

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE  
U.F.R. DE BIOLOGIE**

Année 2001

N° ordre 2957

**THESE**

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

Par

Laurence DELOFFRE



**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES FACTEURS IMPLIQUES DANS  
L'OSMOREGULATION CHEZ LA SANGSUE *Heromyzon tessulatum***

Présentée le 15 juin 2001 devant la commission d'examen :

Président :	Mr le Professeur A. Canario
Directeurs de thèse :	Mr le Professeur J.C. Andries Mr le Docteur D. Vieau
Rapporteurs :	Mr le Docteur C. Lazure Mme le Docteur F. Pinet
Examineur :	Mr le Professeur M. Salzet

*À mes grand-mères*

*À mon grand-père*

*Il y aurait trop de choses à dire...*

*Mon plus grand regret est que vous ne soyez pas là afin que je puisse  
vous remercier autrement que par une dédicace...*



Devise Shadok

En essayant continuellement  
on finit par réussir. Donc :  
plus ça rate, plus on a  
de chances que ça marche.

... Il pensait savoir ce qu'était la science. Rien de plus que la curiosité...  
tempérée par l'humilité, disciplinée par la patience.

La science impliquait de *regarder* – d'une manière particulière.  
D'examiner avec une attention sans défaut ce qu'on ne comprenait pas...

Darwinia,  
Robert C. Wilson

Monsieur le Professeur Adelino Canario,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury, je vous en remercie ;

Madame le Docteur Florence Pinet,

Je vous exprime toute ma gratitude pour avoir accepté de siéger dans ce jury et pour avoir eu la gentillesse de bien vouloir être rapporteur de ce travail ;

Monsieur le Docteur Claude Lazure,

Je vous remercie pour votre gentillesse, votre disponibilité de tous les moments et pour vos conseils. Je suis flattée que vous ayez accepté de juger ce travail ;

Monsieur le Professeur Michel Salzet,

Je vous remercie de m'avoir acceptée au sein de votre unité et de m'avoir permis de réaliser ce travail ;

Monsieur le Professeur Jean-Claude Andries,

Je vous remercie pour la confiance et l'attention que vous m'avez accordées au cours de ces années et pour l'amélioration que vous avez apportée à ce manuscrit ;

Monsieur le Docteur Didier Vieau,

Je suis désolée mais je ne peux me résoudre à te vouvoyer. Tu as pris le train en marche... En effet, tu es arrivé il y a moins de deux ans mais tu as néanmoins énormément contribué à la réalisation de ce travail. Je te remercie pour toutes les connaissances et compétences que tu m'as apportées ainsi que pour nos discussions scientifiques (même si nous ne sommes pas toujours d'accord...). Je vais continuer à peaufiner ce que tu m'as enseigné afin qu'un jour, l'élève dépasse le maître...

Je tiens aussi à remercier

Mes parents et ma sœur. Voilà, elle est terminée ... Et cela n'aurait jamais été possible sans vous. Vous avez partagé les bons et les mauvais moments et je crois que, pour cela et pour plein d'autres choses, ce travail est autant le vôtre que le mien. J'espère qu'il vous plaira et encore une fois, merci ;

Mon meilleur ami, Phil. Notre amitié est une chose très précieuse à mes yeux. Merci de m'avoir soutenue et d'être toujours présent quand j'en ai besoin ;

Aurélie, Françoise, David, Marc et le reste de l'équipe qui a cohabité dans la salle de Bioch' (Oups, c'est la salle d'Immuno...). Un monde parallèle... Un petit grain de folie... Des fins de journées loufoques... Bref, une ambiance déjantée depuis quelque temps... Mêmes les plus calmes s'y sont mis... Tous ces fous rires resteront dans ma mémoire ;

Tous les membres du laboratoire d'Endocrinologie des Annélides et tout particulièrement P.E. (merci pour ton oreille attentive et pour tous tes conseils... Ah oui, je crois que les cours de bricolage et de système D sont une formation complémentaire qui me sera utile ; tu n'as rien à envier à Mcgyver !) et Claude (Je n'ai pas oublié les petits coups de pied au cul du début et je peux même dire que je t'en remercie ; merci aussi pour nos discussions que j'apprécie beaucoup...). Je n'oublie pas Annie, Marie-Christine et Stéphanie (ainsi que Christelle et Béatrice) : votre gentillesse et votre savoir-faire m'ont été d'un grand secours ;

Mes amis (Vincent, Béa, Claire, ... ; vous vous reconnaîtrez donc j'mets pas toute la liste!). Vous avez partagé mes premières années dans le domaine de la recherche : vous avez su écouter mes interrogations et supporter mon caractère (j'aimerais vous promettre que je serai dès aujourd'hui 'adorable' mais... Comme certains le disent « Laurence, en plus d'être Laurence, c'est Laurence ») ;

'Maman' Chantal (merci pour les pommes) et Odette. Je ne compte plus le nombre de fois où je suis passée vous voir à 'l'U.F.R.', j'espère que je ne vous ai pas trop embêté et je vous remercie pour vos encouragements (P.S. : pour le dépannage informatique, je vais vous laisser mon e-mail...)

Les enseignants de B.A. (Daniel, Bernard et les autres). Enseigner et discuter avec vous a été un grand plaisir ;

Et enfin, tous les gens qui, à un moment ou un autre, volontairement ou non, ont essayé de me faire trébucher. Vous aussi, vous m'avez appris beaucoup ; vous avez, certes, réussi à semer le doute dans mon esprit à plusieurs reprises mais vous n'avez fait que renforcer une idée ancrée au fond de moi : j'aime ce métier...

# Abréviations

ACN: Acétonitrile

ADNc : Acide d'oxyribonucléique complémentaire

A I: Angiotensine I

A II: Angiotensine II

ANF : Facteur Natriurétique Auriculaire

ARN : Acide RiboNucléique

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

DIA : Dot Immunobinding Assay

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ECA : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic

HIS : Hybridation *in situ*

KDa: kiloDalton

LORF : Leech OsmoRegulator Factor

OT : Ocytocine

pb: paire de base

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMSF : Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

qsp : Quantité suffisante pour ...

TBS : Tris-Buffered Sodium

TFA: Acide Trio Fluoro-Acétique

Tris: Tris [hydroxymethyl] aminométhane

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SRA : Système Rénine-Angiotensine

## RESUME

Chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*, après chaque repas, il y a mise en place de mécanismes osmorégulateurs. Après les deux premiers repas de sang, l'animal est soumis à une diurèse assurant la concentration des cellules sanguines ingérées. Le passage au stade 3 est marqué par une profonde antidiurèse, indispensable à la reproduction. Ces caractéristiques font de cette sangsue d'eau douce, un modèle de choix pour l'étude de l'osmorégulation.

Si plusieurs molécules à effet diurétique ont été caractérisées chez la sangsue, la nature des peptides responsables de l'antidiurèse reste, à ce jour, encore énigmatique. En couplant des approches biochimiques à des essais biologiques, nous avons démontré que deux peptides, le PLG-amide et le LORF, correspondent à des facteurs antidiurétiques. L'activité du LORF a été testée suite à la mise au point d'un système original basé sur la détection de protéines par électrophorèse capillaire. L'effet du LORF serait indirect et s'exercerait en inhibant spécifiquement l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), laquelle fait partie du système rénine-angiotensine (SRA) qui, chez les Vertébrés, joue un rôle prépondérant dans l'osmorégulation en permettant la formation d'angiotensine II (AII). Contrairement à la situation des Vertébrés où elle inhibe la diurèse, l'AII exerce un effet diurétique chez les Hirudinées, effet qui cesserait suite à l'action du LORF.

La sangsue est à ce jour le seul invertébré dont tous les composants du SAR ont été mis en évidence par des approches biochimiques. Par contre, du SAR, seule l'enzyme de conversion de l'angiotensine a été caractérisée chez les Arthropodes. Elle n'aurait cependant pas de rôle osmorégulateur. Afin de mieux comprendre ces différences phylogénétiques, nous avons entrepris le clonage de l'ECA de sangsue. Par des approches utilisant la PCR, nous avons caractérisé partiellement une molécule qui, de façon surprenante, s'apparenterait davantage aux enzymes mammaliennes qu'à l'ECA des insectes. Dans le futur, la caractérisation, à l'échelle moléculaire, des autres composants du RAS et du précurseur du LORF devraient faciliter notre compréhension des mécanismes physiologiques originaux de notre modèle : la sangsue *Theromyzon tessulatum*.

**Mots-clés :** Osmorégulation ; Sangsue ; *Theromyzon tessulatum* ; Système rénine-angiotensine ; Enzyme de conversion de l'angiotensine ; Leech OsmoRegulator Factor ; PLG-amide ; Inhibiteur d'enzyme ; Electrophorèse capillaire ; Hémérythrine



# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

Abréviations	10
Résumé	11
<b>INTRODUCTION</b>	<b>12</b>
<b>I L'OSMOREGULATION : PRINCIPES FONDAMENTAUX</b>	<b>13</b>
1. Les biotopes	15
2. Problèmes d'osmorégulation dans les différents biotopes	15
2.1 La vie en milieu marin	18
2.2 La vie en eau douce	18
2.3 La vie terrestre	18
<b>II LE CONTROLE HORMONAL DE L'OSMOREGULATION</b>	<b>19</b>
1. La vasopressine	19
1.1 L'implication dans l'osmorégulation des Vertébrés	22
1.1.1 Chez les Mammifères	22
1.1.2 Chez les espèces non mammaliennes	23
1.2 L'implication dans l'osmorégulation des Invertébrés	25
2. Le facteur natriurétique auriculaire	27
2.1 Le facteur natriurétique de type A ou l'ANF	27
2.2 Les autres facteurs natriurétiques	30
3. Le système Rénine-Angiotensine	31
3.1 Les composants du système rénine-angiotensine	31
3.1.1 Les peptides	31
L'angiotensine I et son précurseur	31
L'angiotensine II	33
L'angiotensine (1-7)	33
L'angiotensine III et l'angiotensine IV	34
3.1.2 Les 2 principales enzymes	35
La rénine	35
L'enzyme de conversion de l'angiotensine	35
Activité catalytique	36
Distribution	36

<i>Structure</i>	37
<i>Inhibition</i>	38
3.2 Les éléments du SRA des Vertébrés non mammaliens	41
3.2.1 Les peptides	41
3.2.2 L'enzyme de conversion de l'angiotensine	41
3.3 Les éléments du SRA chez les Invertébrés	41
3.3.1 Les peptides	41
3.3.2 Les enzymes	43
3.4 Implication du SRA dans l'osmorégulation	44
III POURQUOI UTILISER LA SANGSUE <i>Theromyzon tessulatum</i>	46
1. Données biologiques	46
2. <i>Theromyzon</i> , un modèle pour l'osmorégulation	48
3. Les mécanismes de l'osmorégulation chez <i>Theromyzon</i>	48
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>54</b>
ANIMAUX ET PREPARATIONS DES ECHANTILLONS	54
Animaux	54
Dissection	55
Extraction peptidique	56
Extraction des ARNs	57
ANTISERA ET TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES	58
Antiséra utilisés	58
Production d'un antiserum anti-LORFamide	59
Préparation de l'immunogène	59
Protocole d'immunisation	60
Tests immunologiques	61
Dot Immunobinding Assay	61
Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	62
TEST BIOLOGIQUE	63

<b>IMMUNOHISTOCHEMIE</b>	<b>64</b>
<i>Préparation des coupes</i>	64
<i>Immunohistochimie</i>	65
<b>PURIFICATION LORS DE LA CARACTERISATION DU PLG-AMIDE</b>	<b>66</b>
<b>DETERMINATION DE L'IC50 DU LORF-AMIDE</b>	<b>67</b>
<i>Digestion et détection par ELISA</i>	67
<i>Digestion et détection par électrophorèse capillaire</i>	68
<b>CLONAGE DE L'ECA ET DU PRECURSEUR DU LORF-AMIDE</b>	<b>69</b>
<i>Préparation de l'ADNc</i>	69
<i>Polymerase Chain Reaction</i>	70
<i>Sondes utilisées</i>	71
<b>RESULTATS</b>	<b>72</b>
<b>L'ANTIDIURESE : LE LORF</b>	<b>73</b>
L'antisérum anti-LORF	75
L'antisérum anti-LORF $\alpha$ -amidé	76
Comparaison de l'antisérum anti-LORF et anti-LORF $\alpha$ -amidé par DIA76	
Distribution du LORF $\alpha$ -amidé	77
Le LORF $\alpha$ -amidé inhibe-t-il l'ECA ?	81
Développement d'une approche par ELISA	81
Détermination de l'IC50 du LORF $\alpha$ -amidé par électrophorèse capillaire	84
Recherche du précurseur potentiel du LORF $\alpha$ -amidé	88
<b>L'ANTIDIURESE : LE PLG-AMIDE</b>	<b>91</b>
Quantification du matériel immunoréactif à l'antisérum anti-ocytocine	
au cours des stades 2 et 3	91
Purification d'un nouveau facteur anti-diurétique	92
Activité biologique du PLG-amide	94

<i>LA DIURESE : L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE</i>	97
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>113</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>125</b>



# INTRODUCTION



L'osmorégulation assure, à l'échelle de l'organisme, le maintien de la concentration en solutés du milieu intérieur et ce quel que soit son environnement (eau de mer, eau douce, milieu terrestre). L'osmorégulation compense les éventuels mouvements d'eau et d'ions créés par les différences de concentration entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Claude Bernard, physiologiste français du 19<sup>ème</sup> siècle, fut le premier à émettre le concept de « fixité du milieu intérieur » : le milieu intérieur, le milieu extracellulaire pour les êtres pluricellulaires, possède une composition définie et constante, laquelle est indispensable à la vie de l'organisme. Peu après, Walter Cannon introduisit le terme d'homéostasie, extension du précédent concept, défini comme la tendance des organismes à stabiliser, dans des limites variables mais précises, les paramètres du milieu intérieur.

## ***I. L'osmorégulation : principes fondamentaux***

L'eau est le solvant biologique universel dans lequel ions et molécules organiques sont dissous en concentrations variables afin de conférer une pression osmotique aux liquides physiologiques. Quantitativement, les ions prédominants des milieux extracellulaires sont le sodium ( $\text{Na}^+$ ) et le chlore ( $\text{Cl}^-$ ). Les autres, en dépit de leur

importance physiologique, ont des concentrations beaucoup plus modestes:  $K^+$  (prédominant dans le milieu intracellulaire),  $CO_3H^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ... En fonction de la concentration du milieu intérieur, il est possible de distinguer les espèces à concentration élevée en solutés dont la pression osmotique est celle de l'eau de mer (1 à 1,1 Osm/l ; Invertébrés marins, myxine, cœlacanthe, Chondrichtyens) de celles dont la pression osmotique relativement constante est nettement plus faible, souvent de l'ordre de 300 à 400 mOsm/l (très grande majorité des Vertébrés, Invertébrés dulcicoles et terrestres). Le tableau 1 détaille la composition du milieu intérieur de quelques espèces représentatives .

	$Na^+$	$Cl^-$	$K^+$	$Ca^{2+}$	$Mg^{2+}$
<b>Eau de mer</b>	<b>500</b>	<b>550</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>50</b>
<b>Eau douce</b>	<b>0,2-5</b>	<b>0,2</b>	<b>0,05</b>	<b>0,5-5</b>	<b>0,2-0,4</b>
Cnidaires (Aurélia)	496	571	10,6	9,5	49
Annélides (Aphrodite)	498	549	10,4	10,0	50
Echinodermes (Oursin)	496	549	10	10,1	49
Crustacés (Crabe)	555	549	12,2	11,7	18
Mollusques (Moule)	496	545	11,9	11,4	48
Cyclostomes (Myxine)	561	534	9	5,6	17
Elasmobranches (Squale)	290	280	7	3,0	4
Téléostéens (Truite)	160	130	5	6	2
Téléostéens EM (Morue)	170	150	6	6	3
Amphibiens (Grenouille)	110	80	5	3	3
Reptiles (Iguane)	150	130	4	3	1
Oiseaux (Poule)	150	120	6	2	-
Mammifères (Homme)	140	103	4	2,5	0,6

Tableau 1 : Concentrations ioniques du milieu intérieur de différentes espèces comparées à celle des milieux environnants (espèces marines ; espèces d'eau douce ou terrestres)

Une des hypothèses tendant à expliquer la faible concentration ionique plasmatique des Vertébrés par rapport à celle de l'eau de mer fait état d'une mer ancestrale dans laquelle la vie aurait pris naissance, mer dont la composition en sels était plus faible que celle des océans actuels. Des êtres pluricellulaires s'y seraient développés acquérant un milieu intérieur de concentration osmotique égale à celle du milieu environnant. Par la suite, grâce à la mise en place et au développement de systèmes de régulation de l'équilibre hydrominéral, ces organismes auraient colonisé

pratiquement tous les biotopes possibles à la surface de la terre, devenant autonomes vis à vis du milieu ambiant.

### *1. LES BIOTOPES*

Les organismes peuvent évoluer dans deux biotopes distincts caractérisés par des paramètres physico-chimiques très différents : l'environnement terrestre et l'environnement aquatique. Encore faut-il distinguer en fonction de la teneur en sels les milieux marins, saumâtres et l'eau douce.

Les océans recouvrent plus de 70% de la surface du globe ce qui représente une masse considérable permettant de conserver une composition ionique et gazeuse stable dans le temps et l'espace. La pression osmotique est d'environ 1 Osm et la salinité, principalement due à la présence de NaCl, est de 35 ‰. Les ions divalents représentent quelques dizaines de mOsm et le phosphate n'y est pas présent. La présence d'ions bicarbonates leur confère un pH alcalin proche de 8,2. Une autre caractéristique concerne la faible mais très constante teneur en O<sub>2</sub>.

L'eau douce est caractérisée par une extrême variabilité de sa composition. La pression osmotique varie entre 0,1 et 10 mOsm et la composition ionique dépend de nombreux facteurs tels que la nature du sol, les intempéries... Le pH, la température et par répercussion la concentration en O<sub>2</sub> fluctuent également.

Les eaux saumâtres caractérisent les estuaires dans lesquels l'eau douce se mélange à l'eau de mer. Leur salinité variable y est, par conséquent, intermédiaire entre celle du milieu marin et celle de l'eau douce.

### *2. LES PROBLEMES D'OSMOREGULATION DANS LES DIFFERENTS MILIEUX*

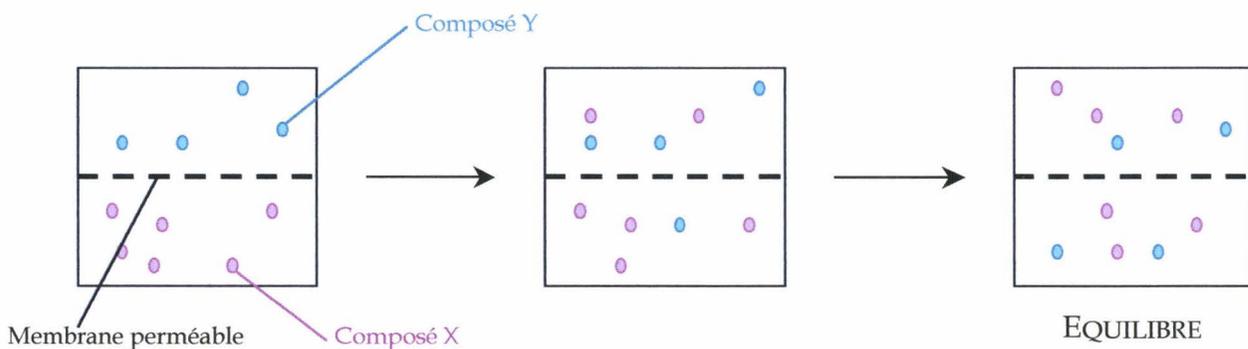
Quelque soit leur biotope, tous les organismes, à de rares exceptions près, subissent des stress hydriques et ioniques dont la nature et l'intensité sont fonction de l'environnement.

Dans un environnement marin, les organismes peuvent être iso-osmotiques (éventuellement très légèrement hyper-osmotiques) ou hypo-osmotiques au milieu ambiant. Inversement, les espèces d'eau douce sont hyper-osmotiques. Dans la majorité

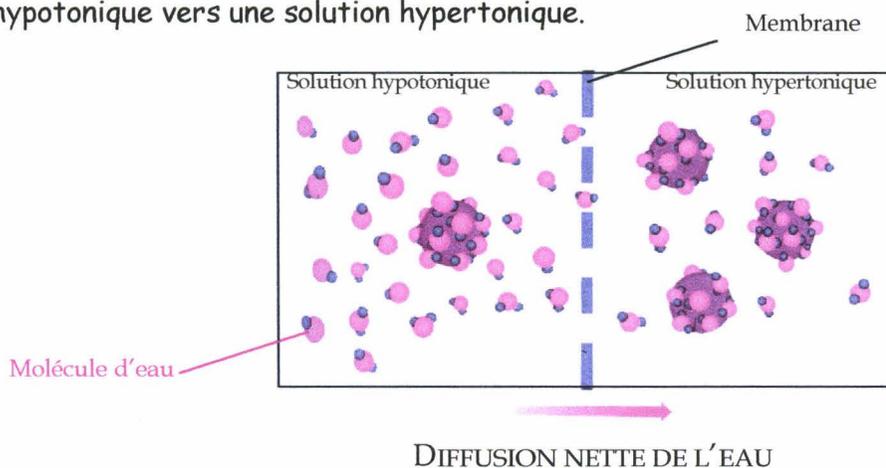
des cas, les espèces sont sténohalines, c'est à dire qu'elles ne peuvent supporter des variations importantes de l'osmolarité du milieu externe et, de ce fait, sont sédentaires. A l'inverse, les espèces euryhalines sont susceptibles de subir des variations considérables de salinité du milieu ambiant. C'est le cas de Vertébrés inférieurs comme les Agnathes mais également des Salmonidés ou des Anguillidés, qui effectuent de véritables migrations lors de leur reproduction. Lors de ces transitions eau douce-eau de mer (et vice-versa) l'organisme sera à même de modifier, de façon conséquente, ses transports membranaires pour conserver un milieu intérieur relativement constant malgré les importantes variations de salinité de l'environnement.

Deux règles peuvent être énoncées afin d'expliquer les mouvements passifs de l'eau et des ions :

1 En absence d'autres forces, une substance (ion ou molécule) diffuse de la zone la plus concentrée vers la zone la moins concentrée selon son gradient de concentration et cela indépendamment des autres substances.



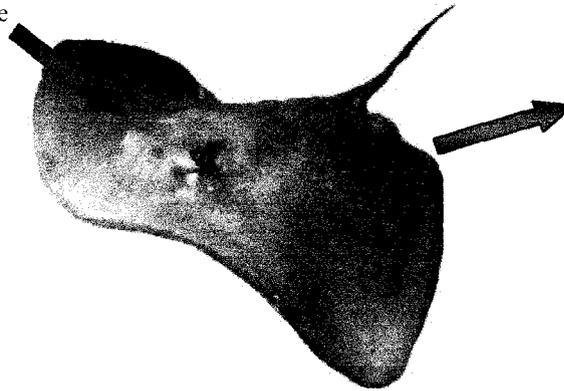
2 L'eau tend à diffuser à travers une membrane semi-perméable d'une solution hypotonique vers une solution hypertonique.



POISSONS CARTILAGINEUX

Légère entrée d'eau par les branchies masquée par une entrée passive de sels

Elimination active des ions grâce à une glande à sel, glande rectale



a

Raie

POISSONS OSSEUX MARINS

Perte d'eau par osmose

Apport d'eau et de sel par ingestion d'aliments et d'eau de mer

Poisson clown



b

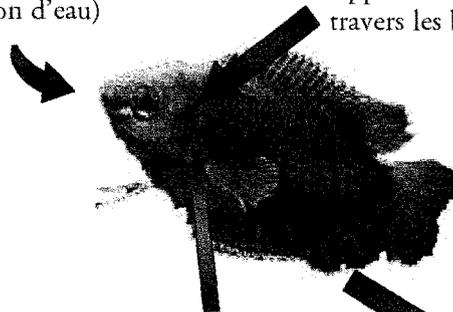
Perte d'eau par excrétion d'une urine iso-osmotique ou légèrement hyper-osmotique au plasma et peu abondante

Excrétion par les branchies de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  en excès

POISSONS OSSEUX D'EAU DOUCE

Apport d'eau et de certains ions par ingestion d'aliment (pas d'ingestion d'eau)

Apport d'eau par osmose à travers les branchies



Gourami

c

Apport de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  par les branchies

Grandes quantités d'urine hypotonique

Figure 1 : Comparaison de l'osmorégulation chez les poissons cartilagineux et les poissons osseux marins et d'eau douce

## 2.1 La vie en milieu marin

En milieu marin, les poissons cartilagineux (Chondrichthyens) maintiennent des concentrations en électrolytes relativement faibles par rapport à celles de l'eau de mer. Néanmoins, leur osmolarité est voisine de celle du milieu marin grâce à la rétention d'une grande quantité de solutés organiques sous forme d'urée. La production d'un composé organique, l'oxyde de triméthylamine (TMAO), empêche la dénaturation des protéines liées à la présence de l'urée. La concentration de ces deux molécules dans le sang de l'animal les rend très légèrement hyper-osmotiques par rapport à leur milieu. Ce gradient osmotique, bien que faible, provoque une entrée passive d'eau salée par les branchies, l'élimination des ions excédentaires étant réalisée par une glande rectale (glande à sel débouchant dans l'anus) (fig. 1a).

Les poissons osseux (Ostéichthyens), descendants hypothétiques d'ancêtres adaptés aux habitats d'eau douce, sont hypo-osmotiques. La perte d'eau constante, par osmose à travers les surfaces tégumentaires et plus particulièrement par les surfaces branchiales, est compensée par l'ingestion d'eau de mer (eau de boisson) et par l'élimination des ions en excès par transport actif à travers l'épithélium branchial. L'urine des Téléostéens marins est peu abondante et concentrée (fig. 1b).

