology of leeches of the Glossiphoniidae family. **Zool. Pol.** 20, 29-54, 1970.
- Wilkialis, J., Davies, R.W. The population ecology of the leech (Hirudinidae, Glossiphoniidae) *Theromyzon tessulatum*. **Can. J. Zool.** 58, 906-912, 1980a.
- Wilkialis, J., Davies, R.W. The reproduction biology of *Theromyzon tessulatum* (Hirudinidae, Glossiphoniidae) with comments on *Theromyzon rude*. **J. Zool. Lond.** 192, 421-429, 1980b.

- Williams, G.H., Chao, J., et Chao, L. Kidney Hormones. The Kallikein-Kinin and Renin-Angiotensin Systems. **Endocrinology : Basic and Clinical Principles**. Part V / Diseases and Systems (P.M. Conn and S. Melmed, eds.) Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp. 393-404, 1997.
- Yaksh, T.L. et Chipkin. Studies on the effect of SCH-34826 and Thiorfan on (Met5) enkephalin levels and release in rat spinal cord. **European Journal of Pharmacology**. 167 367-373, 1989.
- Yang, H.Y.T., Erdos, E.G., et Levin, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **Biochem. Biophys. Acta**. 214, 374, 1970.
- Zini, S., Fournie-Zaluski, M-C, Chauvel, E., Roques, B.P., Corvol, P. et Llorens-Cortes, C. 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**. Vol. 93, pp. 11968-11973, 1996.
- Zuzel, K.A., Rose, C., et Schwartz, J.C. Assesment of the role of « enkephalinase » in cholecystokinin inactivation. **Neuroscience**. 15 : 149-158, 1985.

ANNEXES

ANNEXE 1

Codes de 3 et de 1 lettres utilisés pour la dénomination des acides aminés

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Acide pyroglutamique	pGlu	pQ
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Méthionine sulfoxyde	Met(O)	M(O)
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

ANNEXE 2 : ABREVIATIONS

A₀ = Angiotensinogène
AI = Angiotensine I
AII = Angiotensine II
AIII = Angiotensine III
AIV = Angiotensine IV
ACE = Angiotensin converting enzyme
ACE-like = Molécule apparentée à l'ACE
ACELA = Test chromogénique de mise en évidence de l'ACE
ANF = Atrial natriuretic factor
ANP = Atrial natriuretic peptide
APP = β Amyloid Precursor Protein
BK = Bradykinine
Bz-G-H-L = Benzoyl Gly His Leu
CALLA = Common acute lymphoblastic leukemia antigen
CD10 = Class Differentiation « n°10 »
DIA = Dot immunobinding assay
DALA = D-Ala² Leucine enképhaline
EDTA = Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay
Enk-L = Leucine-enképhaline
Enk-M = Methionine-enképhaline
EP 24.11 = Endopeptidase 24.11
FMRFa = Phe-Met-Arg-Phe-amide
HPLC = High pressure liquid chromatography
Kcat = Constante de catalyse
Kcat/Km = Efficacité catalytique
KDa = kiloDaltons
Km = Constante de Mickaelis-Menten
Leu-enképhaline = Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
LH-RH = Luteinizing hormone-Releasing hormone
LORF = Leech Osmoregulator Factor
Met-enképhaline = Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
MSH = Melanocyte stimulating hormone
NEP = Neutral Endopeptidase
NT = Neurotensine
OT = Ocytocine
PAGE = Polyacrylamide gradient gel
POMC = Proopiomélanocortine
Rénine-like = Molécule apparentée à la rénine
RAS = Renin-Angiotensin system
RIA = Radio-Immuno Assay
SDS = Sodium dodecyl sulfate
SISP = Sodium Influx Stimulating Peptide
SNC = Système nerveux central
SP_{ACE} = Sites de clivage de la Substance P pour l'ACE
SP_{NEP} = Sites de clivage de la Substance P pour la NEP
TDP = Angiotensinogène, tétradécapeptide de synthèse
Tris = tris [hydroxyméthyl]aminométhane