## 2.2 La vie en eau douce

Les animaux vivant en eau douce connaissent des stress hydriques inverses de ceux des organismes marins. Ils subissent continuellement une entrée d'eau par osmose qu'ils rejettent en éliminant de grandes quantités d'urine diluée. Cette excrétion provoque une perte de sels qui est compensée par l'alimentation. Chez les poissons Téléostéens, une absorption active d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  s'effectue au niveau des cellules à chlorures branchiales (fig. 1c).

## 2.3 La vie en milieu terrestre

Dans le milieu terrestre, les organismes sont soumis à une déshydratation systématique ; l'organisme subit des pertes d'eau, ne serait ce que par la respiration. Ce

phénomène pourrait d'ailleurs expliquer en partie pourquoi seuls deux groupes d'animaux (Arthropodes et Vertébrés) ont été capables de coloniser la Terre avec succès (d'autres embranchements possèdent des représentants vivant sur la terre ferme, mais la plupart de leurs espèces sont aquatiques).

L'unique source d'eau, hormis l'eau métabolique, réside dans l'eau de boisson et dans les aliments. Afin de limiter la déshydratation, deux stratégies existent :

- la limitation des pertes d'eau par différentes stratégies adaptatives telles que l'imperméabilisation des surfaces cutanées (comme par exemple les écailles et l'exosquelette...), la récupération de l'eau expirée (ex. : nez du dromadaire), la vie nocturne (comportements adaptatifs de nombreux animaux désertiques),
- la capacité d'excréter dans le milieu extérieur un liquide plus concentré que le plasma grâce à des systèmes comme les glandes à sel des Reptiles et des Oiseaux ou les reins à néphrons avec anse de Henlé des animaux homéothermes (Oiseaux et Mammifères).

## *II. Le contrôle hormonal de l'osmorégulation*

Les fonctions physiologiques sont ajustées aux besoins de l'organisme via le système endocrinien et le système nerveux. Il en est ainsi de la fonction osmorégulatrice. Nous ne développerons ici que le contrôle endocrinien sans par autant nous intéresser aux récepteurs avec lesquels interagissent les hormones.

### *1. LA VASOPRESSINE*

Chez les Mammifères, dès le début du 19<sup>ème</sup> siècle, des activités biologiques ont été associées à la neurohypophyse et deux hormones distinctes identifiées : l'ocytocine et la vasopressine (ou hormone antidiurétique). L'ocytocine est connue, entre autres, pour sa stimulation de la contraction du muscle utérin lors de la parturition tandis que la principale fonction de la vasopressine est de favoriser la rétention d'eau par

réabsorption au niveau des tubules rénaux. Ainsi, bien que la structure primaire des deux molécules ne diffère que par deux acides aminés (positions 3 et 8 ; fig. 2), les fonctions physiologiques sont différentes.

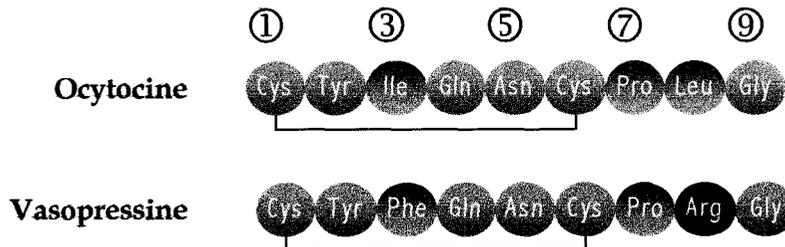


Figure 2 : Séquences de l'ocytocine et de l'Arginine-vasopressine. Les numéros situés au dessus des séquences correspondent à la position des acides aminés. La correspondance des couleurs est donnée au niveau de la figure 3

Depuis, des molécules apparentées ont été caractérisées dans l'ensemble du règne animal (Fig. 3). Chez les Vertébrés, des Cyclostomes aux Mammifères, 13 hormones neurohypophysaires ont été identifiées (Acher, 1985 ; Acher et coll., 1992). Chez les Invertébrés, 5 molécules ont été mises en évidence. Tous les membres de cette famille sont des nonapeptides dont la masse moléculaire est de l'ordre du kDa. De par la présence d'un pont disulfure entre les 1<sup>er</sup> et 6<sup>ème</sup> acides aminés, les molécules se présentent sous la forme d'un cycle de 6 acides aminés se prolongeant par une chaîne de 3 acides aminés.

Toutes les espèces de Vertébrés, à l'exception des Cyclostomes (Lane et coll., 1988), synthétisent au moins deux hormones neurohypophysaires (chez les Marsupiaux, 3 à 4 hormones peuvent être présentes (Chauvet et coll., 1983)) : une apparentée à l'ocytocine et une à la vasopressine.

Chez les Invertébrés, aucune espèce ne semble posséder conjointement les deux molécules. Par exemple, la limnée (*Lymnaea stagnalis*) possède une Lysine-conopressine apparentée à la vasopressine tandis que l'ADNc correspondant à l'ocytocine n'a pu être mis en évidence (Van Kesteren et coll., 1995).

Motif conservé	Cys			Asn	Cys	Pro		Gly
<b><u>VERTEBRES</u></b>								
<i>Famille de l'ocytocine</i>								
Ocytocine	Tyr	Ile	Gln					Leu
Mésotocine	Tyr	Ile	Gln					Ile
Isotocine	Tyr	Ile	Ser					Ile
Glumitocine	Tyr	Ile	Ser					Gln
Valitocine	Tyr	Ile	Gln					Val
Aspartocine	Tyr	Ile	Asn					Leu
Asvatocine	Tyr	Ile	Asn					Val
Phasvatocine	Tyr	Phe	Asn					Val
<i>Famille de la vasopressine</i>								
Arginine - Vasopressine	Tyr	Phe	Gln					Arg
Lysine - Vasopressine	Tyr	Phe	Gln					Lys
Phénylpressine	Phe	Ile	Ser					Arg
Arginine - Vasotocine	Tyr	Ile	Ser					Arg
<b><u>INVERTEBRES</u></b>								
<i>Famille de l'ocytocine</i>								
Céphalotocine	Tyr	Phe	Arg					Ile
Annétocine	Tyr	Phe	Arg					Ile
<i>Famille de la vasopressine</i>								
Arginine - Conopressine	Ile	Ile	Arg					Arg
Lysine - Conopressine	Phe	Ile	Arg					Lys
Locupressine	Leu	Ile	Thr					Arg

Figure 3 : Les hormones des familles de l'ocytocine et de la vasopressine des Vertébrés et les molécules apparentées identifiées chez les Invertébrés

	Acide aminé hydrophobe
	Acide aminé polaire
	Acide aminé basique

Ces hormones neurohypophysaires sont issues de la protéolyse d'un large précurseur (Richter, 1983 ; Brownstein, 1983). Les deux hormones ont chacune leur précurseur propre, lequel engendre également une autre molécule spécifique : la neurophysine. Ainsi la préproressophysine renferme la séquence de la vasopressine et de la neurophysine II et la préproocypophysine, la séquence de l'ocytocine et de la neurophysine I.

### *1.1 Implication dans l'osmorégulation des Vertébrés*

#### *• Chez les Mammifères*

Chez les Mammifères euthériens (à l'exception des porcins), il s'agit d'Arginine vasopressine.

La principale fonction de la vasopressine concerne la régulation de la fonction rénale où elle provoque une réabsorption massive d'eau au niveau du tube collecteur. Pour cette raison elle est également appelée hormone antidiurétique (HAD).

Les Mammifères éliminent une urine hyper-osmotique au plasma. Il existe une étroite corrélation entre cette disposition et la structure des reins. L'apparition de l'anse de Henlé dans le néphron crée une situation nouvelle (déjà annoncée chez les Oiseaux) : cette structure en épingle à cheveux se caractérise par sa capacité à produire un important gradient osmotique cortico-papillaire par un système d'échange de NaCl à contre-courant. Dans la zone corticale (tubule distal), l'urine est iso-osmotique ou légèrement hypo-osmotique alors qu'une urine hyper-osmotique est excrétée au niveau de la zone médullaire. L'aptitude d'un mammifère à concentrer l'urine est directement liée à la longueur de l'anse de Henlé ; celle-ci est particulièrement développée chez les espèces vivant dans le désert.

En absence de vasopressine, le gradient osmotique ne peut se réaliser : l'urine définitive est iso-osmotique au plasma et le débit urinaire est augmenté (diabète insipide). Il existe donc une relation entre la sécrétion de l'hormone et la capacité du rein à produire une urine concentrée, de même qu'il existe un rapport entre la teneur en hormone de la glande et la longueur de l'anse de Henlé.

La vasopressine est aussi impliquée, chez les Mammifères, dans le mécanisme complexe de la soif. Un organisme vivant en milieu terrestre va compenser ses pertes d'eau par la boisson. Une composante nerveuse (liée à la dessiccation orale) et une composante endocrinienne interviennent dans le réflexe de boisson. L'une des modalités de contrôle est liée à l'effet osmotique : l'augmentation de la pression osmotique extracellulaire provoque un influx nerveux déclenchant la soif et une libération de vasopressine qui induit une rétention rénale d'eau.

• *Chez les espèces non-mammaliennes*

Les tétrapodes non-mammaliens (Amphibiens, Reptiles et Oiseaux) possèdent deux hormones neurohypophysaires : la mésotocine ([Ile8]-ocytocine) et la vasotocine ([Ile3]-vasopressine).

Les oiseaux possèdent un rein dont la structure se rapproche de celle des mammifères : la vasotocine y exerce une fonction antidiurétique et possède donc une activité comparable à celle de la vasopressine chez les Mammifères. Lors d'une déshydratation ou de l'injection d'une solution hyper-osmotique, l'hormone est libérée au niveau de la neurohypophyse (Shimada et coll., 1991). L'injection de la vasotocine, chez la poule (*Gallus domesticus*), entraîne une diminution du volume urinaire. L'effet de la mésotocine est plus complexe d'autant que ses effets sont inversés en fonction de la dose administrée. Elle est antidiurétique à faibles doses et induit une augmentation du volume urinaire à fortes concentrations (Takahashi et coll., 1995).

Les Amphibiens vivant à la fois en milieu aquatique et en milieu terrestre présentent, du fait de cette dualité, une vaste gamme d'adaptations.

Une grenouille, à qui l'on injecte un extrait hypophysaire, subit une augmentation de poids. Cet effet, appelé « effet Brunn », correspond à une absorption d'eau au niveau de la peau et de la vessie par augmentation de la perméabilité osmotique (Calamita et coll., 1994). Si les épithélia tégumentaire et vésical des espèces plus ou moins inféodées au milieu terrestre (grenouille, crapaud...) répondent ainsi, il n'en est pas de même pour

les espèces aquatiques, comme le xénope, dont les épithélia sont très peu perméables. Il s'agit d'une adaptation physiologique des animaux sujets à la déshydratation. Chez la grenouille mangeuse de crabes (*Rana cancrivora*), espèce vivant dans les mangroves immergées d'eau salée d'Asie du Sud-Est, l'augmentation de la pression osmotique est liée à l'accumulation de l'urée dont la réabsorption au niveau de la vessie urinaire est facilitée par la vasotocine (Elliott et Chew, 1975 ; Jorgensen, 1997) ; seul l'épithélium vésical est perméable à l'eau et sensible aux hormones (Dicker et Elliot, 1969, 1970).

Il est intéressant de noter que, chez les Amphibiens, les 2 hormones neurohypophysaires sont responsables des effets décrits ci-dessus.

Au niveau rénal, la vasotocine a un effet antidiurétique (Pang et Sawyer, 1978).

Par ailleurs, une famille de molécules apparentées à la vasotocine, les hydrines, a été identifiée dans la neurohypophyse des Amphibiens Anoures. Ces peptides semblent dériver du précurseur de la vasotocine et de la neurophysine II. L'hydrine 1 (vasotocinyl-Gly-Lys-Arg) a été caractérisée chez les formes aquatiques (*Xenopus laevis*). L'hydrine 2 (vasotocinyl-Gly) se rencontre chez les formes terrestres (*Rana esculenta*) (Rouillé et coll., 1989). Ces molécules sont exclusivement actives sur les épithélia épidermique et vésical.

Classification/ Espèces	Hormone apparentée à la vasopressine	Hormone apparentée à l'ocytocine
<b>Elasmobranch</b>		
Pleurotrème (Requins)		
<i>Squalus acanthias</i> <sup>1</sup>	Vasotocine	Aspartocine Valitocine
<i>Scyliorhinus canicula</i> <sup>2</sup>	Vasotocine	Asvatocine Phasvatocine
Hypotrème (Raies)		
<i>Raja clavata</i> <sup>3</sup>	Vasotocine	Glumitocine
<i>Raja batis</i> <sup>4</sup>	Vasotocine	Glumitocine
<i>Raja fullonica</i> <sup>5</sup>	Vasotocine	Glumitocine
<i>Raja naevus</i> <sup>5</sup>	Vasotocine	Glumitocine
<b>Holocéphale</b>		
Chimériforme		
<i>Hydrolagus colliei</i> <sup>6</sup>	Vasotocine	Ocytocine

Tableau 2 : Les hormones neurohypophysaires des poissons cartilagineux. <sup>1</sup> : Acher et coll., 1972 ; <sup>2</sup> : Chauvet et coll., 1994 ; <sup>3</sup> : Acher et coll., 1965 ; <sup>4</sup> : Chauvet et coll., 1965 ; <sup>5</sup> : Acher et coll., 1967 ; <sup>6</sup> : Michel et coll., 1993

Les Ostéichtyens synthétisent de la vasotocine ainsi que de l'isotocine ( [Ser4, Ile8]-ocytocine). Néanmoins, les Dipneustes, poissons pulmonés, constituent une exception parmi les poissons osseux : la mésotocine y remplace l'isotocine (Acher et coll., 1970). Les Chondrichtyens produisent de la vasotocine et des peptides apparentés à l'ocytocine, à l'exception des Holocéphales qui, comme les Mammifères synthétisent de la vasotocine et de l'ocytocine (tableau 2).

Chez *Anguilla anguilla*, la vasotocine ou l'isotocine, à faible dose, est antidiurétique chez les animaux adaptés à l'eau douce alors qu'elle ne produit aucun effet chez les animaux 'marins'. A forte dose et dans les deux cas, l'injection des mêmes molécules produit une diurèse, sous forme d'une urine très diluée (Babiker et Rankin, 1978). Chez les Téléostéens d'eau douce, au niveau de l'épithélium branchial, la vasotocine stimule l'entrée de sodium et inhibe l'entrée d'eau. Par ailleurs, elle provoque une forte diurèse, par recrutement glomérulaire. L'ensemble, sauvegarde de sel et élimination de l'eau, favorise l'osmorégulation en eau douce. Cette action diurétique n'est pas observée chez les poissons marins qui ne peuvent se permettre une production d'urine diluée. Chez les poissons cartilagineux, la fonction des hormones neurohypophysaires n'est pas clairement établie. Il semblerait que la vasotocine exerce un rôle dans la réabsorption de l'urée au niveau du néphron (Acher et coll., 1999).

### *1.2 Implication dans l'osmorégulation des Invertébrés*

Chez les Invertébrés, comme il a été mentionné précédemment, la co-existence des deux hormones au sein d'un même organisme n'a jamais été démontrée. Des peptides apparentés à la vasopressine ont été caractérisés chez les Mollusques Gastéropodes (Moore et coll., 1981 ; Cruz et coll., 1987 ; Van Kesteren et coll., 1992 ; Nielsen et coll., 1994), les Annélides Achètes (Salzet et coll., 1993a) et les Insectes (Proux et coll., 1987) tandis que chez des Mollusques Céphalopodes (Reich., 1992) et chez les Annélides Oligochètes (Oumi et coll., 1994), des molécules proches de l'ocytocine ont été isolées.

Contrairement à ce qui est observé chez les Vertébrés, il n'est pas possible d'attribuer une fonction à chaque type de molécule et leur rôle reste souvent obscur.

La Lysine-conopressine isolée chez les Mollusques ne semble pas impliquée dans la fonction osmorégulatrice. Chez *Lymnaea stagnalis* (Mollusque Gastéropode), elle agit comme neuromédiateur au niveau du cerveau et de l'organe copulateur mâle (Van Kesteren et coll., 1995). Elle induit la contraction des conduits déférents provoquant l'éjaculation au moment de la copulation et inhibe les cellules neuroendocrines qui coordonnent le comportement reproducteur femelle. En conclusion, bien que structurellement plus proche de la vasopressine, la Lysine-conopressine des Mollusques contrôle des fonctions reproductrices analogues aux fonctions qu'exerce l'ocytocine chez les Vertébrés.

Chez *Erpobdella octoculata* (Annélide Achète), la Lysine-conopressine exerce une action diurétique. Lorsque le peptide est injecté dans la cavité coelomique de l'animal, une perte de masse est rapidement observée. Une donnée comparable s'observe chez *Locusta migratoria* où l'Arginine-vasotocine existe sous deux formes : soit elle est monomérique et inactive, soit elle forme un homodimère anti-parallèle actif, exerçant une action directe sur les tubes de Malpighi (Proux et coll., 1988 ; Picquot et Proux, 1990).

L'annétocine, peptide apparenté à l'ocytocine, caractérisé chez *Eisenia foetida* (Annélide Oligochète), présente une activité proche de celle de la vasopressine. Elle produit des contractions spontanées de l'intestin ainsi que des contractions pulsatiles des néphridies (Oumi et coll., 1994). Selon Fujino et coll. (1999), l'injection d'annétocine ou de Lysine-conopressine à des sangsues provoque à la fois une diminution de leur masse corporelle et un comportement de ponte. Les Achètes et les Oligochètes montrant un tel comportement secrètent une grande quantité de mucus qui participera entre autres à la formation du cocon (Barnes, 1987 ; Oumi et coll., 1996). Ainsi, en période reproductrice, une partie de la perte de poids pourrait ainsi être due à la sécrétion de cette substance quoique celle-ci soit aussi observée, mais en quantité moindre, en dehors de celle-là.

## 2. LE FACTEUR NATRIURETIQUE AURICULAIRE

L'existence physiologique du facteur atrial natriurétique (ANF) a été mise en évidence chez le rat dans les années 70 : des changements dans l'apport alimentaire d'eau et de sodium entraînent des variations du contenu des myocytes cardiaques, suggérant un lien avec l'équilibre hydro-osmotique (de Bold, 1979). L'injection d'un extrait de tissu auriculaire dans la circulation sanguine exerce un puissant effet diurétique et natriurétique au niveau rénal et un effet hypotenseur au niveau de la circulation générale (de Bold, 1981). La molécule responsable de ces effets fut caractérisée peu après : il s'agit d'une hormone cardiaque appelée facteur natriurétique auriculaire (ANF) (Flynn et coll., 1983, de Bold, 1985).

Depuis, d'autres molécules apparentées ont été isolées dans les différents groupes de Vertébrés : chez les tétrapodes, les peptides de type B et de type C ; chez les poissons, les peptides de type C et de type V. Ils agissent de concert dans la réduction du volume sanguin et de la pression sanguine et assurent leur maintien (Brenner et coll., 1990 ; Rosenzweig et Seidman, 1991). Tous les membres de la famille présentent une signature caractéristique : un pont disulfure permet la formation d'une boucle de 17 acides aminés au sein de laquelle la séquence est particulièrement bien conservée.

Aucune de ces molécules n'a, à ce jour, été caractérisée chez les Invertébrés.

### 2.1 *Le facteur natriurétique de type A ou ANF*

La forme prédominante de l'hormone comporte 28 acides aminés. La structure moléculaire du facteur est très variable d'une espèce à l'autre. Des poissons aux Mammifères, 5 séquences de 1 à 4 acides aminés sont conservées (fig. 4 ; Misono, et coll., 1984 ; Sakata et coll., 1988 ; Seidman et coll., 1985 ; Takei et coll., 1989). Au sein d'une même espèce, plusieurs molécules actives co-existent telles que, chez l'homme, l'auriculine (Atlas et coll., 1985) et les atriopeptides (Needleman et coll., 1985) (fig. 5).

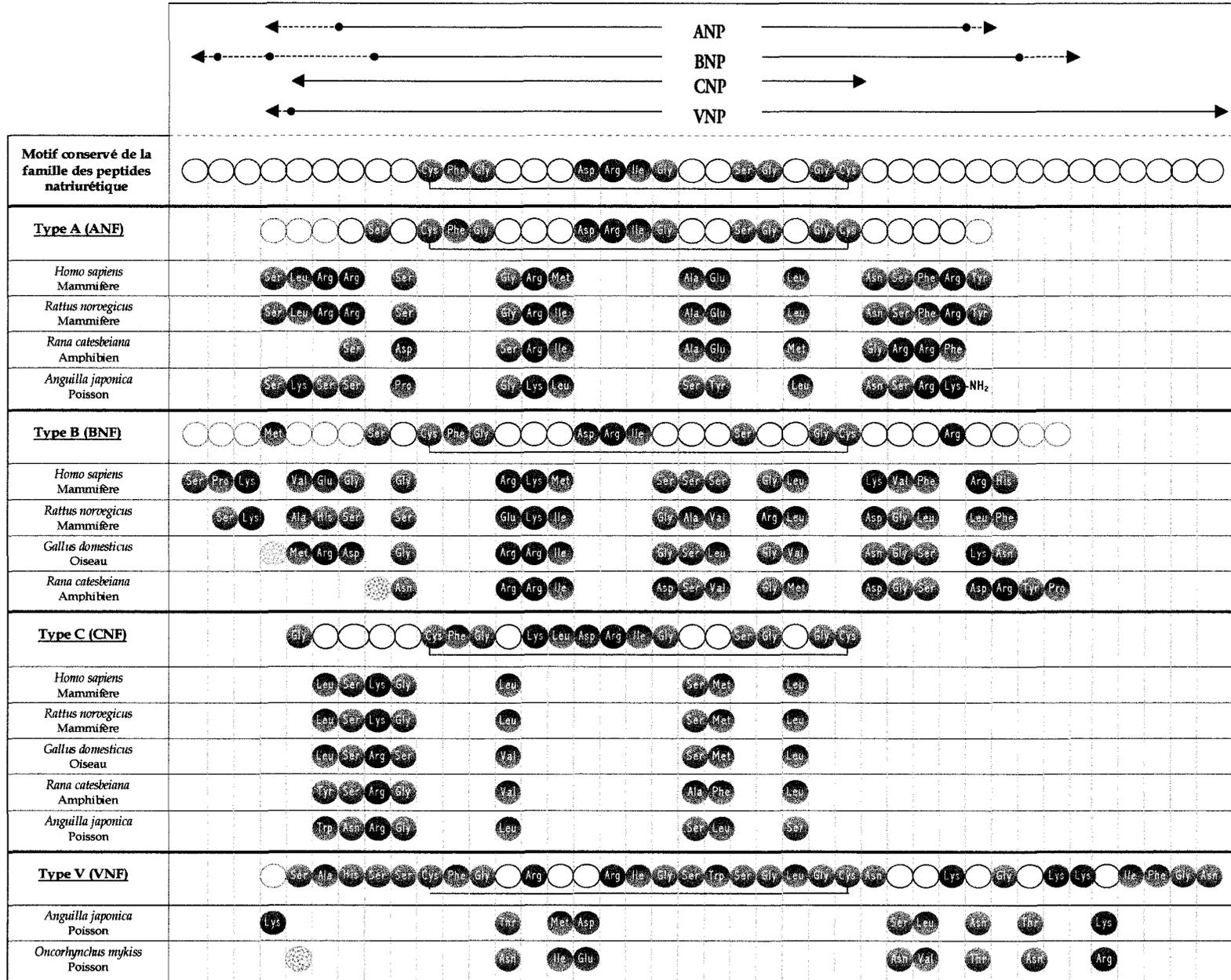


Figure 4 : Les peptides natriurétiques dans différentes espèces

Acide aminé hydronhobe   
  Acide aminé basique   
  Acide aminé polaire

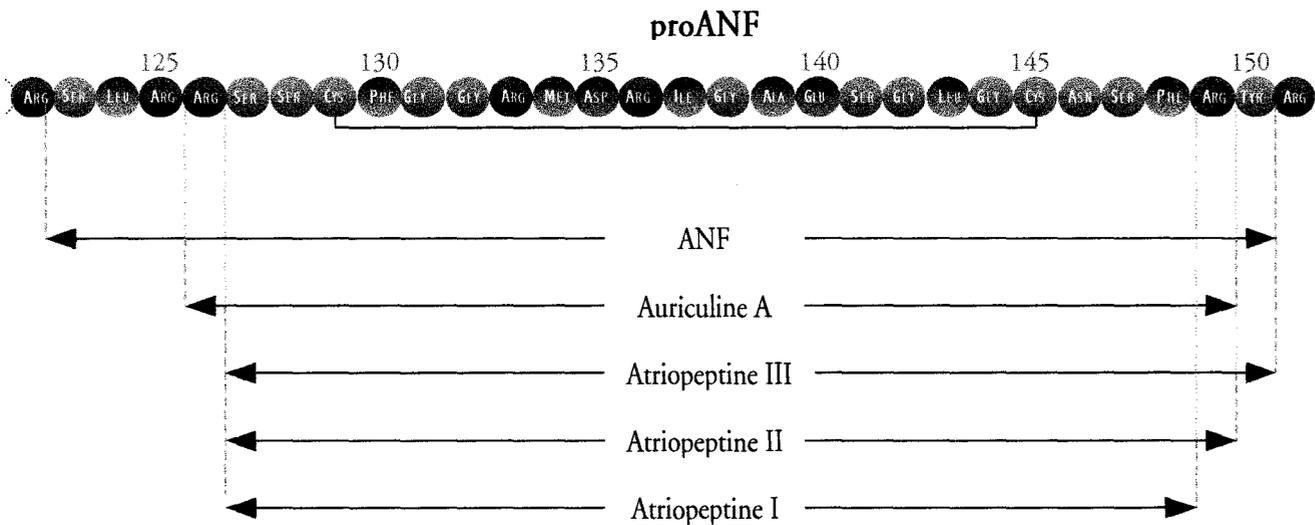


Figure 5: Structure des peptides natriurétiques cardiaques dérivés du proANF chez l'homme. Les numéros situés au dessus de la séquence du proANF correspondent à la position des acides aminés dans le précurseur. La correspondance des couleurs est donnée au niveau de la figure 3

L'ANF est issu de la maturation d'un prépropeptide de 151 acides aminés. Le stockage intracellulaire se fait sous forme de pro-ANF, après clivage du peptide signal. La sécrétion du facteur dans le sang est sous contrôle d'un grand nombre de facteurs tels que l'élévation de la pression sanguine, elle-même due à l'action d'agents vasoconstricteurs comme la vasopressine (Januszewicz, 1992 ; Levin et coll., 1992).

L'ANF cause une profonde natriurèse et diurèse chez la plupart des Vertébrés (Evans, 1990 ; Takei et Balment, 1993).

Chez les Mammifères, l'ANF exerce de nombreux effets. Lors d'une augmentation de la pression artérielle, la distension des oreillettes entraîne la sécrétion de l'hormone par les atriocytes et les myocytes, laquelle provoque en réponse une vasodilatation et une importante diurèse/natriurèse suite à une augmentation de la filtration glomérulaire (Maack et Kleinert, 1986). Par ailleurs, l'ANF inhibe la libération de rénine (Kurtz et coll., 1986) et celle d'aldostérone (Delkers et coll., 1988).

Chez les non-mammaliens, des effets analogues sont retrouvés. L'ANF stimule la sécrétion de la glande rectale des Chondrichthyens et l'excrétion de NaCl par les

épithélia branchial et operculaire des Téléostéens marins (Broadhead et coll., 1992 ; Silva et coll., 1987). Toutefois, chez *Amyda japonica*, l'injection d'atriopeptine III de rat ne produit aucun effet sur l'équilibre hydro-osmotique (Cho et coll., 1988) et chez *Squalus acanthias*, la même molécule cause une antidiurèse et une antinatriurèse (Benyajatis et Yokota, 1990).

## 2.2 Les autres facteurs natriurétiques

Le peptide de type B (BNP) a été initialement identifié à partir de cerveau de porc (Sudoh et coll., 1988a) quoiqu'il soit secrété de façon prédominante par le ventricule cardiaque ; il est, au même titre que l'ANF, une hormone cardiaque (Minamino et coll., 1988 ; Sudoh et coll., 1988b ; Ogowa et coll., 1991). Ce facteur est spécifique des seuls Vertébrés tétrapodes, ayant été caractérisé des Amphibiens aux Mammifères (fig. 5 ; Fukuzawa et coll., 1996 ; Miyata et coll., 1988 ; Nakao et coll., 1989). Sa structure primaire ainsi que sa taille sont très variables. Ses fonctions sont comparables à celle de l'ANF.

Le peptide de type C (CNP), constitué de 22 acides aminés, a été isolé à partir d'extraits de cerveaux de porc (Sudoh et coll., 1990). La séquence du CNP est très bien conservée au cours de l'évolution (fig. 5 ; Arimura et coll., 1991 ; Kojima et coll., 1990, 1994 ; Hagiwara et coll., 1995). Son lieu de production et ses actions diffèrent de ceux des autres peptides natriurétiques. Il peut être secrété à partir des épithélia vasculaires (Suga et coll., 1992) et des glandes endocrines (Fowkes et McArdle, 2000) ; son mode d'action est de type autocrine ou paracrine. Le CNP n'exerce pas d'action diurétique ni d'action natriurétique chez *Canis familiaris* alors qu'il induit un puissant effet hémodynamique (Stingo et coll., 1992). De plus, il stimule plutôt qu'il inhibe l'envie de boire chez le rat (Samson et coll., 1991) et semble agir en tant qu'inhibiteur endogène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine soluble (Davidson et coll., 1996).

Le peptide de type V (VNP) est spécifique des Téléostéens (fig. 5 ; Hagiwara et coll., 1995). Possédant une extension C-terminale de 36-37 a. a., il présente peu de

variations structurales d'une espèce à l'autre. Purifié à partir de ventricules cardiaques d'*Anguilla japonica* en 1991 par Takei et coll., il provoque les mêmes effets biologiques que l'ANF (Takei et Balment, 1993). Comme pour le peptide de type A, sa sécrétion est stimulée par des variations osmotiques et volumétriques (Kaiya et Takei, 1996). Le VNP est stocké à la fois dans le ventricule et l'oreillette cardiaque.

Du point de vue évolutif, le CNP semble être la molécule ancestrale. Le VNP présente davantage d'homologie avec l'ANF qu'avec le BNP. Présent uniquement chez les Téléostéens, sa divergence d'avec le CNP précède celle de l'ANF et à fortiori celle du BNP, spécifique des tétrapodes.

### 3. LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE

Depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, on sait que l'injection d'un extrait salin de rein déclenche, chez les Mammifères, une élévation de la pression sanguine (Tiegerstedt et Bergman, 1898). De même, une ischémie prolongée du rein, obtenue par ligature incomplète de l'artère afférente rénale, provoque une forte hypertension dans la circulation générale. De nombreuses études ultérieures ont montré que cette réponse était due au système rénine-angiotensine (SRA).

Ce système endocrinien joue un rôle fondamental dans le contrôle de la pression sanguine et de l'équilibre hydrominéral. Les relations existant entre les différents composants du système sont indiquées sur la figure 6.

#### 3.1. Les composants du système rénine-angiotensine

La description réalisée ci-dessous correspond au modèle mammalien.

##### 3.1.1 Les peptides

- L'angiotensine I et son précurseur

L'angiotensine I est un décapeptide dépourvu d'action biologique, obtenu par hydrolyse de l'angiotensinogène sous l'effet de la rénine. Ce précurseur appartient à la

famille des globulines et plus précisément, chez l'homme, à la superfamille des serpinés. Chez les Mammifères, il est synthétisé au niveau du foie (Campbell et coll., 1995) mais peut aussi être produit par d'autres organes comme le rein, le cœur ou même certaines régions du cerveau (Williams et coll., 1997). Excrété de façon constitutive, son taux plasmatique peut être augmenté suite à l'action de stéroïdes et de l'angiotensine II.

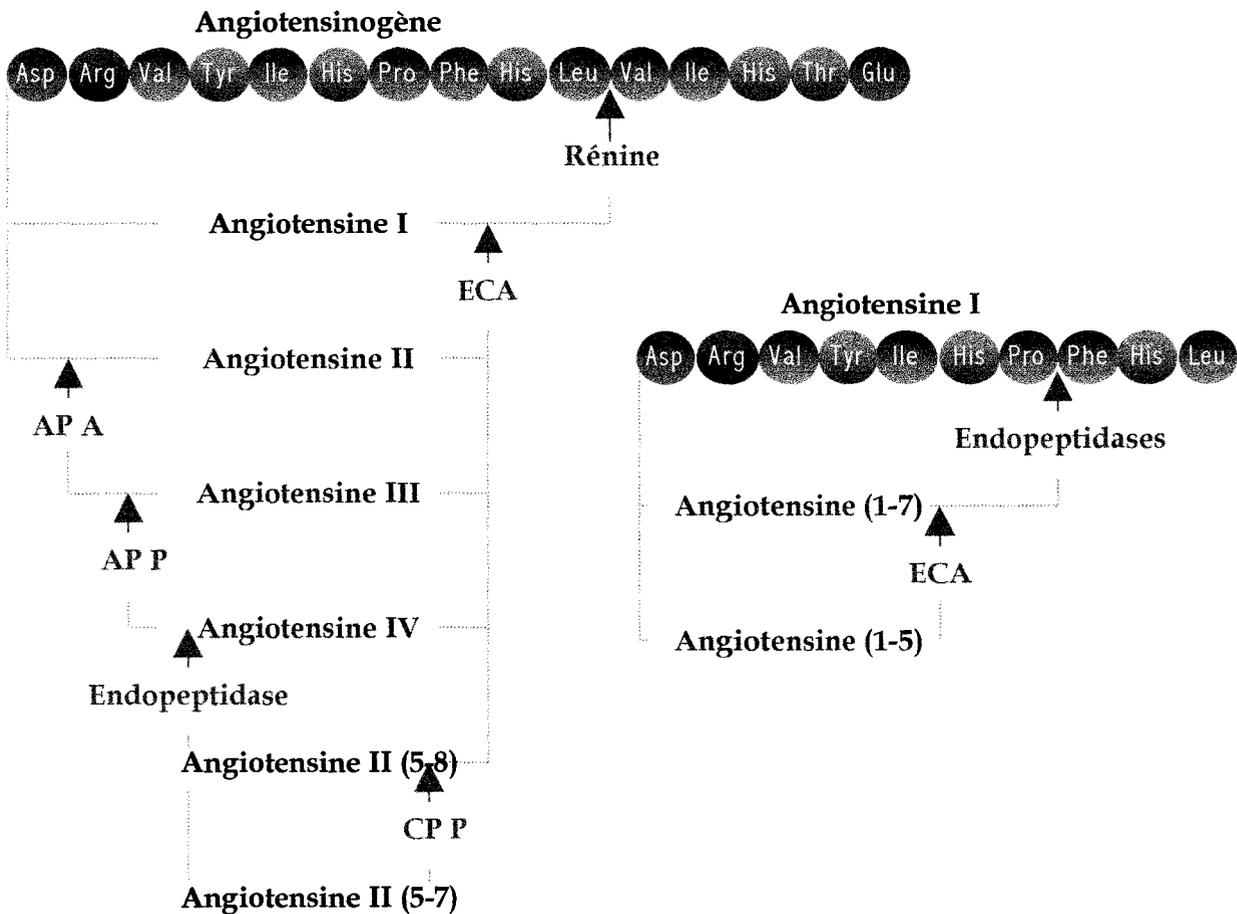


Figure 6 : Formation et devenir des angiotensines. Les enzymes du système figurent en vert (ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine ; AP A : Aminopeptidase A ; AP P : Aminopeptidase P ; CP P : Carboxypeptidase P). Les peptides à activités biologiques sont présentés en bleu

Sous l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), le décapeptide est converti en un octapeptide biologiquement actif, l'angiotensine II, par libération des deux acides aminés C-terminaux (C-ter).

### • L'angiotensine II

Découverte en 1940 par Page et Helmer, l'angiotensine II est produite suite au clivage de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Source de multiples effets biologiques, sa présence dans le sang permet de considérer l'octapeptide comme une hormone. Il s'agit d'une substance vasoconstrictrice endogène très puissante responsable de l'apparition d'une hypertension, agissant via :

- la synthèse et la libération d'aldostérone à partir de la corticosurrénale ;
- la libération des catécholamines à partir de la médullosurrénale.

Par ailleurs, elle entraîne une sensation de soif, conduisant l'animal à boire et, par la même, à augmenter son volume extracellulaire.

Comme l'ANF (Cleland et Reid, 1996 ; Phillips et Summers., 1998), l'angiotensine II assure le maintien de la pression artérielle et la conservation du volume sanguin.

Néanmoins, il semble que l'angiotensine II soit impliquée dans des mécanismes différents comme le maintien de l'homéostasie de la matrice extracellulaire (régulation de l'élaboration de TGF- $\beta_1$ ; Weber et coll., 1999), l'apprentissage et la mémoire (Baranowska et coll., 1983) ou encore l'apoptose (Kajstura et coll., 1997 ; Pierzchalski et coll., 1997).

### • L'angiotensine (1-7)

Bien que connu structurellement depuis de nombreuses années (Bumpus et Khosla, 1977), l'étude de ce peptide est récente car il fut longtemps considéré comme un produit de dégradation inactif du métabolisme du SRA. Bien que l'angiotensine (1-7) ne diffère de l'angiotensine II que par l'absence de la phénylalanine du côté C-ter, il n'en a pas les effets. Ainsi, dans l'organisme, l'angiotensine (1-7) contrebalance les effets de l'angiotensine II dans certains tissus, ayant un effet hypotenseur bien qu'il mime ses actions dans d'autres structures : par exemple, les deux peptides provoquent au niveau du cerveau, une sécrétion de vasopressine mais seule l'angiotensine II induit la soif (Ferrario et coll., 1998).

L'heptapeptide est produit par des endopeptidases tissu-spécifiques (neprilysine, prolyl-endopeptidase 24.26, endopeptidase 24.15) à partir d'angiotensine I (Welches et coll., 1993). L'inactivation du peptide par l'ECA est réalisée par clivage des 2 acides aminés en position C-ter (angiotensine (1-5)). Cependant, l'angiotensine (1-7) n'est pas seulement un substrat mais aussi un inhibiteur endogène de l'ECA et, de ce fait, est considéré comme un modulateur important du SRA (Debbish et coll., 1998 ; Roks et coll., 1999).

#### • L'angiotensine III et l'angiotensine IV

Par l'action d'aminopeptidases, il y a production, à partir de l'angiotensine II, de 2 peptides biologiquement actifs ayant respectivement 7 (Ang III) et 6 a. a. (Ang IV). L'aminopeptidase A produit l'angiotensine III qui sert de substrat à l'aminopeptidase P pour engendrer l'angiotensine IV. Cette dernière peut toutefois être obtenue directement à partir de l'angiotensine II par élimination du dipeptide N-terminal (N-ter) par l'aminopeptidase III.

L'angiotensine III a un rôle régulateur au niveau du cerveau. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'aminopeptidases permet de montrer que cet heptapeptide possède des effets équivalents à ceux de l'angiotensine II. Néanmoins, il joue en plus un rôle prédominant dans la sécrétion de la vasopressine (Zini et coll., 1996). En effet, son injection intra-cérébro-ventriculaire cause, chez le rat, une excitation neuronale et la libération de vasopressine.

L'angiotensine IV exerce un effet vasodilatateur aux niveaux rénal et cérébral. De même que l'angiotensine II, elle semble favoriser l'apprentissage et la mémoire. L'injection intra-cérébro-ventriculaire du peptide augmente le comportement d'exploration du rat et facilite l'apprentissage de l'animal lors des tests neuro-comportementaux (Braszko et coll., 1991).

### 3.1.2. *Les deux principales enzymes*

#### • La rénine

La rénine est le premier élément à avoir été identifié au sein du SRA. L'enzyme est une endopeptidase de 42 kDa appartenant à la famille des protéases à aspartyl. Bien que, chez les Mammifères, elle soit synthétisée à divers sites, la rénine rénale prédomine : cette dernière est produite par les cellules juxtaglomérulaires rénales, cellules de la paroi vasculaire des artérioles afférentes du glomérule. Elle est synthétisée sous forme d'une prépro-rénine de 406 a. a. stockée dans le réticulum endoplasmique. L'obtention de l'enzyme active est réalisée par séparation successive d'un peptide signal de 20 a. a. (pro-rénine) et d'un peptide de 46 a. a. Les parties N-ter et C-ter de la rénine sont similaires et font de cette molécule une enzyme à double domaine catalytique. Chacun de ces domaines possède un acide aspartique, essentiel pour son activité catalytique. L'angiotensinogène est, à l'heure actuelle, le seul substrat connu de cette endopeptidase.

L'appareil juxtaglomérulaire secrète la rénine dans le sang suite à un stimulus qui peut être soit une baisse de la pression sanguine dans les artérioles afférentes du glomérule, ou bien la baisse de la concentration sodique dans le tube distal des néphrons, ou encore une stimulation nerveuse d'origine sympathique.

#### • L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine

L'ECA (peptidyl dipeptidase A, EC 3.4-15.1) est une métalloprotéase dépendante du zinc. Elle a été découverte grâce à son activité sur l'angiotensine I (Skeggs et coll., 1956) et doit son nom à cette implication dans le SRA.

Chez l'homme, trois formes d'ECA, produites par deux gènes différents, ont été caractérisées. Un gène code une ECA somatique (soluble ou transmembranaire) et une ECA germinale (transmembranaire) de même activité et de même sensibilité à un panel d'inhibiteurs tels que le captopril et le lisinopril. Le second gène, connu depuis peu, est à l'origine d'une ECA (ACEH ou ACE2) différant fonctionnellement des deux autres (Tipnis et coll., 2000 ; Donoghue et coll. , 2000).

### *Activité catalytique*

Les ECA somatique et testiculaire présentent une double activité de carboxypeptidase et d'endopeptidase. Elles possèdent un spectre d'action très large. La bradykinine, peptide vasodilatateur, est leur second substrat : l'élimination des 2 a. a. en position C-ter dans la molécule la rend inactive, ce qui provoque une augmentation de la pression artérielle (Yang et coll., 1970). D'autres oligopeptides, comme la neurotensine et les enképhalines, subissent cette activité carboxypeptidasique (Welches et coll., 1993). L'ECA agit en tant qu'endopeptidase sur des substrats  $\alpha$ -amidés (comme la substance P) en clivant le dipeptide C-ter amidé. Dans le cas de la lulibérine, le clivage du tripeptide C-ter mais aussi N-ter est possible (Skidgel et coll., 1984 ; Skidgel et Erdos, 1985).

L'ACEH ne présente qu'une action de carboxypeptidase. Elle clive *in vitro* l'angiotensine I pour produire de l'angiotensine (1-9) et l'angiotensine II pour produire de l'angiotensine (1-7). Elle est également à même de cliver la des-Arg-bradykinine ainsi que la neurotensine (mais non la bradykinine).

### *Distribution*

L'ECA somatique présente une distribution très large : la bordure en brosse intestinale, les tubules proximaux rénaux (Kenny et Ingram, 1987), le placenta (Skidgel et Erdos, 1993), les poumons, l'endothélium vasculaire au sein de nombreux organes tels que le cœur et le cerveau (Beldent et coll., 1995). Elle semble concentrée à proximité des sites de production de l'angiotensine II et d'autres neuropeptides comme les tachykinines. Sa large distribution et son grand nombre de substrats potentiels font que l'ECA est impliquée dans de multiples mécanismes comme l'osmorégulation, le contrôle de la pression sanguine et le développement rétinien (Wheeler-Schilling et coll., 2001).

L'ECA germinale est localisée exclusivement au niveau des testicules et est associée aux spermatozoïdes Elle est impliquée dans la spermatogenèse et la fertilité (Krege et coll., 1995).

La localisation de l'ACEH est restreinte au cœur, au rein et aux testicules.

### *Structure*

L'ECA transmembranaire, quelque soit sa forme, est constituée d'un domaine N-ter extracellulaire bilobé portant les sites catalytiques, d'une région transmembranaire (17 a. a.) et d'un court domaine C-ter intracellulaire. L'activité est inhibée par l'EDTA et la 1,10 phénanthroline ce qui signifie que l'ECA nécessite un atome métallique pour son activité catalytique (Corvol et coll., 1995 ; Tipnis et coll., 2000). Elle appartient au groupe des protéases à zinc. Cette famille contient une séquence en a. a. caractéristique, HEXXH, dans laquelle les résidus histidine servent à lier l'atome de zinc (Rawlings et Barrett, 1993 ; Coleman, 1998).

L'ECA somatique est composé de 2 domaines homologues dénommés N et C en raison de leur position, respectivement, N- et C-ter dans la protéine (fig. 7a et b). Chacun de ces domaines lie le zinc et possède une activité catalytique (Wei et coll., 1991). Cependant, malgré une forte homologie de séquence, les deux sites ne possèdent pas les mêmes propriétés enzymatiques. L'activité hydrolytique du domaine C vis à vis de l'angiotensine I et de la substance P est supérieure à celle du domaine N alors que celui-ci clive plus rapidement la lulibérine (Jaspard et coll., 1993). La forme soluble de la molécule est engendrée par un clivage protéolytique de la forme membranaire grâce à l'action d'une sécrétase (Oppong et Hooper, 1993 ; Woodman et coll., 2000).

L'ECA germinale est plus courte que la précédente (chez l'homme, 732 acides aminés contre 1306) ; elle n'est constituée que du seul domaine C attaché à la membrane plasmique (fig. 7c). Excepté les 67 derniers acides aminés N-ter qui sont spécifiques, la séquence de la molécule est identique à la portion C-ter de l'ECA somatique (Elhers et coll., 1989). Elle provient du même gène que l'enzyme somatique mais sa transcription est sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique (Langford et coll., 1991 ; Erickson et coll., 1996).

L'ACEH, dont la structure a été déduite de l'ADNc, serait constituée de 805 a. a. avec un domaine transmembranaire faisant le lien entre une partie N-ter extracellulaire et une partie C-ter cytoplasmique. Comme la forme testiculaire, elle ne contient qu'un

seul site catalytique. Des études sur des cultures de cellules ont montré qu'une forme soluble active pouvait également être produite (Tipnis et coll., 2000).

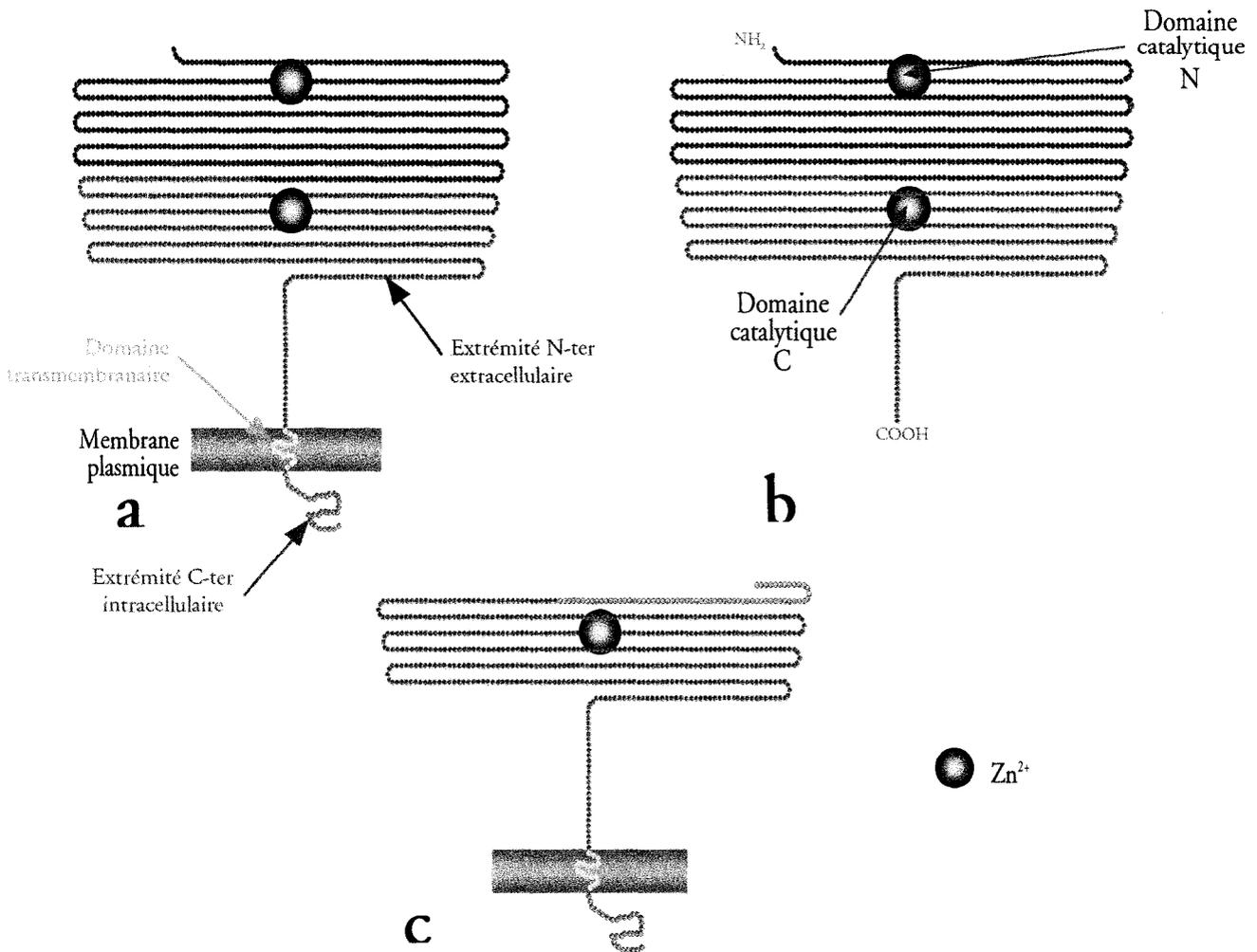


Figure 7: Représentation schématique des ECA somatiques et germinale humaines : A: ECA somatique transmembranaire ; B: ECA somatique soluble ; C: ECA germinale. Les résidus figurés en bleu sont spécifiques de l'enzyme transmembranaire et les verts, de l'enzyme germinale

### ***Inhibition***

La liste des inhibiteurs présentés ci-dessous n'est pas exhaustive.

De nombreuses molécules de synthèse inhibent l'ECA. Ces molécules sont utilisées dans le traitement de nombreuses pathologies associées à l'hypertension et aux maladies cardiaques. La plus connue d'entre elles est le captopril ([2S]-N-[3-mercaptopropionyl]-L-proline) (fig. 8).

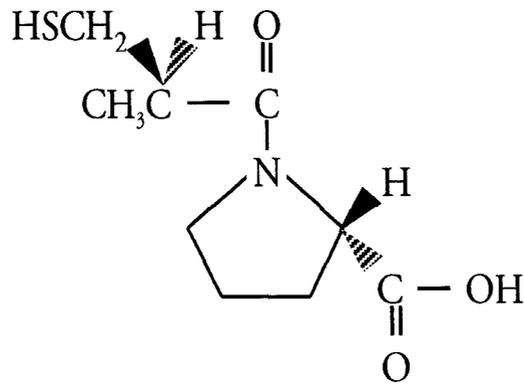


Figure 8 : Captopril ([2S]-N-[3-mercaptopropionyl]-L-proline)

Des peptides inhibant l'ECA ont été caractérisés chez quelques espèces animales. Les premiers identifiés proviennent de venin de *Bothrops jararaca* (Ferreira, 1965). Injectés lors de la morsure avec d'autres produits, ils empêchent l'inactivation de la bradykinine de la proie en agissant sur l'ECA, d'où leur nom de « peptides activateurs de la bradykinine » ; ils induisent ainsi une vasodilatation qui entraîne la formation d'œdèmes et une sensation de douleur. Depuis, des molécules apparentées structurellement ont été isolées chez d'autres Vipéridés et Crotalidés (Ferreira et coll., 1970 ; Kato et Suzuki, 1970 ; Politi et coll., 1985 ; Ferreira et coll., 1998). En règle générale, elles sont formées de 5 à 13 a. a. et présentent un résidu pyroglutamique en position N-ter, une forte proportion de prolines et le tripeptide Ile-Pro-Pro en position C-ter (Fig. 9). Ce tripeptide terminal joue un rôle prédominant dans la fixation compétitive au site actif de l'enzyme. Les études structure/fonction menées sur les analogues synthétiques de ces molécules montrent que l'ECA présente une faible affinité pour les substrats ou les inhibiteurs avec un acide dicarboxylique C-ter mais que le résidu aromatique antépénultième améliore la fixation (Cushman et coll., 1973 ; Cheung et coll., 1980).

D'autres animaux venimeux produisent des peptides agissant de la même façon comme, par exemple, le peptide K12 de *Buthus occitanus* (Meki et coll., 1995) et le BPP-S de *Scaptocosa raptoria* (Ferreira et coll., 1996). Bien que leur action soit similaire, ils ne présentent pas les caractéristiques des peptides des Ophidiens.

<p><i>Bothrops insularia</i> Reptile (Ophidien)</p>	<p>Gln Lys Trp Gln Gln Lys Gln Lys Trp Ala Pro Gln Trp Gly Gln His Pro Asn Ile Pro Pro Gln Asn Trp Pro His Pro Gln Ile Pro Pro Gln Gly Gly Pro Pro Arg Pro Gln Ile Pro Pro Gln Leu Gly Pro Pro Arg Pro Gln Ile Pro Pro Gln Gly Gly Trp Pro Arg Pro Gly Pro Glu Ile Pro Pro</p>
<p><i>Bothrops jararaca</i> Reptile (Ophidien)</p>	<p>Gln Asn Trp Pro Arg Pro Gln Ile Pro Pro Gln Gly Gly Trp Pro Arg Pro Gly Pro Glu Ile Pro Pro</p>
<p><i>Vipera aspic</i> Reptile (Ophidien)</p>	<p>Gln Gly Trp Pro Gly Pro Lys Val Pro Pro</p>
<p><i>Gloydius halys pallas</i> Reptile (Ophidien)</p>	<p>Gln Gly Arg Pro Pro Gly Pro Pro Ile Pro Pro</p>
<p><i>Gloydius halys blomhoffi</i> Reptile (Ophidien)</p>	<p>Glu Gly Leu Pro Pro Arg Pro Ile Pro Pro Glu Gly Pro Pro Arg Gly Ile Pro Pro Glu Gly Leu Pro Pro Arg Pro Lys Ile Pro Pro Glu Gly Leu Pro Pro Gly Pro Pro Ile Pro Pro Glu Lys Trp Asp Pro Pro Pro Val Ser Pro Pro Gln Gly Leu Pro Pro Arg Pro Lys Ile Pro Pro</p>
<p><i>Sarda orientalis</i> Poisson (Ostéichthyen, Téléostéen)</p>	<p>Ile Arg Pro Val Pro Ala Leu Pro His Ala Gly Val Tyr Pro His Lys Ser Val Ala Lys Leu Glu Lys</p>
<p><i>Thunnus albacares</i> Poisson (Ostéichthyen, Téléostéen)</p>	<p>Pro Thr His Ile Lys Trp Gly Asp</p>

 Acide aminé hydrophobe  
  Acide aminé basique  
  Acide aminé polaire  
  Acide aminé acide

Figure 9 : Quelques inhibiteurs endogène de l'ECA

Des inhibiteurs de l'ECA sont également connus chez les poissons : 4 molécules chez *Sarda orientalis* (Matsumura et coll., 1993) et une chez *Thunnus albacores* (Kohama et coll., 1988) (fig. 9). Chez le thon, seule la partie N-ter de la molécule est active, les fragments centraux ou C-ter étant inactifs (Kohama et coll., 1991).

### 3.2 Les éléments du SRA des Vertébrés non-mammaliens

#### 3.2.1 Les peptides

Le SRA apparaît ubiquiste chez les Vertébrés. A ce jour, l'angiotensine ou des molécules apparentées ont été isolées chez de nombreux chordés à l'exception des Myxinoïdés (Kobayashi et Takei, 1996).

La cascade métabolique est identique des Poissons aux Mammifères (Olson et coll., 1992). L'angiotensine II, peptide à activité biologique, est formée à partir de l'angiotensine I et inactivée par hydrolyse. Actuellement, aucun fragment biologiquement actif issu de l'octapeptide n'a été identifié chez les Poissons. Il en est de même pour les Reptiles, les Amphibiens et les Oiseaux. La structure primaire de l'angiotensine I est particulièrement bien conservée au cours de l'évolution : les variations observées concernant les acides aminés en position 1, 5 et 9 (fig. 10).

#### 3.2.2 L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine

Bien que l'ECA ait été identifiée dans tous les groupes, sa structure protéique n'est connue, actuellement, que chez le poulet (*Gallus domesticus*) : la séquence déduite de l'ADNc révèle qu'elle présente une forte homologie avec l'ECA somatique de Mammifères. Elle possède deux sites putatifs de fixation du zinc au centre de deux domaines homologues (Esther et coll., 1994).

## 3.3 Les éléments du SRA des Invertébrés

## 3.3.1 Les peptides

Motif conservé										
	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	Leu		
<i>Homo sapiens</i> Mammifère	Asp			Ile				His		
<i>Bos taurus</i> Mammifère	Asp			Val				His		
<i>Coturnix japonica</i> Oiseau	Asp			Val				Ser		
<i>Bothrops jararaca</i> Reptile (Ophidien)	Asp			Ile				Tyr		
<i>Alligator mississippiensis</i> Reptile (Saurien)	Asp			Val				Ala		
<i>Trachemys scripta</i> Reptile (Chélonien)	Asp			Val				His		
<i>Rana catesbeiana</i> Amphibien (Anoure)	Asp			Val				Asn		
<i>Amphiuma tridactylum</i> Amphibien (Urodèle)	Asn			Val				★ ★		
<i>Anguilla rostrata</i> Poisson (Ostéichthyen, Téléostéen)	Asn			Val				Gly		
<i>Amia calva</i> Poisson (Ostéichthyen, Holostéen)	Asp			Val				Asn		
<i>Triakis scyllium</i> Poisson (Chondrichthyen, Pleurotrème)	Asn			Ile				Gln		
<i>Haematobia irritans</i> Arthropode (Insecte)	Asp			Ile				His		
<i>Theromyzon tessulatum</i> Annélide (Hirudiné)	Asp			Ile				His		

● Acide aminé hydrophobe    ● Acide aminé basique    ● Acide aminé polaire    ● Acide aminé acide    ★ Non déterminé

Figure 10 : Variations interspécifiques des séquences primaires des angiotensines

Chez *Drosophila melanogaster*, une analyse du génome ne révèle l'existence d'aucune molécule apparentée à l'angiotensinogène ou à la kininogène, précurseurs protéiques de l'angiotensine I et de la bradykinine. Néanmoins, l'angiotensine I a été

identifiée chez deux espèces d'Invertébrés, *Haematobia irritans* (Insecte, diptère ; Wijffels et coll., 1996) et *Theromyzon tessulatum* (Annélide, Hirudinée ; Salzet et coll., 1996a) (fig. 10). De façon surprenante, dans les deux cas, les molécules présentent une parfaite identité avec celle des Mammifères. La même similitude est observée entre l'angiotensine II humaine et celle d'*Erpobdella octoculata* (Annélide, Hirudinée) à l'exception près que le peptide annélide possède une  $\alpha$ -amidation C-ter (Salzet et coll., 1995). Chez *Theromyzon tessulatum*, l'existence d'une angiotensine IV a été suggérée (Salzet et coll., 1993b). Enfin, l'hypothèse de l'existence d'une molécule apparentée à l'angiotensinogène au niveau du système nerveux d'*Aplysia californica* (Mollusque, Gastéropode) a été émise (Gonzalez et coll., 1995).

### 3.3.2 Les enzymes

Actuellement, la seule rénine-like identifiée l'a été chez *Theromyzon tessulatum* (Laurent et Salzet, 1995a).

A l'opposé, l'ECA a pu être caractérisée chez de nombreuses espèces qu'il s'agisse d'Insectes, d'Acariens, de Mollusques ou encore d'Annélides.

Chez *Drosophila melanogaster* (Insecte, Diptère), deux formes co-existent : Acer et Ance (Cornell et coll., 1995 ; Taylor et coll., 1996). Le séquençage du génome de la drosophile a permis d'identifier 6 gènes à même de coder potentiellement une ECA ; cependant, seuls deux d'entre eux semblent produire une métallopeptidase active. Les protéines sont exprimées simultanément lors de l'embryogenèse, pendant le développement du cœur et alternativement lors du développement de la pupa. A la différence de l'Ance, l'Acer ne clive pas l'angiotensine I en angiotensine II et ne peut donc satisfaire que partiellement à la définition d'une ECA (Houard et coll., 1998). La présence de molécules apparentées à l'ECA a été démontrée chez *Haematobia irritans* (Insecte, Diptère) aussi bien chez la larve que chez l'adulte ; cependant, leurs distributions au sein des tissus diffèrent au cours du temps, ce qui suggère que l'ECA jouerait un rôle différent en fonction du stade (Wijffels et coll., 1997). Chez l'insecte

adulte, ainsi que chez *Musca domestica* (Insecte, Diptère), l'enzyme présente des caractéristiques enzymatiques très proches de celle des Vertébrés (Wijffels et coll., 1996 ; Lamango et coll., 1996). Chez *Anopheles stephensis* (Insecte, Diptère), insecte hématophage, l'enzyme est induite par le repas de sang et est accumulée au niveau des ovaires puis dans les œufs afin de servir aux embryons (Ekbote et coll., 1999) alors que chez *Bombyx mori* (Insecte, Lépidoptère), la 20-hydroxyecdysone induit la transcription du gène au niveau des disques alaires (Quang et coll., 2001). Dans tous les cas, ces enzymes sont sécrétées dans l'hémolymphe et ne comportent qu'un seul domaine correspondant au domaine C des Mammifères.

Les données concernant l'ECA d'autres Invertébrés sont plus parcellaires. Chez *Mytilus edulis* (Mollusque, Bivalve) et chez *Theromyzon tessulatum*, les activités catalytiques corroborent celles identifiées chez les Insectes (Laurent et coll., 1997 ; Laurent et Salzet, 1996). Selon les résultats biochimiques, ces enzymes ne présenteraient qu'un seul domaine. Par ailleurs, récemment, une dipeptidyl carboxypeptidase apparentée à l'ECA a été caractérisée chez *Neanthes virens* (Annélide, Polychète) (Kawamura et coll., 2000). Par contre, aucune activité ECA n'a été décelée chez les Nématodes, bien qu'un gène ECA-like soit présent dans le génome de *Caenorhabditis elegans*. Cependant, l'analyse de ce gène révèle la substitution d'acides aminés cruciaux pour l'activité enzymatique rendant non fonctionnelle la protéine (Isaac et coll., 2000).

### 3.4 Implication du SRA dans l'osmorégulation

Comme nous l'avons signalé précédemment, les différents partenaires du SRA sont impliqués dans un grand nombre de mécanismes. Seul l'aspect osmorégulation sera traité.

D'une façon générale, l'injection d'angiotensine II provoque, chez un Vertébré, une vasoconstriction et l'élévation de la pression artérielle. Néanmoins, en ce qui concerne l'osmorégulation, l'effet majeur du peptide concerne la libération d'aldostérone au niveau du rein.

Chez les Mammifères, lors de son injection dans les ventricules cérébraux, l'angiotensine II induit rapidement la sensation de soif et un comportement irrésistible qui conduit à chercher de l'eau et à boire suite à une cascade complexe de réactions (Fitzsimons, 1972). Parallèlement, il y a libération de vasopressine (favorable à la conservation de l'eau) et diminution de l'excrétion sodique au niveau rénal.

Des effets similaires sont observés chez les non-mammaliens. Chez les Oiseaux, l'angiotensine II injectée par voie intraveineuse provoque une augmentation du taux d'aldostérone plasmatique (Gray et coll., 1989). Chez les oiseaux marins, l'injection intracérébro-ventriculaire inhibe l'excrétion de NaCl par les glandes à sel (Gertsberger et coll., 1984). Lors d'une déshydratation forcée, le taux d'angiotensine II augmente et cela dès le début du stress. L'action du peptide couplée à une diminution du volume sanguin et l'augmentation de l'osmolalité provoque chez l'animal le réflexe de boisson (Takei et coll., 1988). Chez des perroquets du genre *Barnadius* vivant dans des biotopes très variés, la résistance à la soif et à l'action de l'angiotensine II est plus grande chez les espèces adaptées à la sécheresse que chez les animaux des zones humides (Kobayashi, 1981). De même, l'administration d'angiotensine I au crocodile du Nil (*Crocodylus niloticus*) induit la soif et la concentration d'aldostérone plasmatique (Balment et Loveridge, 1989).

Chez les Amphibiens, qui sont réputés ne pas boire autrement que de façon marginale, en prenant leur nourriture, il n'y a pas induction du réflexe de boisson en tant que tel (Hirano, 1978). Chez *Bufo arenarum*, l'administration d'angiotensine II stimule l'absorption d'eau et du Na<sup>+</sup> au niveau de la peau et de la vessie urinaire (Coviello et coll., 1976). Chez *Bufo punctatus*, elle provoque un comportement particulier : de par la position des membres postérieurs, une portion spécialisée de la peau abdominale est amenée au contact d'une surface humide (Hoff et Hillyard, 1991 ; Hillyard et coll., 1998). De plus, comme chez les Mammifères, la libération d'aldostérone ainsi que celle de corticostérone est observée.

Les poissons migrateurs euryhalins boivent en réponse à une injection d'angiotensine II. Par contre, l'hormone est inefficace chez les espèces sténohalines confinées soit en eau de mer soit en eau douce (Takei, 2000). Chez *Anguilla japonica*, après passage en milieu marin, la concentration d'angiotensine II augmente ; ce taux décroît ensuite graduellement après l'adaptation au nouveau milieu de telle sorte que les concentrations plasmatiques de rénine et d'angiotensine II ne soient guère différentes de celles des anguilles adaptées à l'eau douce (Okawara et coll., 1988 ; Sokade et coll., 1973). Le SRA induit le réflexe de boisson, favorisant ainsi l'équilibre hydrique lors de l'adaptation à l'eau de mer (Takei et Tsuchida, 2000). Comme chez les autres Vertébrés, une sécrétion de corticostéroïdes est induite par l'octapeptide (cortisol chez les Téléostéens, aldostérone chez les Dipneustes et  $\alpha$ -hydroxycorticostérone chez les Elasmobranches).

Parmi les Invertébrés, chez les seules Hirudinées, l'angiotensine II semble exercer une activité osmoréglatrice. L'injection de l'octapeptide  $\alpha$ -amidé à des *Theromyzon tessulatum* provoque une diurèse, effet inverse de celui observé chez les Vertébrés. Par contre, chez les Insectes, aucun fait n'étaye un rôle potentiel du SRA dans l'osmorégulation ; ne serait-ce que parce que le génome de la drosophile ne renferme pas de gènes codant pour les angiotensines (Isaac et coll., 2000). L'existence de l'ECA pourrait s'expliquer par le fait qu'elle exerce d'autres fonctions notamment dans la fertilité et le développement embryonnaire, jouant vraisemblablement un rôle dans la maturation de différentes prohormones (Isaac et coll., 1998).

### ***III. Pourquoi utiliser la sangsue *Theromyzon tessulatum* ?***

#### ***1. DONNEES BIOLOGIQUES***

*Theromyzon tessulatum* est une Annélide Hirudinée vivant en eau douce. Ectoparasite, elle se nourrit de sang qu'elle prélève dans les fosses nasales d'oiseaux aquatiques.

Cette sangsue rhynchobdelle est semelpare, mourant à la suite de son unique cycle de reproduction (Wilkialis, 1970 ; Wilkialis et Davies, 1980). En prenant comme repère les repas de sang (lesquels sont généralement au nombre de trois), quatre étapes peuvent être définies :

- Stade 0 : de l'éclosion au premier repas
- Stade 1 : après le premier repas
- Stade 2 : après le deuxième repas
- Stade 3 : après le troisième repas (Malecha, 1983).

A l'issue du troisième repas réalisé à l'âge d'un an, la sangsue devient sexuellement mature (Hotz, 1938 ; Malecha, 1979). Cependant, si la quantité de sang ingérée n'est pas suffisante, un stade supplémentaire est observé (stade 2 surnuméraire) et le cycle de vie s'étend sur 2 ans (Wilkialis et Davies, 1980).

*Theromyzon* est une espèce hermaphrodite protandre pratiquant la fécondation croisée. Au cours du dernier stade, de profondes modifications anatomiques et physiologiques, telles que la dégénérescence des glandes salivaires et le développement des organes génitaux, se produisent.

Repas

Naissance      1<sup>er</sup>      2<sup>nd</sup>      3<sup>ème</sup>      Ponte      Ecllosion      Mort

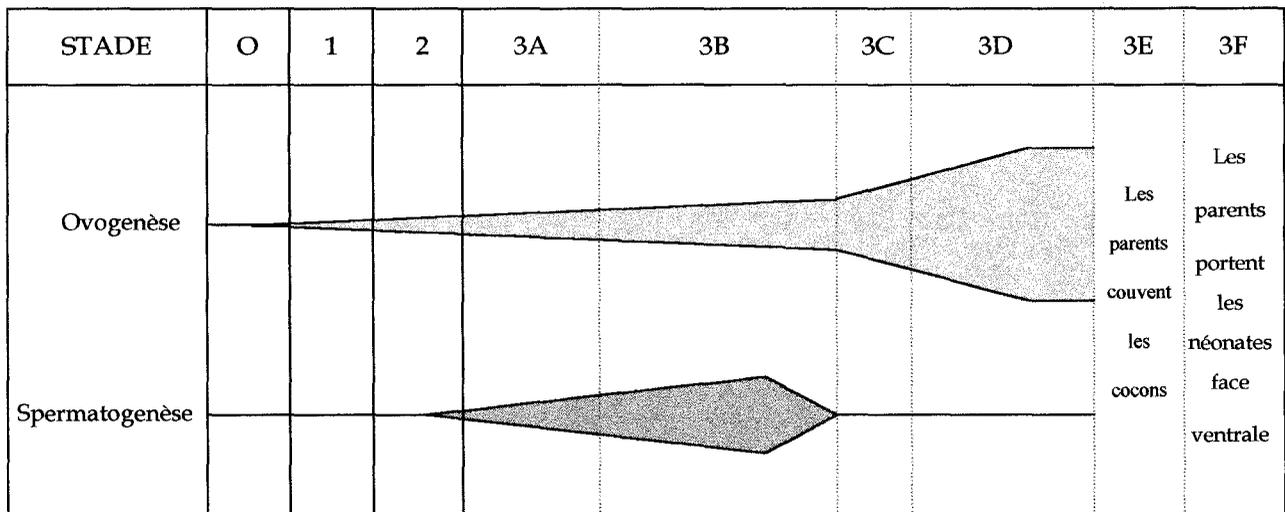


Figure 11 : Représentation schématique du cycle biologique de *Theromyzon tessulatum*. Il n'est pas tenu compte de la durée des différents stades (d'après Malecha et coll, 1989)

Le stade 3 peut être subdivisé en fonction des différentes étapes de la reproduction (fig. 11). L'évolution de la spermatogenèse permet de définir les étapes 3A et 3B, celle de l'ovogenèse, les étapes 3C et 3D. L'étape 3E correspond à la ponte et à la « couvaison » des cocons. Après l'éclosion, les sangsues néonatales sont transportées par leur mère et ce jusqu'à leur premier repas. Cette période définit l'étape 3F et peut durer plus de 5 mois, jusqu'à ce que le parent trouve un hôte favorable pour les juvéniles. L'adulte meurt, pour une raison indéterminée, quelques jours après leur départ.

## 2. *Theromyzon*, UN MODELE POUR L'OSMOREGULATION

Le choix de *Theromyzon tessulatum* comme modèle d'étude se justifie essentiellement pour deux raisons :

- Il s'agit d'une Hirudinée d'eau douce dont le milieu intérieur est hyper-osmotique au milieu environnant ce qui entraîne une constante entrée d'eau à travers le tégument. Cette entrée passive d'eau devra être compensée par une importante activité excrétrice.

- Il s'agit d'une sangsue hématophage qui subit une profonde diurèse durant les quelques heures suivant les deux premiers repas de sang (Van der Lande, 1983). Ce mécanisme permet une concentration des cellules sanguines dans la lumière du tube digestif (au cours des repas, *Theromyzon* absorbe en très peu de temps (20 à 30 min.) une quantité de sang égale à environ 10 fois sa masse initiale) et une perte de masse corporelle. Ainsi, bien que l'animal grandisse (augmentation de taille de l'ordre de 3 à 5 fois), son poids reste constant jusqu'au repas suivant.

Lors du dernier repas, la physiologie de l'animal est modifiée. La sangsue subit une augmentation de masse considérable (fig. 12), augmentation due à une importante rétention d'eau, laquelle est indispensable à l'acquisition de sa maturité sexuelle. L'animal continue à prendre du poids régulièrement jusqu'à la ponte des œufs et ce, grâce à l'activation de mécanismes antidiurétiques puissants.

Ainsi, *Theromyzon* subit des cycles diurétiques lors des deux premiers repas et une importante antidiurèse nécessaire à la reproduction, faisant suite au dernier repas.

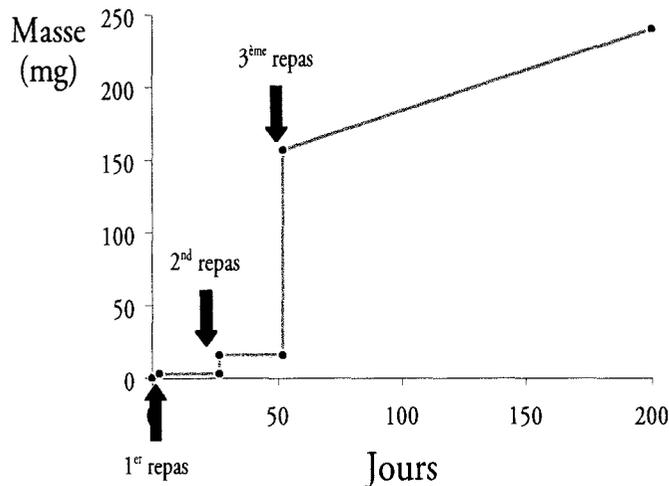


Figure 12 : Croissance pondérale de *Theromyzon tessulatum* maintenues à la température du laboratoire (d'après Malecha, 1979)

### 3. LES MECANISMES DE L'OSMOREGULATION CHEZ *Theromyzon*

Selon Rosca et coll. (1958), la suppression de la fonction nerveuse par anesthésie ou ablation de la chaîne ganglionnaire provoque un dérèglement profond des mécanismes osmorégulateurs d' *Hirudo medicinalis*. Des réponses similaires sont observées après décérébration de la sangsue *Poecibdella viridis* : l'injection d'homogénats de cerveaux pallie à ces effets (Kulkarni et Nagabhushanam, 1978). Chez des *Theromyzon tessulatum* de stade 3, la décérébration et plus spécialement l'ablation des ganglions supra-œsophagiens empêche la digestion du sang ingéré et entraîne une rétention d'eau (Malecha, 1979, 1983).

Afin de caractériser des molécules impliquées dans l'osmorégulation, un test biologique a été élaboré par Malecha et coll. (1989 ; fig. 13). Les molécules supposées actives sont injectées dans la cavité coelomique de sangsues de stade 3. Après séchage sur un papier absorbant, les animaux sont pesés à différents temps après l'injection. La variation de leur masse permet de déterminer la nature diurétique ou non de la molécule.

Une perte de poids de l'animal est signe d'une substance diurétique, un gain de poids, d'une molécule antidiurétique.

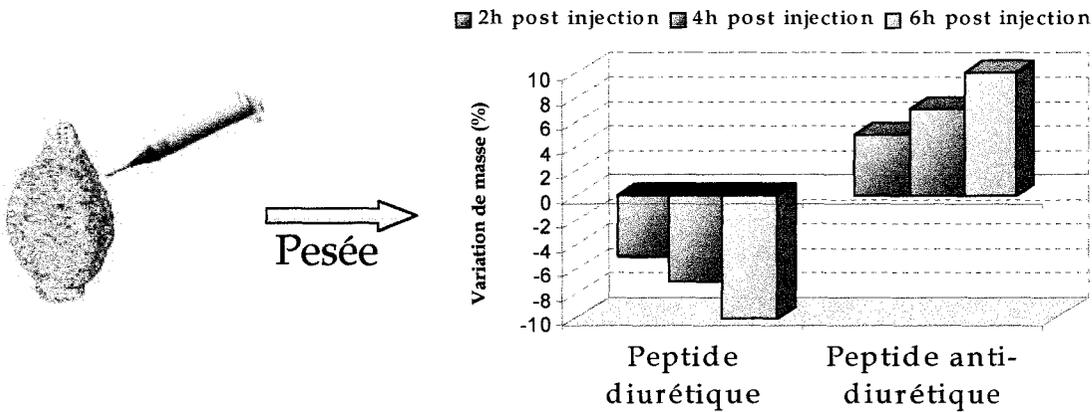


Figure 13 : Test biologique chez *Theromyzon tessulatum* d'après Malecha et coll. (1989). A différents temps après l'injection, l'animal est pesé afin de déterminer la nature du peptide

## La diurèse

Grâce à ce test, différentes molécules impliquées dans le contrôle de la balance hydrique d'*Erpobdella octoculata* ont été caractérisées. Comme nous l'avons précisé précédemment, il s'agit de peptides apparentés à des molécules de Vertébrés : la Lysine-conopressine (Salzet et coll., 1993) et l'angiotensine II  $\alpha$ -amidée (Salzet et coll., 1993b, 1995).

4 molécules appartenant à la famille des RF-amide ont été caractérisées chez la sangsue et 2 d'entre elles possèdent un rôle osmorégulateur : le GDPFLRF  $\alpha$ -amidé à rôle diurétique et le FMRF  $\alpha$ -amidé à rôle antidiurétique (Salzet et coll., 1994).

En plus de l'angiotensine II  $\alpha$ -amidée et d'une possible angiotensine IV, les deux enzymes clé du SRA ont été caractérisées biochimiquement chez *Theromyzon tessulatum*.

Une enzyme rénine-like, protéase à aspartyl de 32 kDa, a été isolée à partir de parties antérieures de sangsues (Laurent et Salzet, 1995a). Les 124 a. a. N-ter de cette enzyme présentent une identité de séquence de 35,5% avec celle de *Mus musculus*. Les

séquences consensus DTGSS des aspartyl protéases entourant le site actif sont conservées confirmant l'appartenance à cette famille (Salzet et Stefano, 1997).

La seconde enzyme clé du SRA, l'ECA, a été caractérisée à partir de parties antérieures de *Theromyzon tessulatum* (Laurent et Salzet, 1995b). L'enzyme identifiée est sous une forme transmembranaire glycosylée, présentant une masse moléculaire de 120 kDa, qui peut être libérée sous une forme soluble de 100 kDa. Les 27 a. a. N-terminaux déterminés par dégradation d'Edman présentent une homologie de 87 % avec celle de *Cavia porcellus*. Elle présente des constantes cinétiques très proches de celles des Mammifères (Laurent et Salzet, 1996) et est exprimée dans les cellules gliales du système nerveux, dans les coelomocytes et les néphridies (Vandenbulcke et coll., 1997).

Ces différentes molécules semblent exercer leur action lors de la diurèse faisant suite aux deux premiers repas de sang.

## L'antidiurèse

Chez *Theromyzon tessulatum*, la période entre le dernier repas et la ponte des œufs est caractérisée par une augmentation considérable de la masse corporelle due à une importante rétention d'eau. Ainsi se met en place une antidiurèse, réclamant l'intervention de molécules spécifiques et antidiurétiques.

Le FMRF  $\alpha$ -amidé purifié chez *Erpobdella octoculata* possède lors de son injection chez *Theromyzon tessulatum* une activité antidiurétique et pourrait, de ce fait, être l'un des responsables de cette réponse.

Grâce à des antiséras dirigés contre des peptides de Vertébrés, une cartographie du ganglion supra-œsophagien de *Theromyzon tessulatum* a été établie (Verger-Bocquet et coll., 1988). Un immunomarquage a été observé après utilisation d'anti-angiotensine II et d'anti-vasopressine mais aussi d'anti-ocytocine. L'injection de l'antisérum dirigé contre l'ocytocine  $\alpha$ -amidé provoque, chez la sangsue, une perte de masse. Par contre, l'injection de l'ocytocine même ne produit aucun effet suggérant

qu'une ou plusieurs molécules reconnues par l'antisérum anti-ocytocine mais distinctes du peptide mammalien présentent une activité antidiurétique (Malecha et coll., 1989).

En utilisant l'antisérum comme moyen de détection, un peptide, le Leech OsmoRegulator Factor ou LORF fut caractérisé à partir de système nerveux d'*Eryobdella octoculata* puis de *Theromyzon tessulatum* (Salzet et coll., 1996a et 1996b). Cet octapeptide possède une structure primaire, IPEPYVWD, unique dans le règne animal. Il peut également exister sous une forme amidée. Injecté à des sangsues, le LORF induit un gain de masse significatif reflétant une activité antidiurétique. Le dosage du peptide montre que la concentration est maximale lors du stade 3B, au moment de la rétention d'eau. Par ailleurs, plusieurs neurones des ganglions nerveux sont immunoréactifs à un antisérum anti-LORF. Certains d'entre eux présentent également une immunoréactivité anti-ocytocine (Salzet et coll., 1996b).

MATERIEL ET

METHODES

## ANIMAUX ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

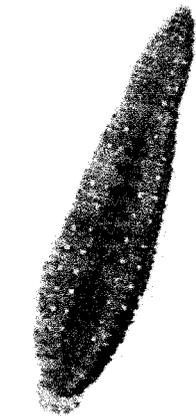
## ANIMAUX

L'ensemble des expériences a été réalisé sur l'annélide *Theromyzon tessulatum*

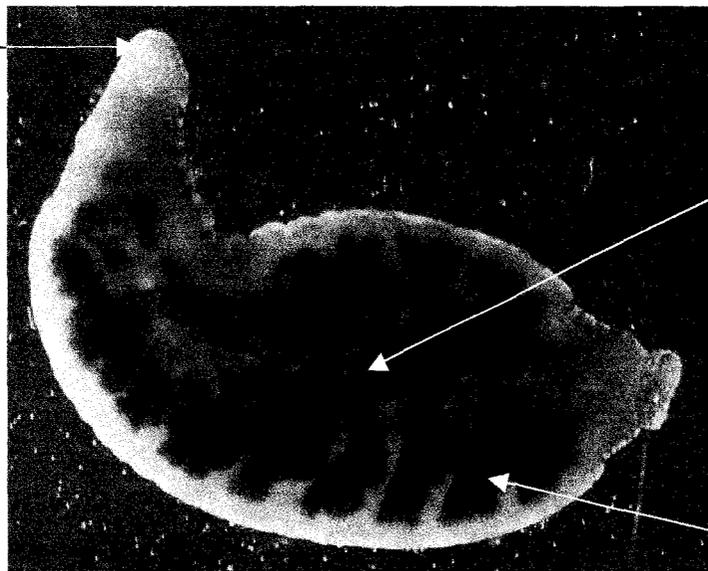
*Theromyzon tessulatum* appartient à la super-classe des Clitellates (au même titre que les Oligochètes) et à la classe des Hirudinées.

Il s'agit d'une sangsue Rhynchobdelle, c'est à dire munie d'une trompe. Parasite des oiseaux aquatiques, elle prélève du sang en s'introduisant dans leurs fosses nasales.

Les animaux sont récoltés à Harchies en Belgique. Ils sont ensuite maintenus et se reproduisent au laboratoire (eau douce, 15-20°C), prélevant leur repas à des canards de Barbarie (*Cairina moschata* L.).



Ventouse  
péribuccale



Chaîne  
nerveuse  
ventrale

Caeca  
digestifs  
contenant  
du sang de  
canard

*Theromyzon tessulatum* en vue ventrale.  
(Photo prêtée par J. Malecha)

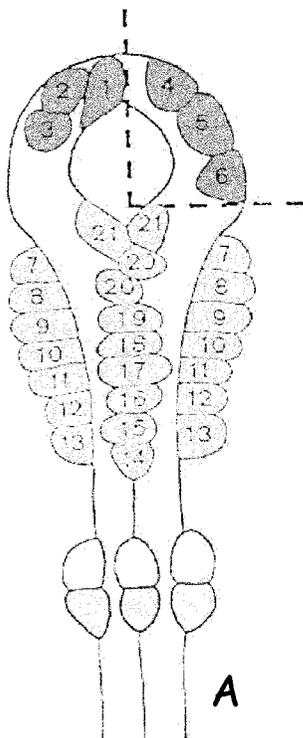
## DISSECTION

Après anesthésie au clorétone, les sangsues sont épinglées sur leur face ventrale dans du Ringer. Les cerveaux sont excisés et congelés dans de l'azote liquide puis stockés à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

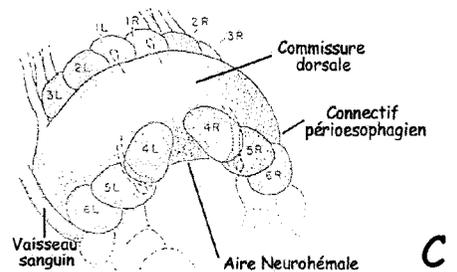
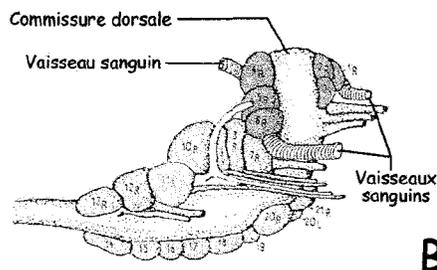
Le système nerveux des Hirudinées se subdivise en trois grandes parties : une partie antérieure contenant le cerveau, une partie moyenne où les ganglions se repartissent à raison d'un par métamère, une partie postérieure ou ganglion caudal.

Le cerveau est formé d'une partie dorsale supra-œsophagienne (ganglion supra-œsophagien) et d'une partie ventrale sous-œsophagienne (ganglion sous-œsophagien). Deux commissures péri-œsophagiennes relient les deux ganglions. Le cerveau comprend des groupes de neurones ou follicules séparés les uns des autres par des cloisons conjonctives.

Chez *Theromyzon tessulatum*, comme chez *T. rude* (Hagadorn 1958, 1962), les neurones du cerveau sont regroupés en 36 follicules.



Chaque ganglion supra-œsophagien comprend 6 paires de follicules : 3 en avant de la commissure dorsale, 3 autres en arrière. Sous la commissure se situe l'aire neurohémale en position postéro-médiane (Hagadorn, 1962).



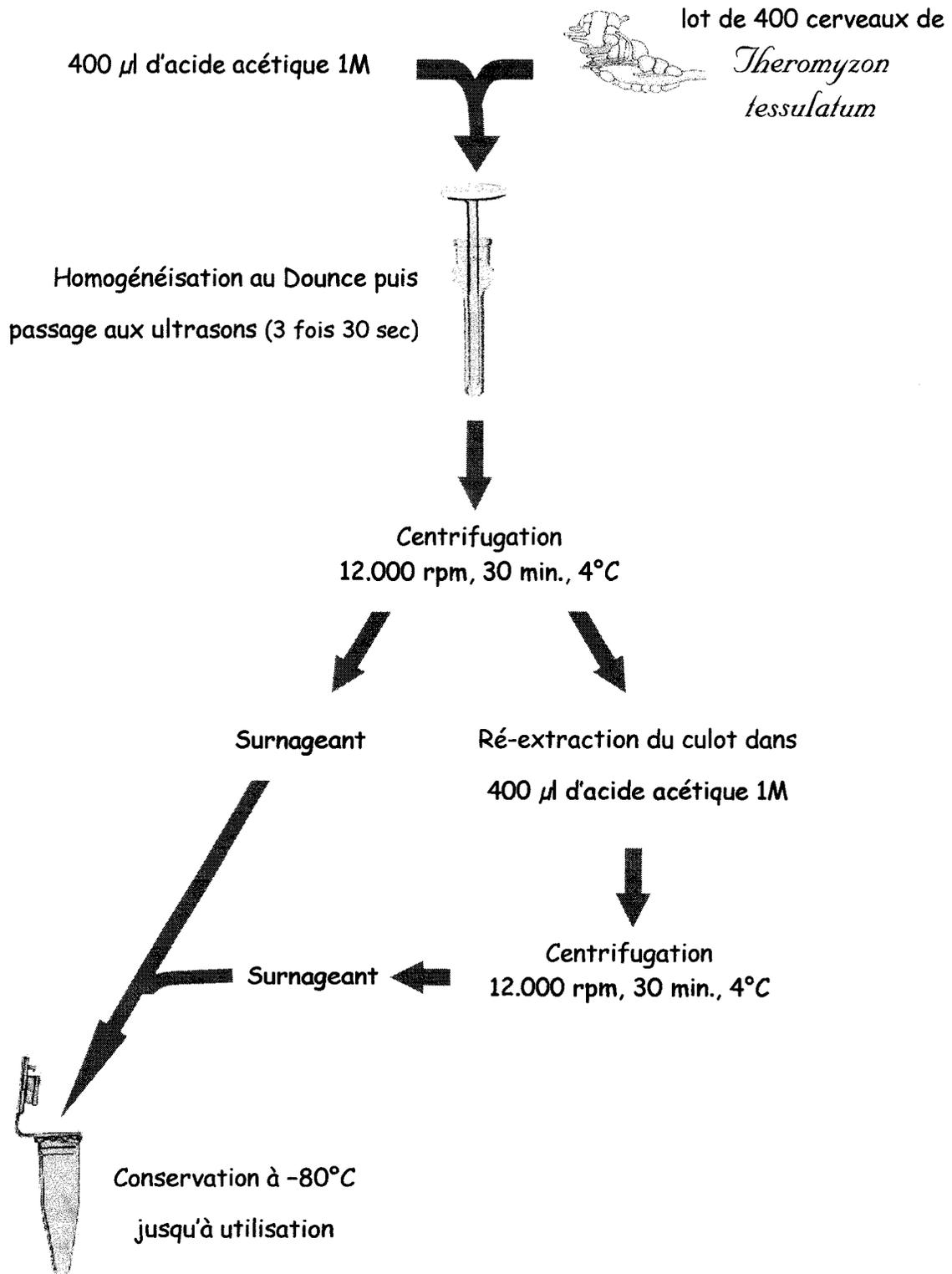
La partie sous-œsophagienne du cerveau comprend 24 follicules disposés en 3 groupes : 2 dorso-latéraux composés chacun de 7 follicules (N° 7 à 13 droit et gauche) et un groupe médio-ventral de 10 follicules (6 impairs (N° 14 à 19) et 2 pairs (N° 20 et 21)).

Schéma du système nerveux central de *Theromyzon*

A : Représentation schématique du cerveau de *T. tessulatum* ; vue ventrale. Seule la partie antérieure droite est représentée dorsalement (Follicules 4,5 et 6) (Malecha et al, 1989) ; B : schéma des ganglions cérébroïdes et de la masse sous-œsophagienne de *T. rude*, vue latérale droite (d'après Hagadorn, 1958) ; C : schéma de la commissure dorsale, vue postéro-dorsale des ganglions cérébroïdes de *T. rude*

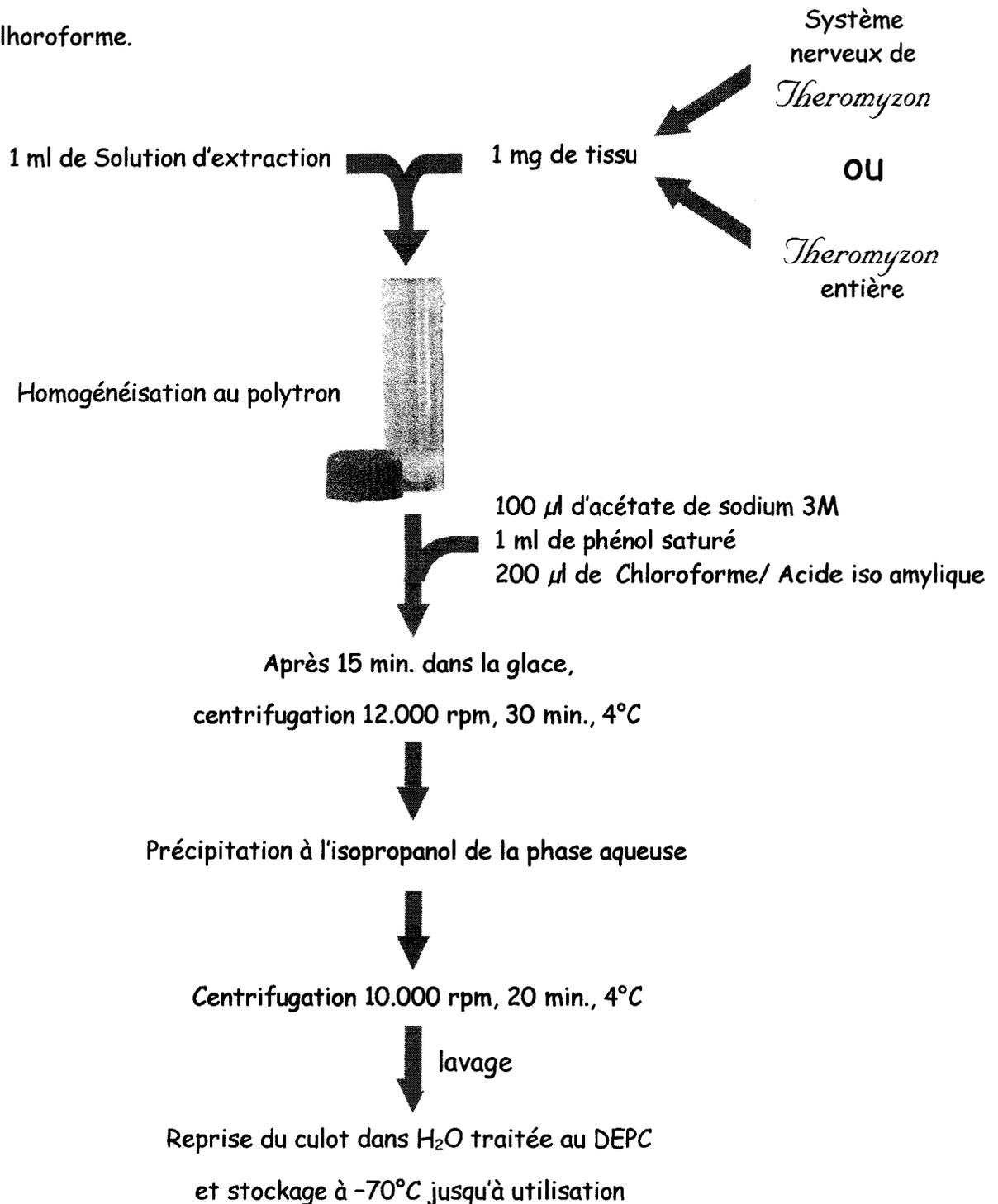
## EXTRACTION PEPTIDIQUE

1200 cerveaux ont été prélevés et répartis en trois lots en vue de l'extraction.



## EXTRACTION DES ARNs

Des ARNs totaux de *T. tessulatum* ont été extraits par une technique au Guanidium-Phénol-Chloroforme.



Un dosage des ARNs est réalisé par spectrométrie à 260 nm et la qualité visualisée sur gel d'agarose.

---

## **ANTISERA ET TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES**

### **ANTISERA UTILISES**

#### **Antisérum anti-ocytocine**

L'antisérum polyclonal anti-ocytocine a été caractérisé par Salzet et coll. (1993). Il est dirigé contre la partie C-terminale (C-ter) de la molécule d'ocytocine (Pro-Leu-Gly-amide, PLG-amide). Il ne croise ni avec l'arginine-vasopressine ni avec la lysine-vasopressine. Par contre, il présente une réaction croisée de 80% avec le tri-peptide PLG-amide, 30% avec le di-peptide PL et 20% avec le di-peptide PI en ELISA compétitif. Il ne reconnaît pas le fragment N-terminal (N-ter) de l'ocytocine (acide tocinoïque), la réaction croisée n'étant que de 0,06%.

#### **Antisérum anti-ECA**

L'antisérum polyclonal anti-ECA est dirigé contre la partie N-ter de l'ECA de sangsue (GLPELSPGF). Il présente une réaction croisée avec l'ECA de lapin (Sigma) de 20% (Vandenbulcke et coll., 1997).

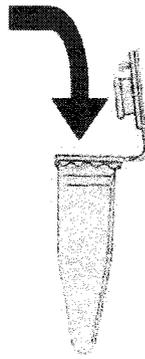
#### **Antisérum anti-LORF**

L'antisérum dirigé contre le LORF ne présente pas de réaction croisée avec l'ocytocine et est spécifique de la partie C-ter du peptide (Salzet et coll., 1996b).

**PRODUCTION D'UN ANTISÉRUM ANTI-LORF<sub>AMIDE</sub>****Préparation de l'immunogène**

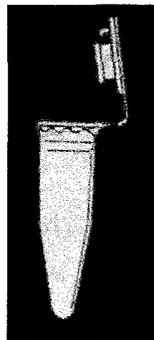
Le peptide correspondant aux 8 acides aminés du LORF-amide a été synthétisé et purifié par la société Neosystem (Strasbourg). Il a été couplé à la thyroglobuline par l'intermédiaire de la glutaraldéhyde.

5 mg de peptide +  
10 mg de thyroglobuline  
dissous dans 2 ml de tampon  
phosphate 0,1M pH 7,4



*3 heures  
sous agitation  
à l'obscurité*

Ajout progressif de  
glutaraldéhyde (0,5%)



Arrêt de la réaction de couplage par ajout de métabisulfure  
de sodium (1 ml ; 7,5 mg dans 100 ml H<sub>2</sub>O)

Ajustement du volume à 5 ml et répartition en 10 aliquotes de  
500  $\mu$ l (conservation à -20°C)

## Protocole d'immunisation

Le protocole d'immunisation employé est celui de Vaitukaitis et coll. (1971).

Avant toute immunisation, 20 ml de sérum pré-immun sont prélevés au lapin pour des contrôles ultérieurs.

Injections intradermiques d'une dose d'antigène émulsionné dans de l'adjuvant complet de Freund



Potentialisation de la réponse immunitaire par injection d'un vaccin anti-coquelucheux (Tetracoq, Merieux MSD) et d'un vaccin BCG (Monovax, Pasteur vaccins)

15 jours



15 jours

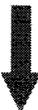


15 jours



\* Rappels avec une dose d'antigène émulsionné dans de l'adjuvant incomplet de Freund, en injections intradermiques

3 semaines



Injection, dans la veine marginale de l'oreille du lapin, d'une dose d'antigène dilué dans du liquide physiologique

Saignée au niveau de l'oreille. Prélèvement d'environ 20 ml de sang

1 semaine



Saignée au niveau de l'oreille.

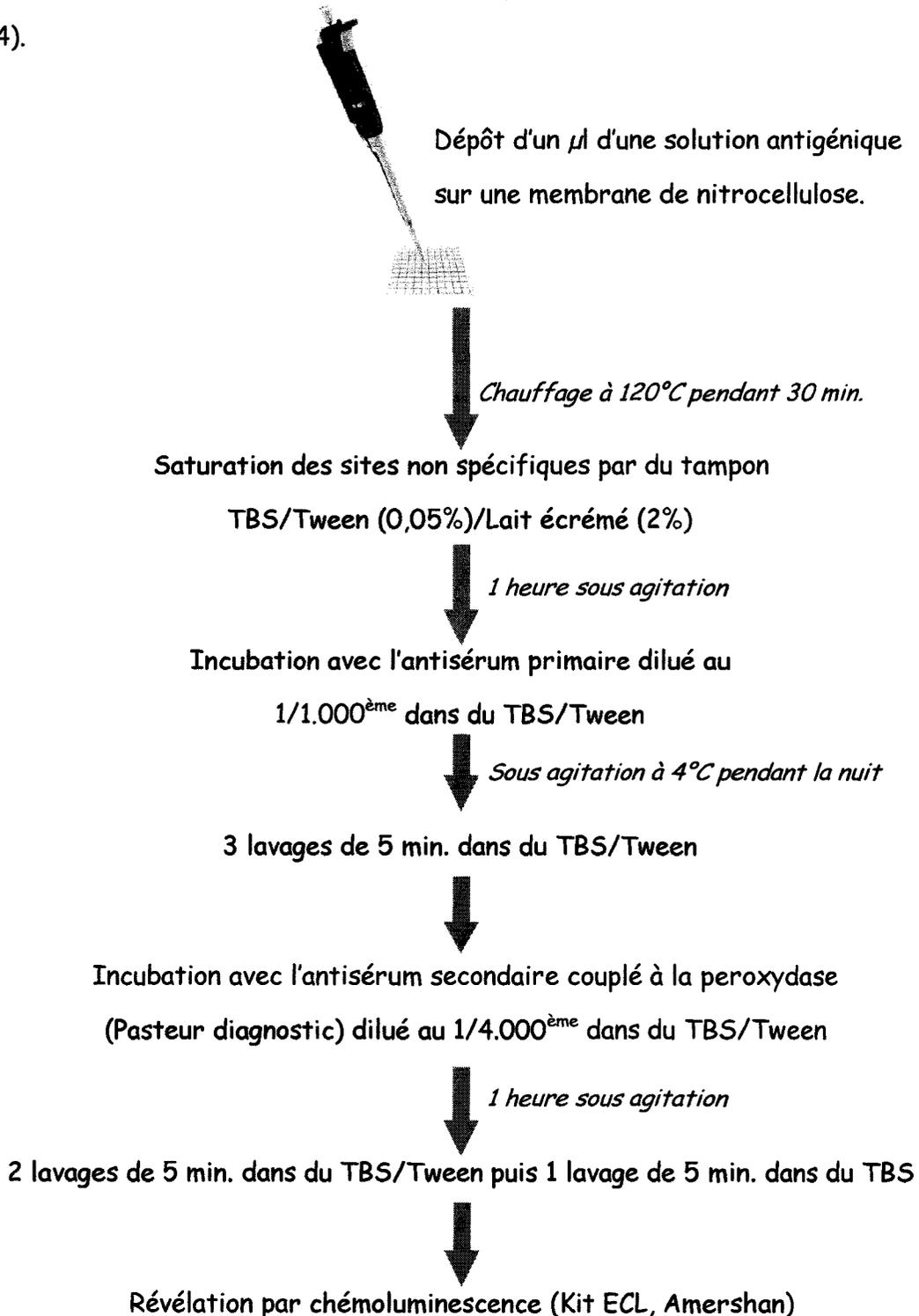
Prélèvement d'environ 20 ml de sang

Les immunoséras obtenus sont glycérolés (Volume/Volume) et conservés à -20°C. Lors de l'utilisation, ils sont saturés à la thyroglobuline (10 mg/ml).

## TESTS IMMUNOLOGIQUES

### Dot Immunobinding Assay

Ce test immunologique repose sur un protocole développé par Salzet et coll. (1993, 1994).



La peroxydase couplée à l'antisérum secondaire va, en présence de réactif, libérer un composé luminescent qui viendra impressionner un film photographique (Amersham).

## Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

Dépôt d'une solution antigénique par puit  
(Plaque 96 puits Maxisorp, Nunc)



*Sous agitation à 4°C sur la nuit*

Elimination de l'antigène et saturation des sites non spécifiques par du tampon  
TBS/Tween (0,05%)/Lait écrémé (4%)

*1 heure sous agitation*

Incubation avec l'antisérum primaire dilué au  
1/1.000<sup>ème</sup> dans du TBS/Tween

*2 heures sous agitation*

3 lavages de 5 min. dans du TBS/Tween

Incubation avec l'antisérum secondaire couplé à la biotine (Pasteur diagnostic)  
dilué au 1/10.000<sup>ème</sup> dans du TBS/Tween

*30 min. sous agitation*

3 lavages de 5 min. dans du TBS/Tween

Incubation avec le complexe d'amplification Streptavidine/Biotine dilué  
au 1/50<sup>ème</sup> dans du TBS (Kit StreptAB complex/HRP, Dako)

*30 min. sous agitation*

3 lavages de 5 min. dans du TBS/Tween

Révélation avec un substrat coloré (Peroxydase substrate,  
TMB microwell, KPL)

*5 min.*

Arrêt de la réaction avec de l' $H_3PO_4$  1N  
et lecture de la plaque à 450 nm

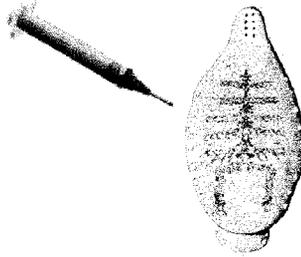
## TEST BIOLOGIQUE

Les sangsues sont réparties, avant l'injection, en différents lots en fonction de leur masse corporelle.

Injection de 10  $\mu$ l d'une solution de

Ringer contenant :

- Soit du PBS (contrôle)
- Soit du PLG-amide



à des *Theromyzon tessulatum* de  
stade 3B.



Temps variable à température ambiante

« Séchage » des animaux sur

papier absorbant



Pesée (+/- 0,1mg) et comparaison des  
variations de masse par rapport au lot témoin  
(injecté au PBS)

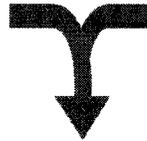
NB : - Pour les sangsues ayant subi l'ablation du ganglion sous oesophagien, l'injection se fait 6 jours après l'opération.

- La perte de masse observée dans le groupe témoin est due aux séchages des animaux réalisés avant leur pesée.

## IMMUNOHISTOCHEMIE

### PREPARATION DES COUPES

*Theromyzon tessulatum*  
entière



Ganglions cérébroïdes de  
*Theromyzon tessulatum*



Fixation dans du Bouin Hollande  
sublimé



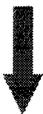
Déshydratation par des bains d'alcools croissants (96°  
puis 100° ; 3 bains de 2 heures pour chaque concentration)



Imprégnation par du toluène  
(3 bains de 45 min.)



Inclusion en paraplaste (Scherwood medical)

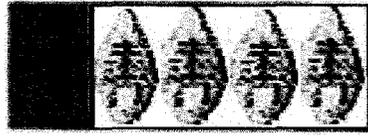


Réalisation des coupes (7µM d'épaisseur)



Les lames sont stockées à température ambiante jusqu'à utilisation.

## IMMUNOHISTOCHEMIE



↓  
 Elimination du paraplaste et réhydratation par des  
 bains d'alcools décroissants suivi d'un bain d'eau  
 courante

↓  
 Passage dans de l'alcool iodé pour éliminer les sels  
 mercuriques liés au Bouin Hollande sublimé

↓  
 Incubation avec l'antisérum primaire dilué au  
 1/800<sup>ème</sup> dans du tampon Coons (500 µl/lame)

↓ *La nuit dans une chambre humide  
 à température ambiante*

2 lavages de 5 min. dans du tampon Coons

↓  
 Incubation avec l'antisérum secondaire couplé à la  
 peroxydase (Pasteur diagnostic) dilué au 1/50<sup>ème</sup>  
 dans du tampon Coons

↓ *1h30 dans une chambre humide à  
 température ambiante*

2 lavages de 5 min. dans du tampon Coons puis un  
 rinçage bref dans de l'eau distillée

↓  
 Révélation au D.A.B. et montage des lames dans un  
 tampon glyciné

*NB : Des témoins sont  
 réalisés en remplaçant  
 l'antisérum primaire  
 par le même antisérum  
 saturé par l'antigène*

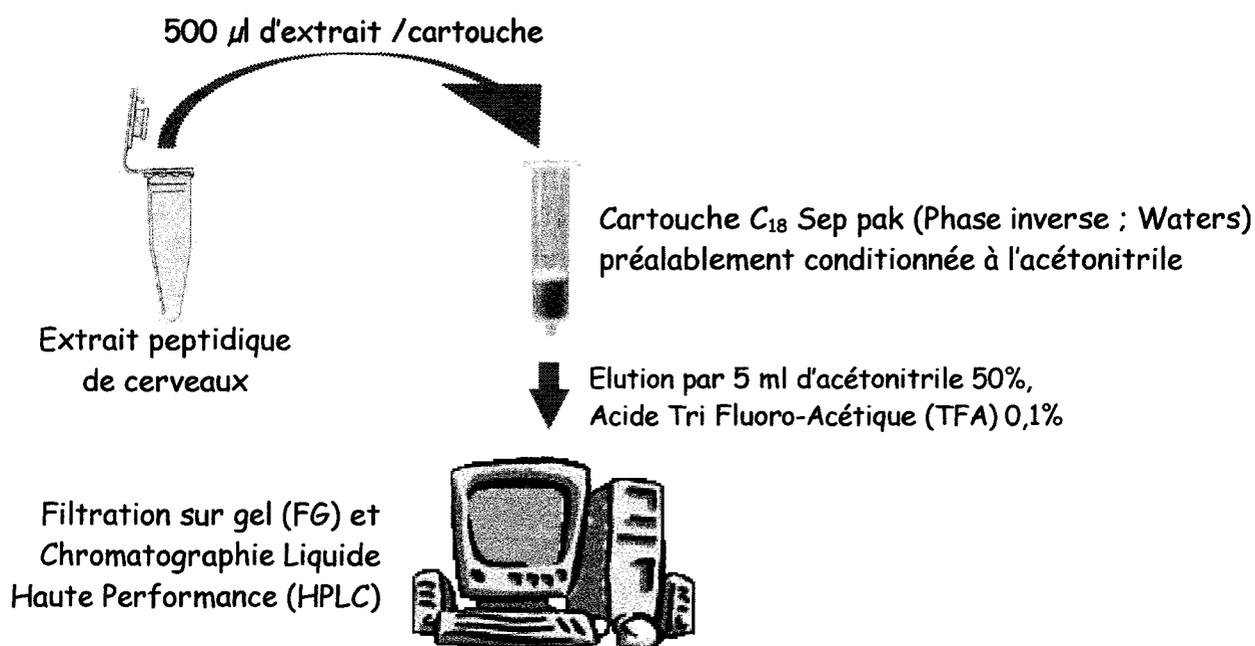
Observation avec un  
 microscope photonique  
 Axiophot Zeiss



## PURIFICATION LORS DE LA CARACTERISATION DU PLG-AMIDE

Entre chaque étape de purification, les produits sont séchés au speed vacuum. Les échantillons sont testés en DIA et en ELISA afin de détecter et quantifier le matériel immunoréactif à l'antisérum anti-ocytocine .

Toutes les purifications par HPLC ont été réalisées grâce à un système HPLC Gold Beckman équipé d'une barrette de diode (Photodiode array detector Beckman 168). L'effluent est contrôlé grâce à une lecture d'absorbance à 214 nm.

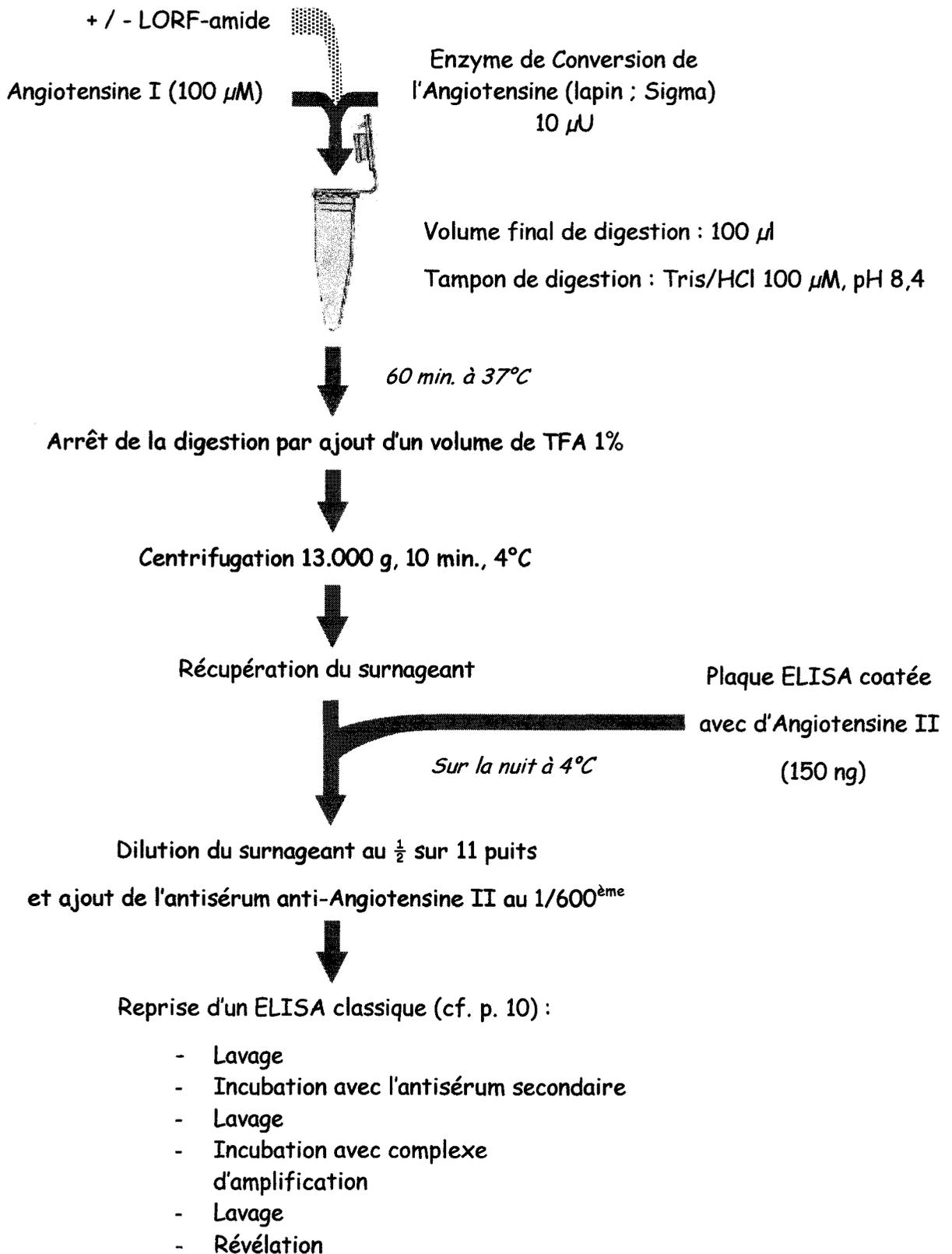


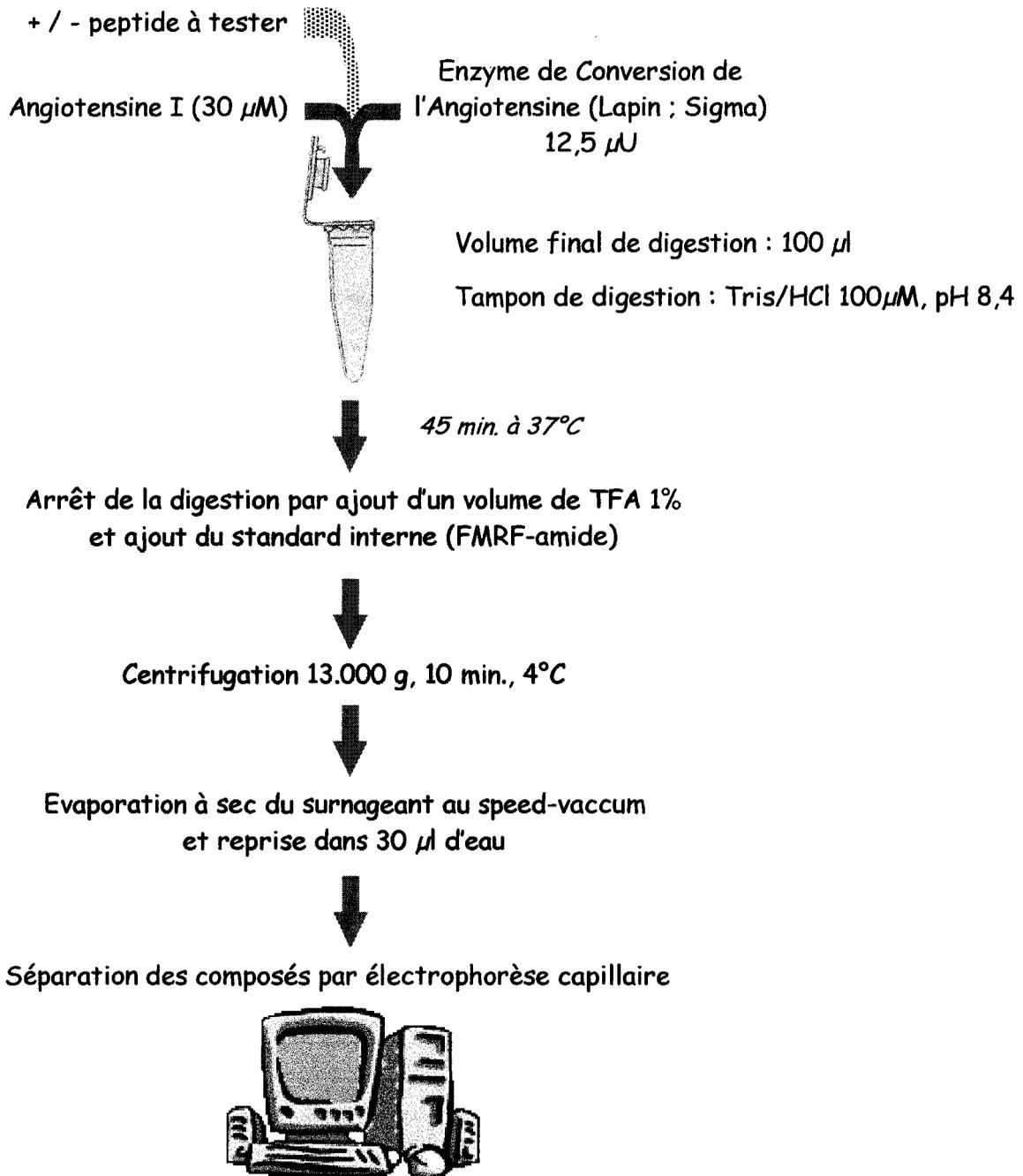
	<u>Pré-colonne</u>	<u>Colonne</u>	<u>Elution</u>
FG	Ultraspherogel 7,5 x 40 mm (Beckman)	Ultraspherogel 7,5 x 300 mm, Sec 2000 (Beckman)	30 % d'acétonitrile (ACN) à un débit de 1ml/min.
HPLC	RP18 (Merck)	Colonne C <sub>18</sub> en phase inverse 4,5 x 250 mm (Vydac)	0% à 45% en 30 min. 45% à 80% en 10 min. à un débit de 1ml/min.
	RP18 (Merck)	Colonne C <sub>18</sub> en phase inverse 4,5 x 250 mm (Vydac)	0% à 15% en 15 min. 15% à 45% en 40 min. à un débit de 1ml/min
		Colonne en phase inverse ODS C <sub>18</sub> Ultrasphère, 2 x 250 mm (Beckman)	0% à 60% en 60 min à un débit de 300µl/min.

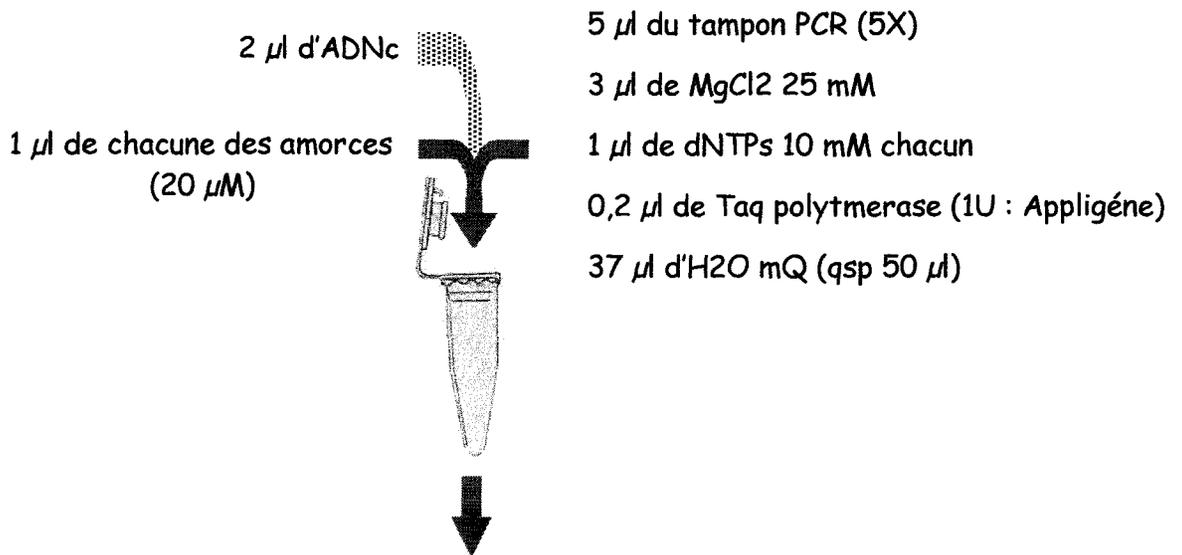
L'éluion des chromatographie en phase inverse se fait avec de l'ACN, 0,1% TFA.

## DETERMINATION DE L'IC 50 DU LORF-AMIDE

### Digestion et détection par ELISA



**Digestion et détection par électrophorèse capillaire****CONDITIONS DE MIGRATION****Tampon de migration : phosphate 25 mM pH 2,5****Température : 25°C****Voltage : 25 KV****Durée : 17 min.****Capillaire : silice, 57 cm de long, diamètre interne 75  $\mu$ m**

**Polymerase Chain Reaction****Programme PCR utilisé pour le clonage des différentes molécules**

Dénaturation initiale	94°C	3 min.	} Nombre de cycles : 25
Dénaturation	94°C	40 secondes	
Appariement	55°C	1 min.	
Elongation	72°C	1 min.	
Elongation totale	72°C	5 min.	

**Migration des produits de PCR en gel agarose 1 % TAE**

**Ligation, transformation, séquençage**

**Sélection des inserts par une PCR utilisant des amorces internes ('nest')**

- Les inserts d'intérêt sont ligués dans le plasmide pGEM T-easy (Promega). Les transformants sont sélectionnés par un test blanc-bleu et la présence de l'insert désiré est vérifiée par une PCR sur la culture bactérienne (à l'aide des amorces qui ont servi à la PCR initiale ; le sens d'insertion de l'amplifié peut être déterminé en utilisant une amorce basée sur la séquence plasmidique ( du côté T7 ou SP6) couplée à l'une des amorces de la PCR initiale) ;
- Le séquençage (par la méthode de Sanger) est réalisé à l'aide du kit Sequenase T7 ( version 2.0 ; USB).

**Sondes utilisées :****Amorces communes :**

Oligo dT-adapteur : 5' CGAGTCGACATCGATCGT(T) 16 3'

**Amorces déduites du plasmide :**

Forward : 5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAGG 3'

Reverse : 5' AGCGGATAACAATTTACACAG 3'

**Amorces dégénérées :**

LORF :

L25 : 5' AT(T/C/A)CCIGA(A/G)CCITA(T/C)GTITGGGA(T/C)G 3'

L26 : 5' AT(T/C/A)CCIGA(A/G)CCITA(T/C)GTITGGGA(T/C)GG 3'

ECA :

Dég. Sens 1 : 5' GTITG(T/C)CA(T/C)GCITCIGCITGGGA 3'

Dég. Antisens 1 : 5' TC(A/G)TG5A(G)AAICCI GG(A/G)TTIGCICC 3'

**Amorces homologues:**

ECA :

Hom<sub>sens1</sub>: 5' AAGATTT CAGAATCAAACAA 3'

Hom<sub>sens2</sub>: 5' CACCATGAGATGGGACACATC 3'

Hom<sub>sens3</sub>: 5' TACAAGGACCAACCCATCAGT 3'



# RESULTATS

# L'ANTIDIURESE

## LE LORF

A la suite de l'ablation des ganglions supra- et sous-œsophagiens, les sangsues ne sont plus soumises à la rétention d'eau classiquement observée lors du stade 3, ce qui suggère l'existence de facteurs antidiurétiques cérébraux (Malecha, 1983).

Par ailleurs, une ou plusieurs molécules immunoréactives à l'antisérum anti-ocytocine de Vertébrés (mais structurellement distinctes de l'ocytocine) sont impliquées dans le contrôle de la balance hydrique (Malecha et coll., 1989).

Par la suite, l'utilisation de ce même antisérum a permis l'identification d'un octapeptide impliqué dans l'osmorégulation : Le Leech OsmoRegulator Factor (Salzet et coll., 1996). Ce peptide présente une structure primaire unique (IPEPYVWD) et peut également exister sous forme amidée (IPEPYVWD-NH<sub>2</sub>). L'injection de LORF induit chez la sangsue une antidiurèse se traduisant par un gain de masse de l'animal.

Après avoir produit un antisérum dirigé contre le peptide non amidé, une distribution du LORF a été réalisée sur des parties antérieures de sangsue : une immunoréactivité a été décelée dans des neurones des ganglions supra-, sous-œsophagiens et segmentaires de la chaîne nerveuse (Salzet et coll., 1996).

L'interrogation d'une banque de données protéiques ne révèle l'existence d'aucun peptide apparenté au LORF. Néanmoins, la séquence de l'octapeptide est retrouvée partiellement ou en totalité dans la séquence N-ter d'une famille de protéines : les hémérythrines (fig. 14).

LORF	IPEPYVND
<i>Phascolopsis gouldii</i> (Sipunculien)	
Hémérythrine	MGFPIDPYVNDPSFRTFYSIIDDEHKTLF ...
Myohémérythrine	PFDIPEPYVNDSEFRVFYDNLDDDEHKGLF ...
<i>Themiste zostericola</i> (Sipunculien)	
Myohémérythrine	GWEIPEPYVWDESEFRVFYEQLDDEHKKIF ...
Hémérythrine	GFPIPDPYGWDPSFRTFYSIIDDEHKTLF ...
<i>Hediste diversicolor</i> (Annélide)	
Cd-Bd	GFEIPEPYKWNDESFQVFYEKLDEEHKQIF ...
Myohémérythrine	GFEVPEPFKWNDESFQVFYDKLDEEHKQIF ...
<i>Theromyzon tessulatum</i> (Annélide)	
Ovohémérythrine	VDIPEPFRWNDESFKVFYE ...
OvoH1	VFEIPEPYQWDETFEVFYEKLDEEHKGLF ...

Figure 14 : Alignement du LORF avec des hémérythrines connues

A ce jour, les hémérythrines ont été uniquement identifiées dans certains groupes d'Invertébrés : les Annélides, les Sipunculien et les Brachiopodes. Elles existent sous plusieurs isoformes et leurs fonctions biologiques exactes n'ont pas encore été élucidées. Structurellement, ce sont des protéines non hémiques qui fixent le fer et l'oxygène ; de ce fait elle sont considérées comme des pigments respiratoires spécifiques des Invertébrés (Klotz et coll., 1976 ; Alexander et coll., 1991). Chez

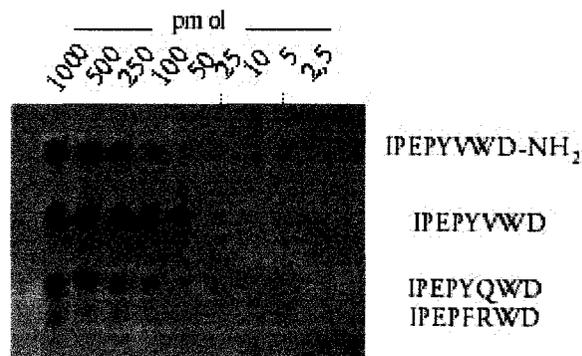
*Theromyzon tessulatum*, elles s'accumulent dans le coelome durant le stade 3 (Baert et coll., 1992).

L'antisérum étant dirigé contre les 8 a.a. du LORF, il se peut qu'il puisse reconnaître les hémérythrines ou des fragments de ces protéines.



## L'ANTISERUM ANTI-LORF

Par Dot Immunobinding Assay (DIA), l'antisérum a été testé sur des gammes de peptides: LORF, LORF  $\alpha$ -amidé et deux octapeptides déduits d'hémérythrines (IPEPYQWD et IPEPFRWD) (fig. 15).



Antisérum anti-LORF

Figure 15 : Test de reconnaissance par l'antisérum anti-LORF (dilution au 1/1000<sup>ème</sup>)

L'anti-LORF reconnaît le peptide non amidé contre lequel il est produit (50 pmoles) mais aussi le peptide  $\alpha$ -amidé et l'IPEPYQWD (100 pmoles). La reconnaissance est moindre pour la seconde forme (IPEPFRWD ; 250-500 pmoles). Une saturation de l'antisérum par du LORF entraîne l'extinction des différents signaux.

L'antisérum anti-LORF reconnaissant les fragments d'hémérythrines, il n'est pas spécifique du LORF. Nous avons donc décidé de produire un nouvel antisérum dirigé contre la molécule  $\alpha$ -amidée afin de limiter cette réaction croisée.



## L'ANTISERUM ANTI-LORF $\alpha$ -AMIDE

### 2.1 Comparaison de l'antisérum anti-LORF et anti-LORF $\alpha$ -amidé par DIA

Comme l'antisérum anti-LORF, le nouvel antisérum a été expérimenté sur des gammes de LORF, de LORF  $\alpha$ -amidé et des deux variants déduits d'hémérythrines ainsi que sur les parties N-ter et C-ter du LORF  $\alpha$ -amidé et enfin sur ce même peptide tronqué des deux a. a. N-ter (fig. 16).

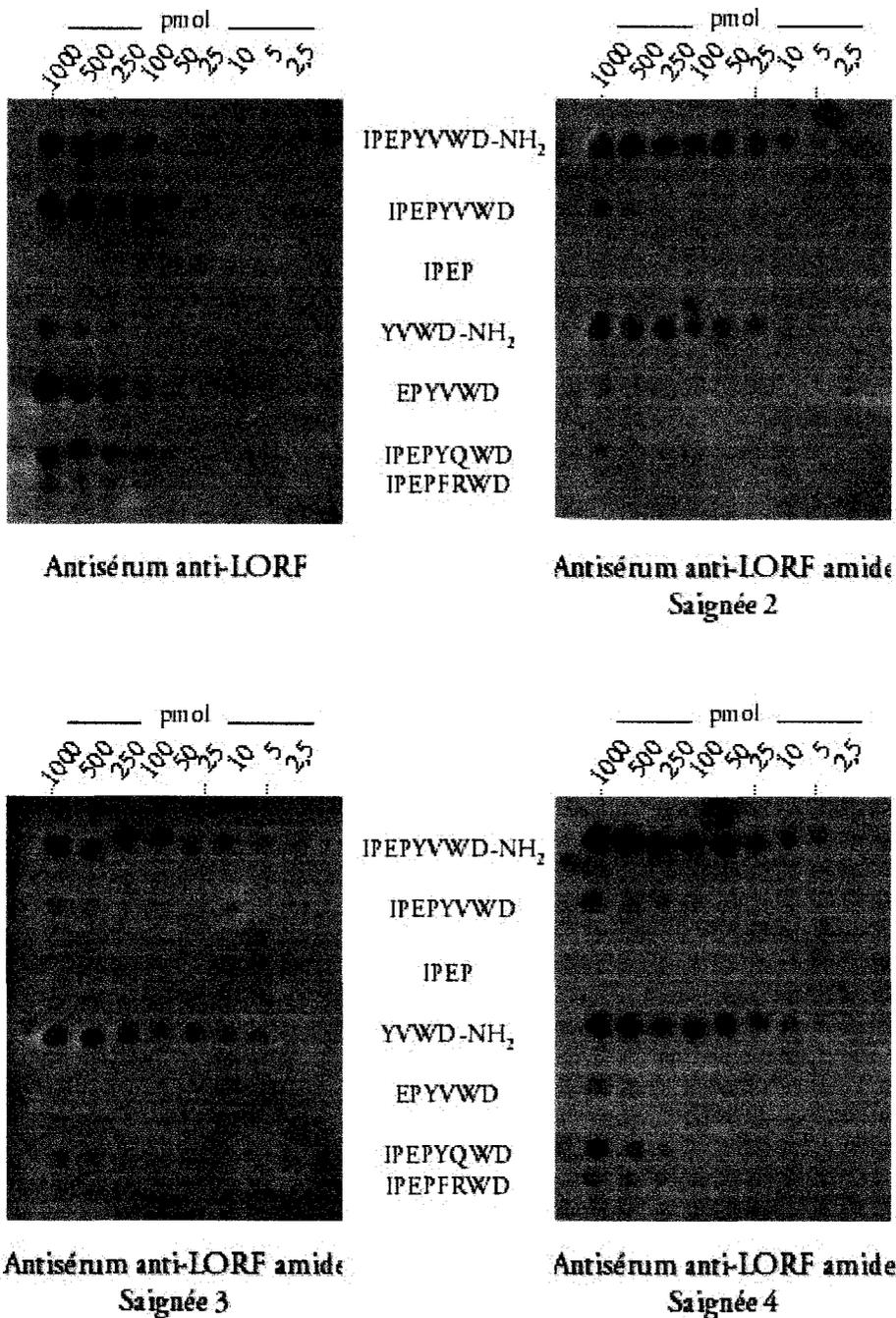


Figure 16 : caractérisation par DIA des antisérums anti-LORF et anti-LORF  $\alpha$ -amidé (Saignées II, III et IV) (dilution au 1/1000<sup>ème</sup>)

L'antisérum anti-LORF ne reconnaît pas le tétrapeptide N-ter et très faiblement le C-ter. Le peptide tronqué est détecté jusqu'à une concentration de 250 pmol.

L'antisérum anti-LORF  $\alpha$ -amidé ne se fixe que sur le peptide contre lequel il est dirigé (5 à 10 pmol en fonction de la saignée testée) et le peptide C-ter (10 à 25 pmol).

La spécificité des deux antiséras diffère : le premier dirigé contre le LORF reconnaît la partie centrale de la molécule et présente une réaction croisée avec les hémérythrines ou des fragments de ces protéines alors que le second est plus spécifique du peptide amidé reconnaissant le côté C-ter amidé.

## 2.2 Distribution du LORF $\alpha$ -amidé

Différentes structures apparaissent immunoréactives à l'antisérum anti-LORF  $\alpha$ -amidé. Au niveau du cerveau, l'aire neurohémale est immunoréactive (fig. 16a) ce qui laisse supposer une sécrétion dans le vaisseau sanguin adjacent. Au sein du ganglion supra-œsophagien, plusieurs neurones des compartiments 3 et 5 sont réactifs (fig. 16a et b) ainsi que les cellules gliales des compartiments du ganglion sous-œsophagien (fig. 16c). Par ailleurs, les cellules gliales des ganglions segmentaires de la chaîne nerveuse (fig. 17a), les coelomocytes adhérents (fig. 17b), la paroi des conduits génitaux mâles (plus exactement la partie apicale dirigée vers la lumière contenant les spermatozoïdes ; fig. 17c) et les tubules rénaux (fig. 17d) le sont. Afin de confirmer la spécificité du marquage obtenu, des contrôles ont été réalisés avec l'antisérum saturé (fig. 17a' à 17d').

De façon intéressante, cette distribution correspond en partie à celle de l'ECA chez *Theromyzon tessulatum* (Vandenbulcke et coll., 1997) : ainsi il y a co-localisation de matériels respectivement immunoréactifs à l'anti-ECA et à l'anti-LORF  $\alpha$ -amidé au niveau des cellules gliales des ganglions nerveux (fig. 18a) et des coelomocytes (fig. 18b).

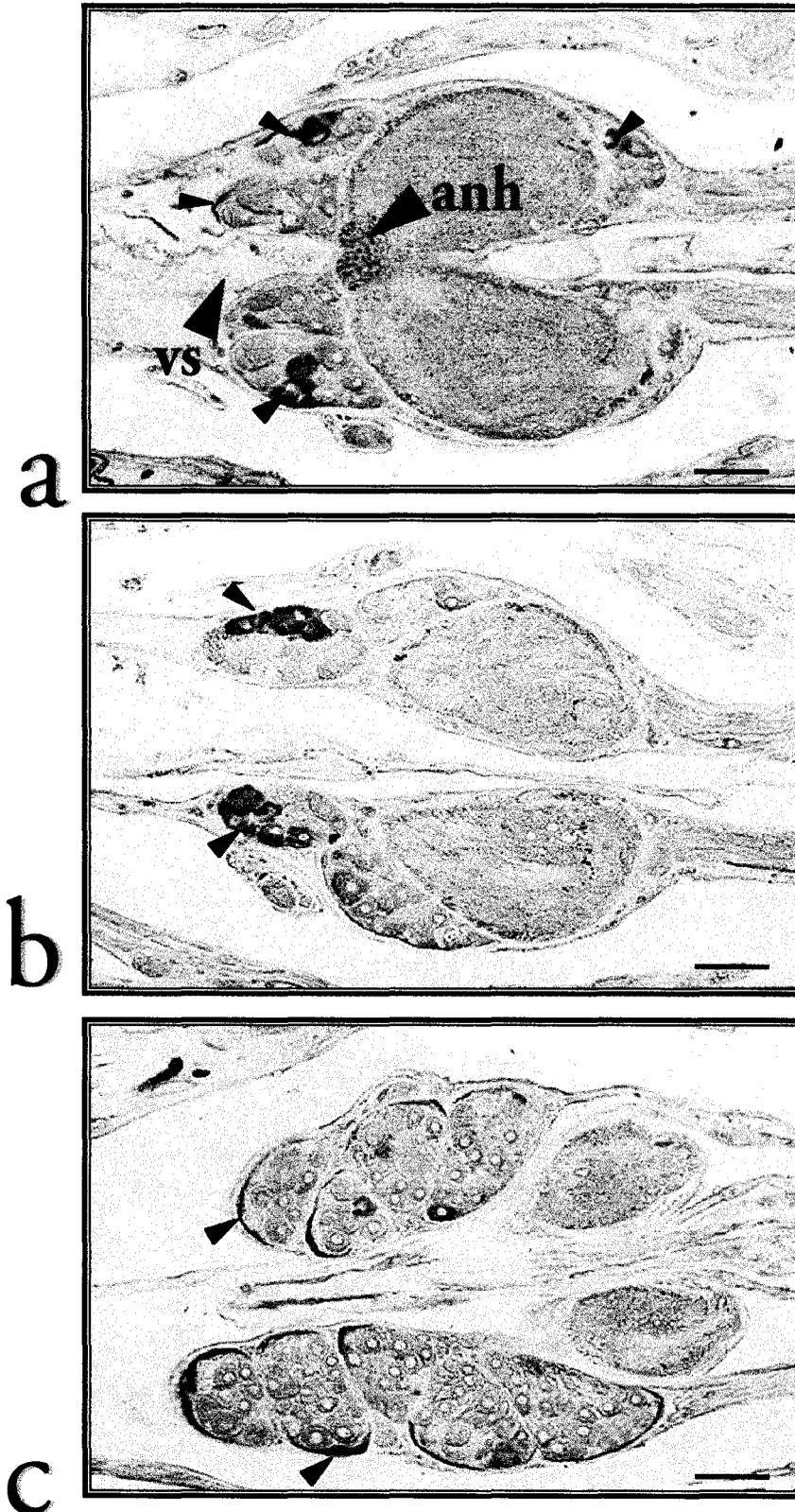
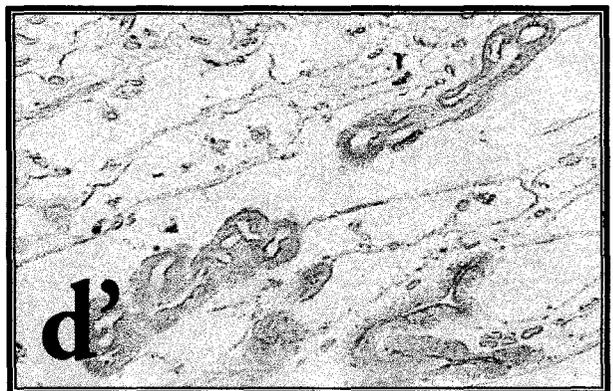
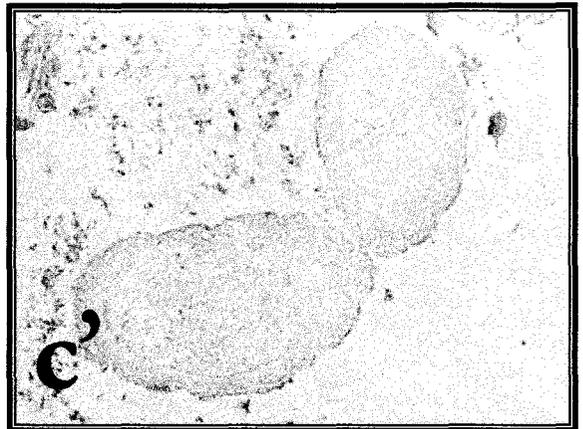
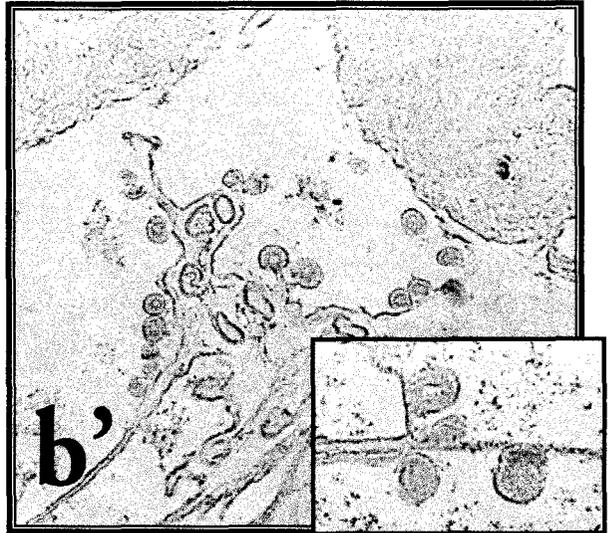
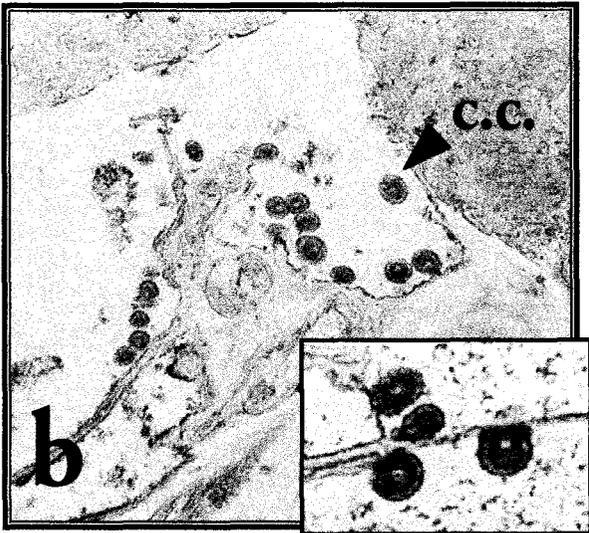
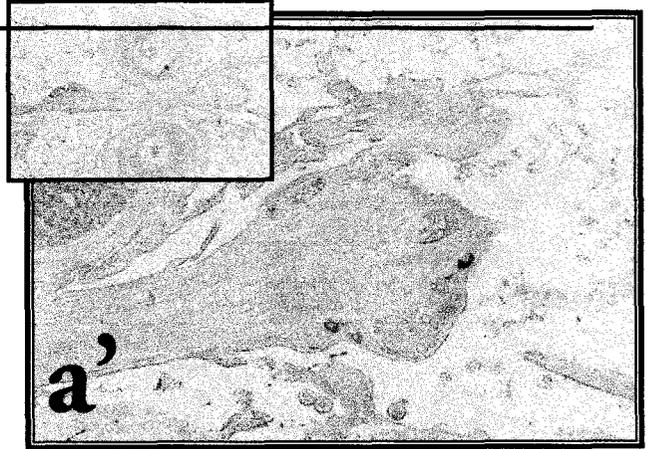
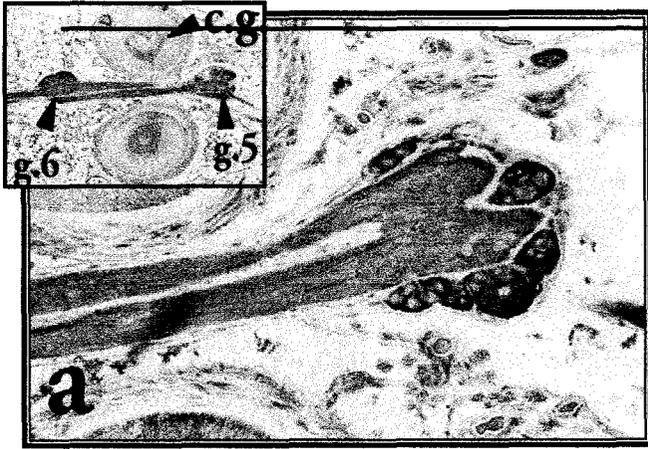
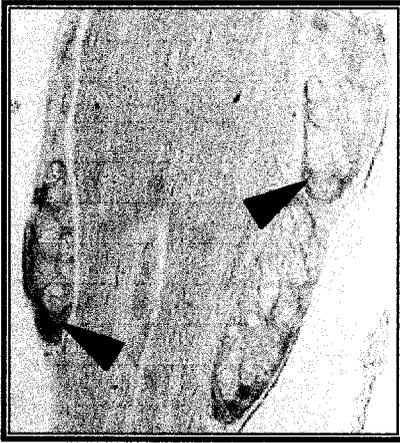


Figure 16 : Immunoréactivité à l'antisérum anti-LORF  $\alpha$ -amidé au niveau des ganglions cérébroïdes. Au niveau du ganglion supra-oesophagien, l'aire neurohémale (anh) est immunoréactive ainsi que des neurones et des cellules gliales des compartiments 3 et 5 (a et b); Au niveau sous-oesophagien, de nombreuses cellules gliales sont marquées (c). (Barre= 30 $\mu$ m; vs: vaisseau sanguin)

*Figure 17: Immunoréactivité à l'antisérum anti-LORF  $\alpha$ -amidé.* a : au niveau d'un ganglion de la chaîne nerveuse ; b : au niveau des coelomocytes ; c : au niveau des conduits génitaux et d : au niveau de tubules rénaux. Les contrôles respectifs sont présentés sur la droite (a', b', c' et d'). c.g. : conduit génital ; g.5 : 5<sup>ème</sup> ganglion ; g.6 : 6<sup>ème</sup> ganglion ; c.c. : cellules cœlomiques ou coelomocytes ; spz : spermatozoïdes ; t.r. : tubule rénal



Antisérums anti-LORF-amide



Antisérums anti-ECA



*Figure 18 : Exemples de co-localisation LORF a-amidé/ECA. a: au niveau des cellules gliales de la chaîne nerveuse; b: au niveau des coelomocytes*

Le LORF est un facteur antidiurétique chez *Theromyzon tessulatum*. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à son mode d'action :

- le peptide possède un récepteur qui lui est propre et l'activité pourrait être induite par sa fixation sur ce dernier ;
- le peptide est capable de rentrer en compétition avec des peptides diurétiques en se fixant sur leur(s) récepteur(s), les empêchant ainsi d'exercer leur effet ;
- le peptide est un inhibiteur de l'ECA. En empêchant la formation d'angiotensine II, identifiée comme facteur diurétique chez la sangsue (Salzet et coll., 1993), il entraînerait une antidiurèse.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, différents inhibiteurs endogènes de l'ECA, purifiés à partir de venin de serpent, ont pour caractéristique commune de contenir, comme le LORF, une forte proportion de proline au sein de leur séquence primaire. C'est pourquoi nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le LORF inhiberait la formation d'angiotensine II.



## LE LORF $\alpha$ -AMIDE INHIBE-T-IL L'ECA ?

### 2.1 Développement d'une approche par ELISA

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle le LORF  $\alpha$ -amidé inhiberait l'activation de l'ECA, un système *in vitro* a été développé. Le substrat, l'angiotensine I, est incubé avec l'enzyme en absence ou en présence de l'octapeptide. Dans un premier temps, nous avons utilisé l'ELISA comme moyen de détection. Pour ce faire, nous disposons de 2 antiséras (anti-angiotensine I (AI) et anti-angiotensine II (AII)) pour mesurer soit la disparition du substrat, soit l'apparition du produit.

Les 2 antiséras sont testés sur plaque ELISA (fig. 19). L'antisérum anti-AI reconnaît les angiotensines I et II. La saturation par l'angiotensine I entraîne une

diminution du signal non spécifique du peptide coaté, sa saturation par de l'angiotensine II permet une reconnaissance spécifique de l'angiotensine I.

L'antisérum anti-AII, quant à lui, est spécifique du peptide contre lequel il est dirigé, ne reconnaissant pas l'angiotensine I.

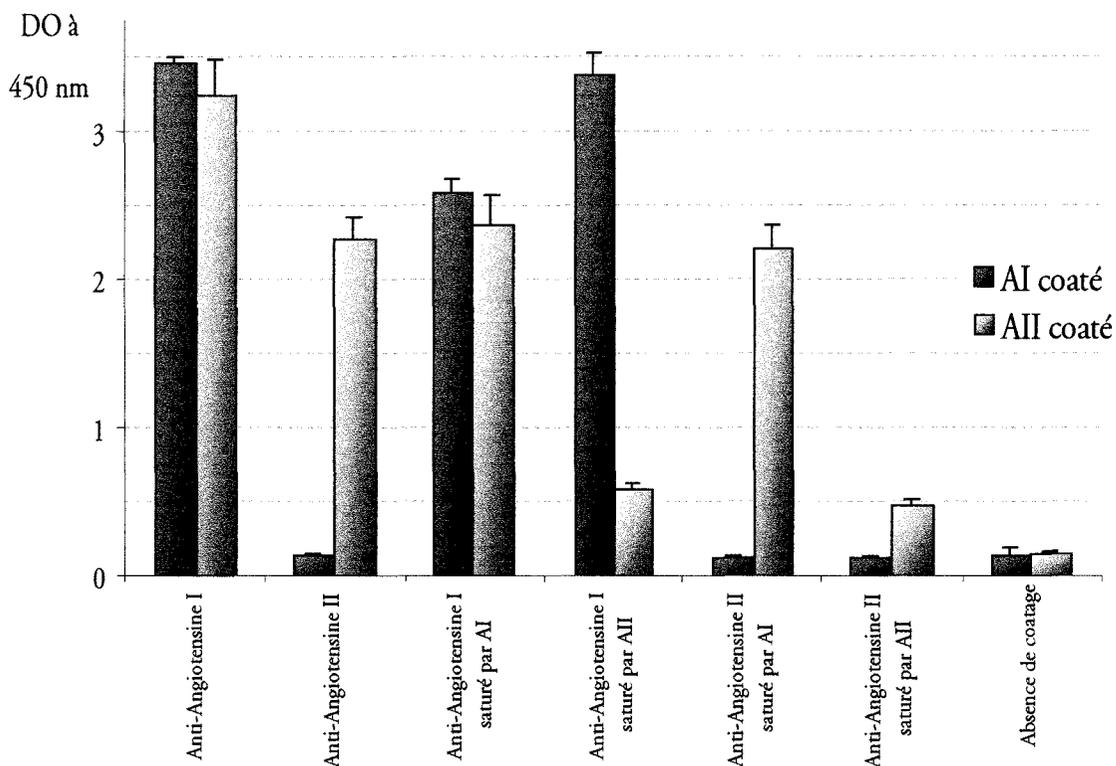


Figure 19 : Comparaison de l'antisérum anti-Angiotensine I et de l'antisérum anti-Angiotensine II.

De par cette spécificité, nous avons choisi le second antisérum afin de mesurer l'angiotensine II produite lors de la digestion. Pour ce faire, les puits sont coatés avec de l'AII de telle sorte que l'AII produite lors de la digestion suite à l'action de l'ECA soit en compétition avec le peptide fixé sur la plaque : plus il y aura d'angiotensine II libre, moins le signal détecté sera fort.

L'arrêt de la réaction se fait par ajout de TFA 1% qui modifie de façon importante le pH. Toutefois cette acidification du milieu étant incompatible avec la détection par anticorps, il a été nécessaire de diminuer la concentration en acide dans les puits en réalisant une gamme de dilution.

En absence de digestion, l'antisérum reconnaît exclusivement le peptide fixé, ce qui se traduit par une valeur plus élevée que lorsqu'il y a compétition (après digestion) entre le peptide libre et le peptide fixé.

Avec des concentrations croissantes de LORF, les valeurs diminuent progressivement tendant à atteindre la valeur « absence de digestion » (fig. 20), ce qui peut suggérer un effet inhibiteur de l'octapeptide  $\alpha$ -amidé sur l'ECA.

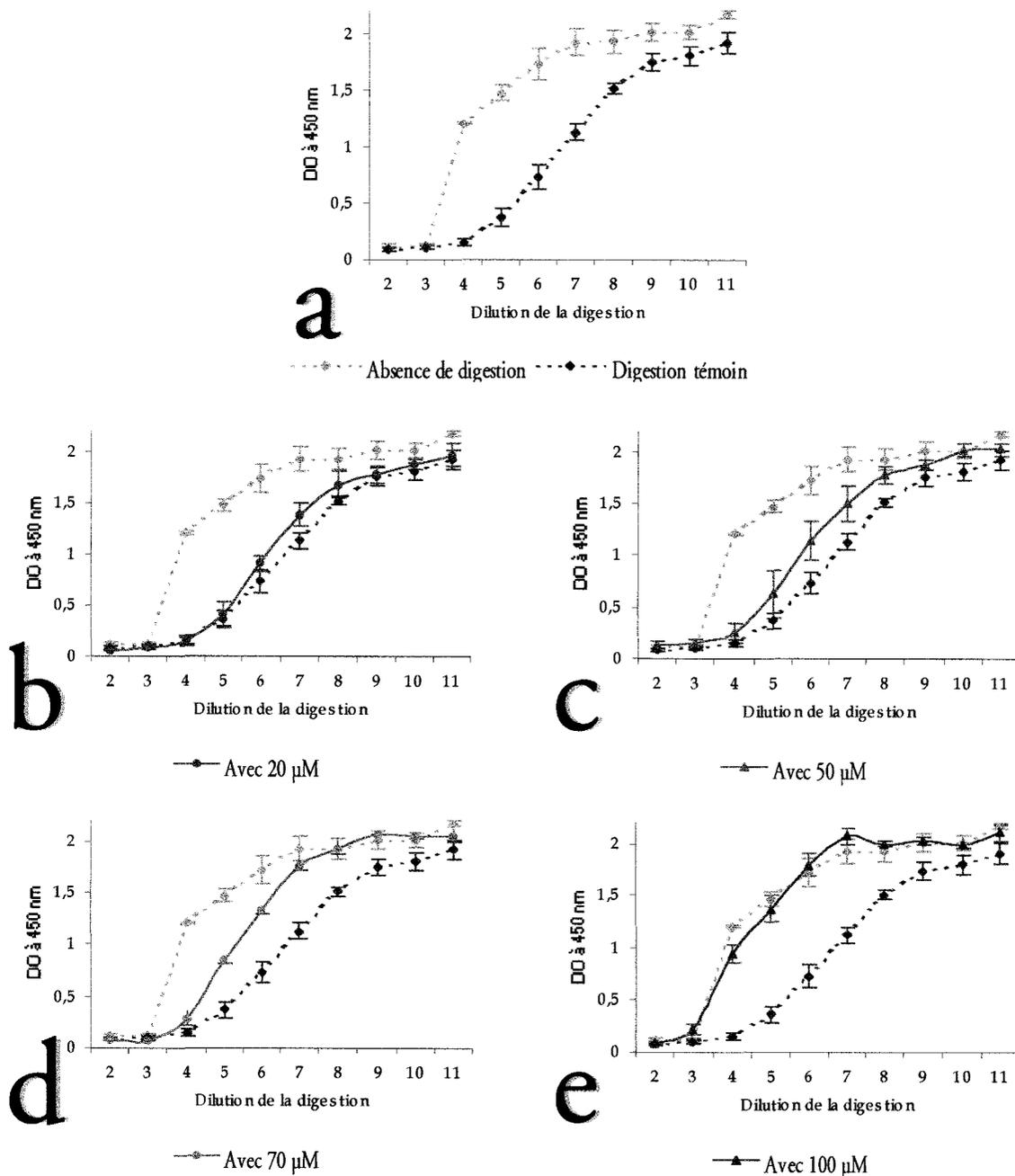


Figure 20 : Digestion d'angiotensine II (100  $\mu$ M) en absence ou en présence de LORF  $\alpha$ -amide. a : courbe standard : absence de digestion et digestion en absence de LORF  $\alpha$ -amidé ; b : digestion en présence de 20  $\mu$ M de LORF  $\alpha$ -amidé ; c : en présence de 50  $\mu$ M de LORF  $\alpha$ -amidé ; d : en présence de 70  $\mu$ M de LORF  $\alpha$ -amidé ; e : en présence de 100  $\mu$ M de LORF  $\alpha$ -amidé

Bien que nous ayons obtenu des résultats encourageants, le nombre important de digestions à réaliser et à analyser nous a contraints à conclure que cette technique de détection très longue présentait des inconvénients majeurs, ne serait ce que par la difficulté de détermination des constantes après dilution. Afin de pallier à ces défauts, un système d'analyse basé sur une détection par électrophorèse capillaire a été développé.

## 2.2 Détermination de l'IC<sub>50</sub> du LORF $\alpha$ -amidé par électrophorèse capillaire

Non seulement rapide, la technique de détection par électrophorèse capillaire présente l'avantage d'être quantitative : la surface du pic obtenu pour un produit est proportionnelle à la concentration de la molécule (fig. 21).

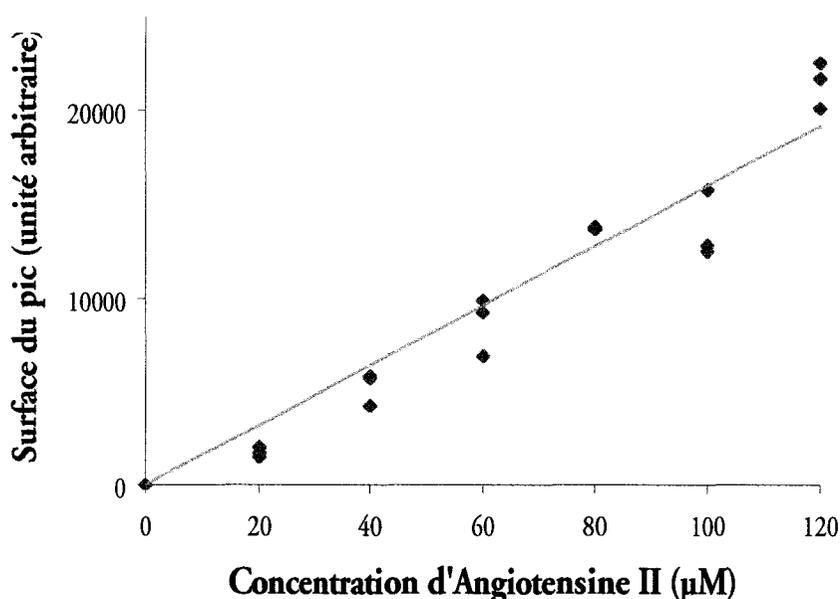


Figure 21 : Gamme d'angiotensine II réalisée par électrophorèse capillaire

Les digestions sont réalisées comme précédemment (à l'exception des paramètres de temps et de concentration de substrat qui ont été optimisés). L'arrêt de la réaction au TFA ne pose ici aucun problème du fait que les échantillons sont évaporés à sec. Par ailleurs, l'ajout du standard interne permet la comparaison des données les unes par

rapport aux autres. Dans les conditions définies de migration, chaque peptide possède un profil de migration qui lui est propre (fig. 22).

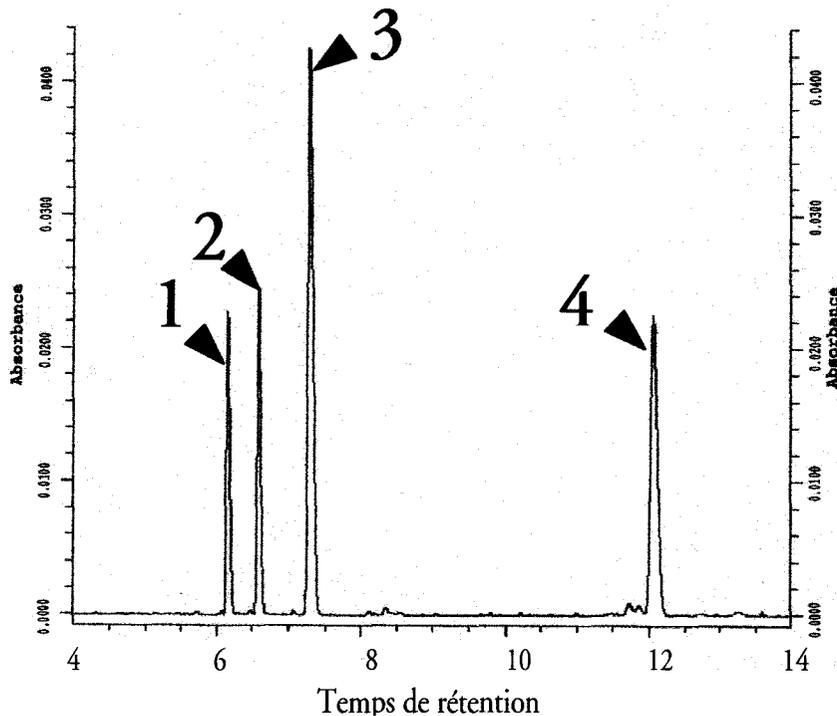


Figure 22 : Profil de migration des différents peptides. 1 : FMRF-amide ; 2 : angiotensine I ; 3 : angiotensine II ; 4 : LORF  $\alpha$ -amidé. L'ECA utilisée n'apparaît pas sur le graphique car elle est éliminée lors de la centrifugation avant l'évaporation

Comme lors de la détection par ELISA, nous avons mesuré la quantité d'AII formée. La détermination du temps optimal de digestion est effectuée en incubant une même quantité de peptide ( $30 \mu\text{M}$  d'AI) avec de l'ECA pendant des temps variables (fig. 23). Après 75 min. de digestion, la quantité d'AII reste constante. Le temps de réaction utilisé au cours des différentes manipulations a, de ce fait, été arbitrairement fixé à 40 min. ce qui correspond au temps nécessaire pour que 70 % de l'AI soit digérée.

La digestion se faisant en tampon Tris/HCl et la migration en électrophorèse capillaire reposant sur la charge de la molécule, il nous a semblé important de vérifier que la concentration ionique du tampon n'influait pas la détection. Aucune différence significative est observée pour l'aire des pics et leur temps de rétention (fig. 24).

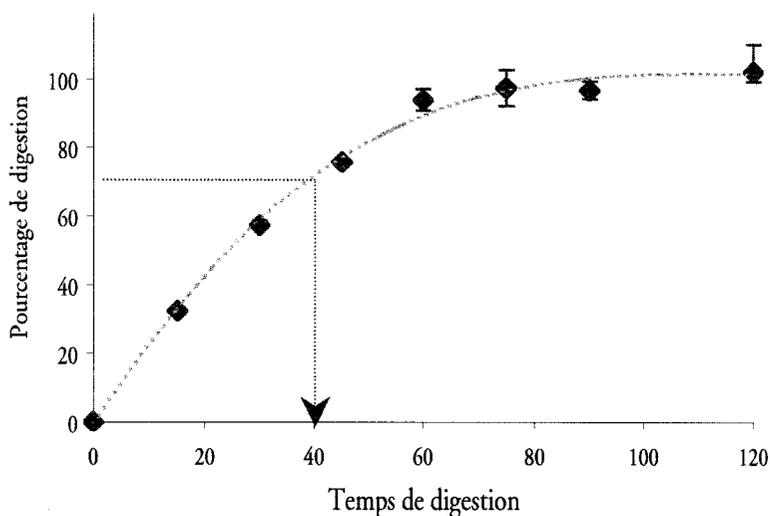


Figure 23 : Détermination du temps optimal de digestion. Une digestion de  $30 \mu\text{M}$  d'angiotensine I est réalisée pendant des temps variables. La ligne horizontale en pointillés correspond à 70 % de digestion

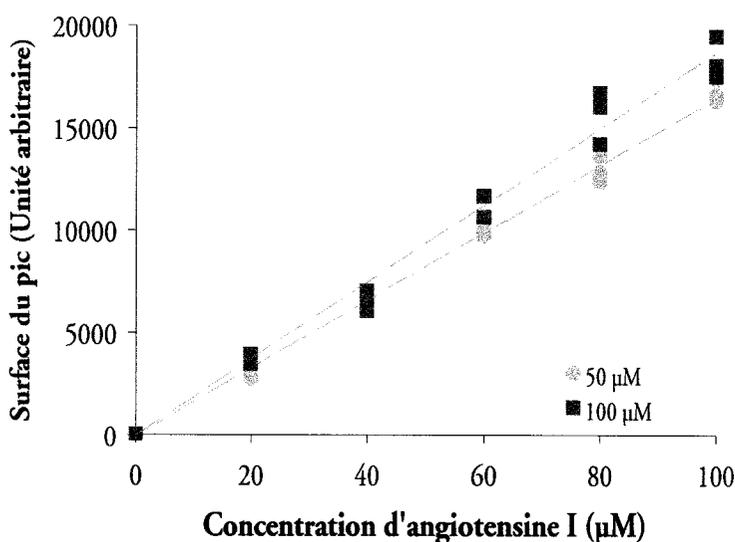


Figure 24 : Influence de la concentration ionique du tampon de digestion. Différentes concentrations d'angiotensine I subissent une digestion de 40 min. soit dans un tampon tris/HCl  $50 \mu\text{M}$  soit dans un tampon Tris/HCl  $100 \mu\text{M}$

Les conditions de digestion étant définies (tampon Tris/HCl  $100 \mu\text{M}$ , digestion de 40 min.,  $12,5 \mu\text{U}$  d'ACE et  $30 \mu\text{M}$  d'angiotensine I), l'effet du LORF  $\alpha$ -amidé sur l'ACE fut testé (fig. 25). L'IC<sub>50</sub> de la molécule est de  $19,75 \mu\text{M}$ .

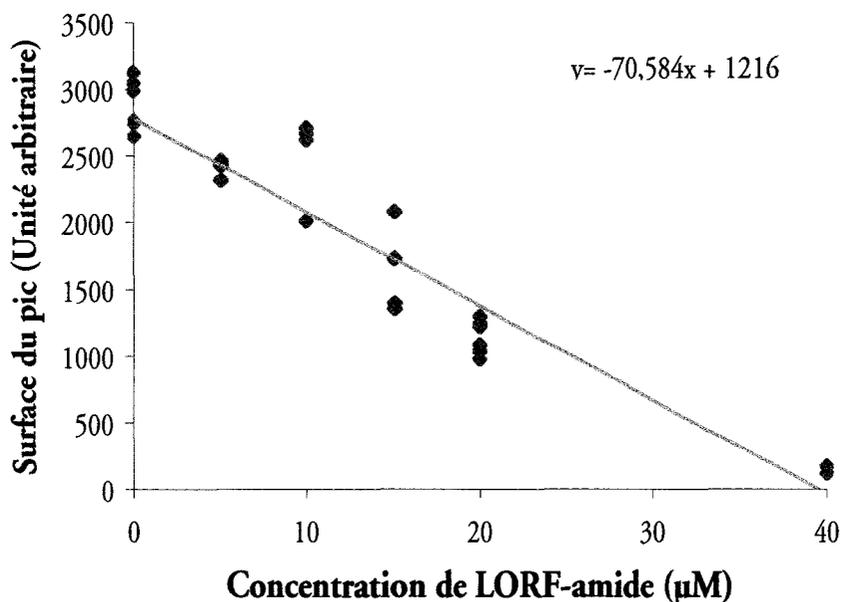


Figure 25: Digestion de 30 μM d'angiotensine I en présence de différentes concentrations de LORF α-amidé

Deux autres peptides ont été testés de la même façon. Bien que les valeurs restent à confirmer, le peptide YVWD ne semble pas actif alors que le peptide IPEP présenterait une  $IC_{50}$  d'environ 11,5 μM (fig. 26a). Son activité, en tant qu'inhibiteur de l'ECA, serait sensiblement deux fois supérieure à celle du LORF α-amidé (fig. 26b).

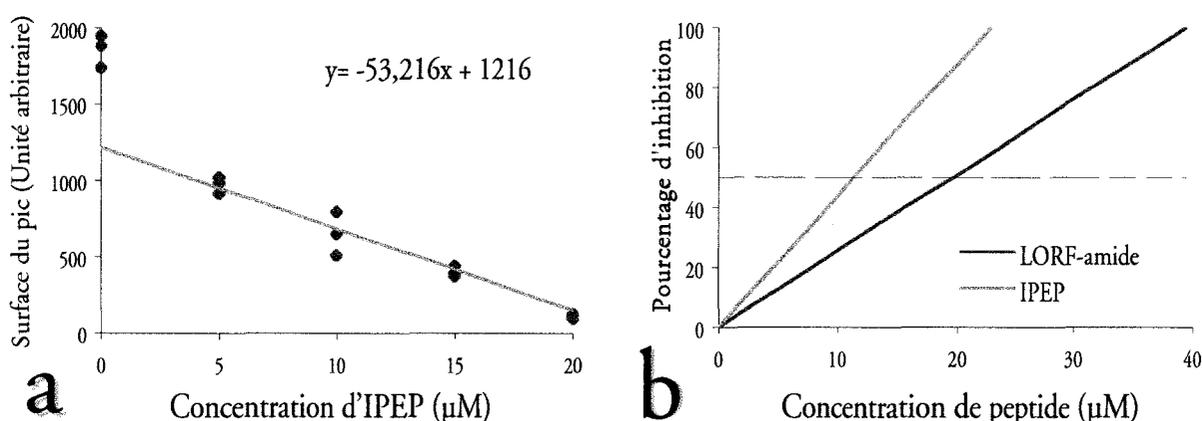


Figure 26: Digestion de 30 μM d'angiotensine I en présence de différentes concentrations d'IPEP (a) et comparaison avec le LORF α-amidé (b)



## RECHERCHE DU PRECURSEUR POTENTIEL DU LORF $\alpha$ -AMIDE

Le LORF et le LORF  $\alpha$ -amidé ne diffèrent que par l'amidation C-ter. A cause de ceci, les deux octapeptides ne peuvent vraisemblablement pas être issus du même précurseur. En effet, l' $\alpha$ -amidation est catalysée par la peptidyl-glycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM) : à partir d'un peptide possédant en position C-ter une glycine, elle réalise un clivage N-oxydatif de cette extension en 2 étapes (fig. 27). L'enzyme est bifonctionnelle. Deux domaines enzymatiques indépendants catalysent les deux réactions séquentielles requises : le domaine peptidyl-glycine  $\alpha$ -hydroxylating monooxygenase (PHM) catalyse une hydroxylation de la glycine C-ter pour former un intermédiaire  $\alpha$ -hydroxyglyciné. Le domaine Peptidyl- $\alpha$ -hydroxyglycine  $\alpha$ -amidating lyase (PAL) le clive pour libérer un peptide amidé et un glyoxylate.

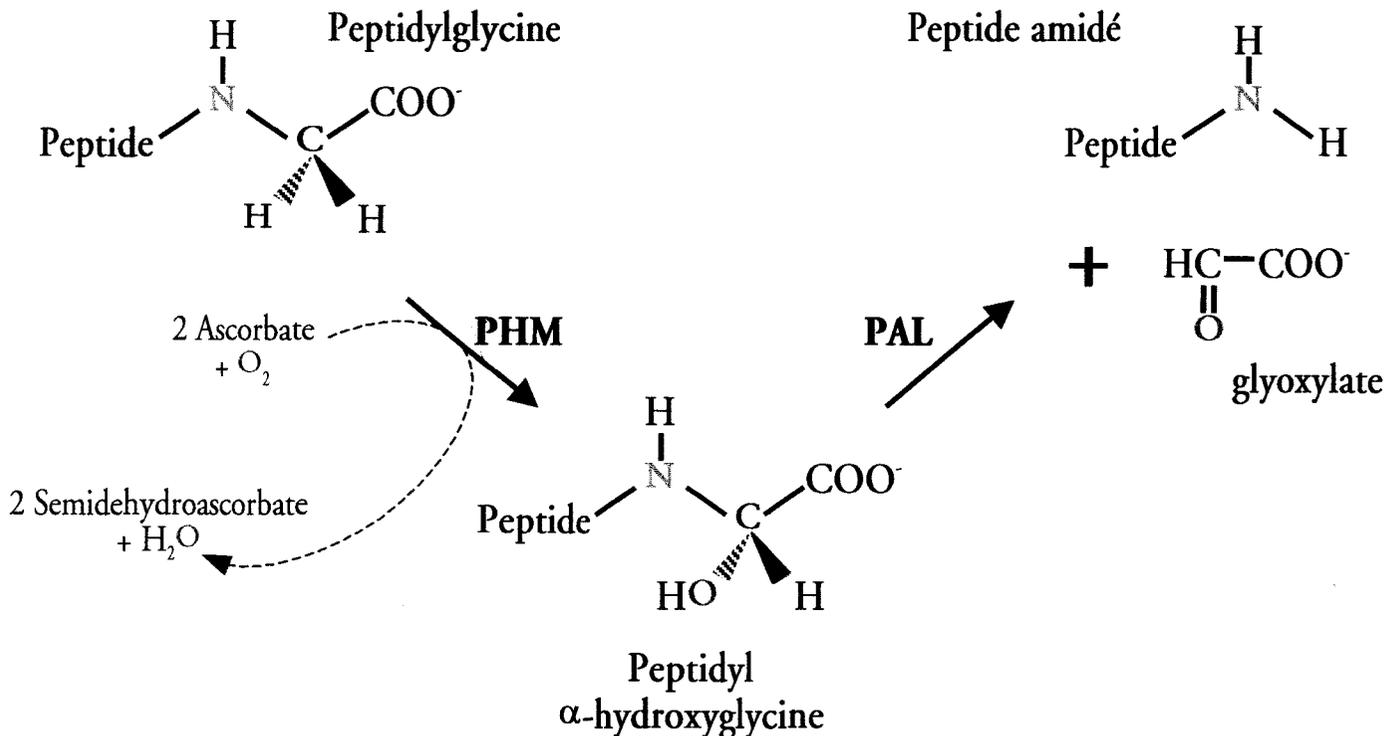


Figure 27 : Réaction catalysée par la PAM. Le domaine PHM catalyse la première réaction formant un intermédiaire  $\alpha$ -hydroxyglyciné et le domaine PAL le clive pour libérer le peptide  $\alpha$ -amidé

Comme nous l'avons noté précédemment, une séquence apparentée au LORF est contenue dans les hémérythrines. La forme non amidée de l'octapeptide pourrait provenir d'un membre (non encore identifié) de cette famille. Le LORF  $\alpha$ -amidé, du fait de sa modification post-traductionnelle nécessitant une glycine en C-ter, ne peut être généré à partir des hémérythrines et serait issu d'un nouveau précurseur que nous avons recherché.

Pour ce faire, des oligonucléotides dégénérés déduits de la séquence en acides aminés du LORF et intégrant la glycine nécessaire à l'amidation ont été synthétisés (fig. 28).

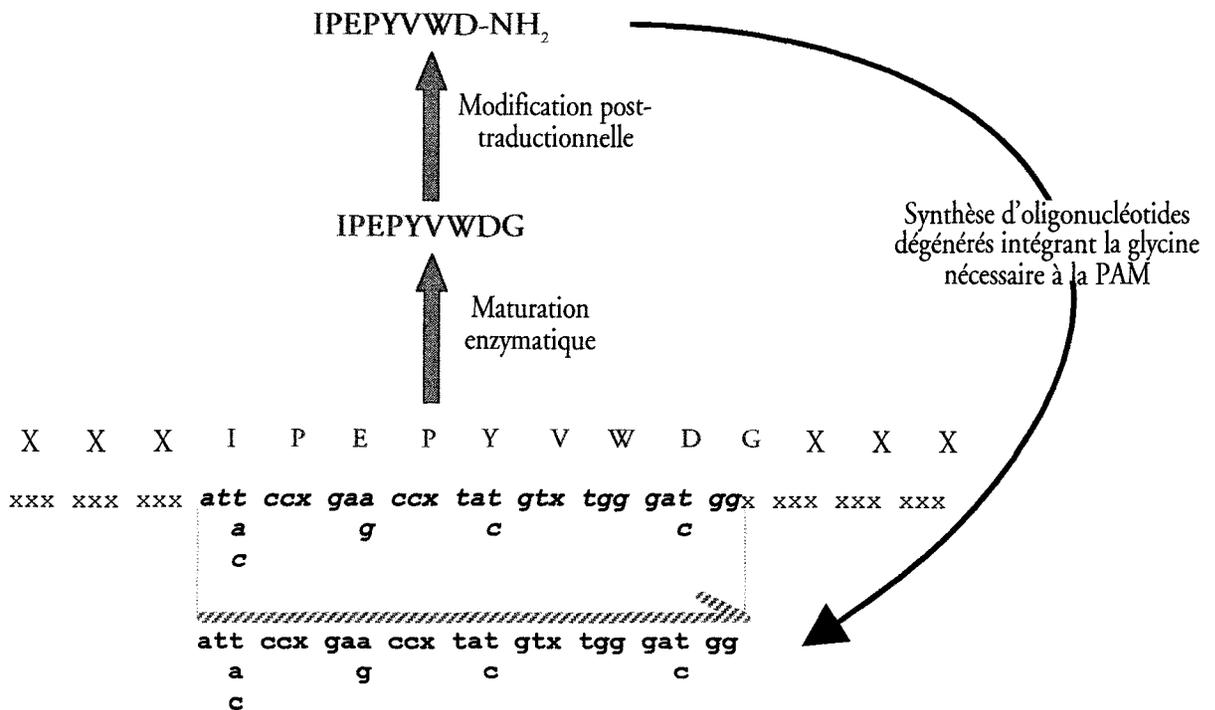


Figure 28 : Stratégie d'élaboration des oligonucléotides en vue du clonage du précurseur du LORF  $\alpha$ -amidé. Les oligonucléotides choisis tiennent compte de la présence d'une glycine en position C-ter du peptide avant modification.

Ces amorces sens ont été utilisées en PCR sur de l'ADNc de sangsue de stade 3 contre un oligonucléotide dT antisens et ont permis l'amplification de plusieurs fragments d'environ 400 pb. Après séquençage de nombreux transformants, 2 clones ont

été différenciés. Ils correspondent à des membres de la famille des hémérythrines (fig. 29).

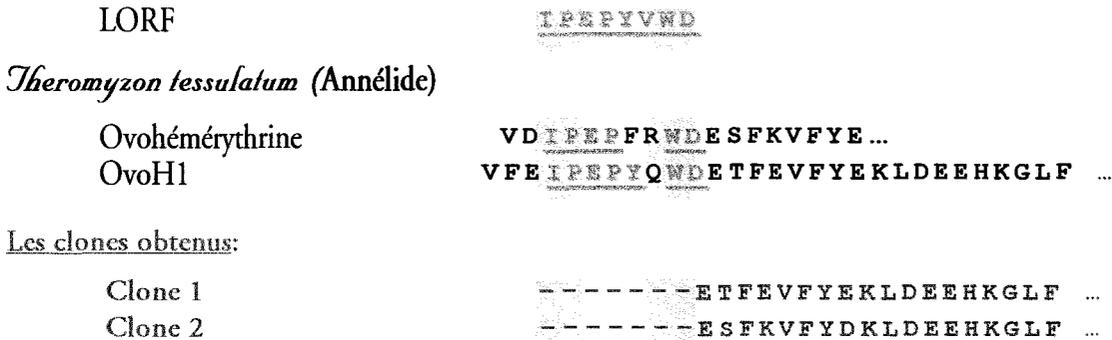


Figure 28: Alignement des clones obtenus avec des hémérythrines connues chez *Theromyzon tessulatum*. Le clone 1 correspond à l'OvoH1 de *Theromyzon tessulatum*. Le clone 2 est un nouveau membre de la famille des hémérythrines. La séquence correspondante au LORF est figurée en vert (les acides aminés différents sont colorés en noir)

Le clone 1 code pour une hémérythrine déjà connue sous le nom d'OvoH1 chez *Theromyzon tessulatum* (Baert et coll., 1992) et le second pour un nouveau membre de cette famille. De façon surprenante et ce malgré l'addition des 2 bases supplémentaires en 3' des oligonucléotides, les deux molécules obtenues ne présentent pas de glycine. Dans le cas de l'OvoH1, la séquence exacte du LORF n'est pas retrouvée. Pour le clone 2, nous ne savons pas, à ce jour, s'il contient la séquence de l'octapeptide, les amorces utilisées couvrant cette zone. Néanmoins, l'absence de glycine permet de conclure que la protéine n'est pas le précurseur du LORF  $\alpha$ -amidé.

# LA DIURESE

## L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE

L'enzyme de conversion de l'angiotensine de *Theromyzon tessulatum* a été partiellement caractérisée précédemment (Laurent et Salzet, 1995). Les 23 premiers acides aminés N-ter obtenus lors de cette purification présentent une forte homologie avec la partie N-ter de l'ECA somatique de Vertébrés. Les données biochimiques suggèrent que l'enzyme ne présente qu'un seul domaine catalytique comme chez les autres Invertébrés. Les premières investigations de clonage de l'enzyme par PCR, à partir d'amorces dégénérées déduites de la séquence en acides aminés, se sont révélées inefficaces, l'insert destiné à être amplifié ayant une taille trop élevée.

L'alignement des séquences d'ECA de différentes espèces (des Mammifères aux Insectes) montre des zones de conservation importante notamment autour du site

catalytique. C'est pourquoi des amorces oligonucléotides (sens et antisens) dégénérées ont été synthétisées à partir des séquences 'VCHASAWDF' et 'GANPGFHEA' peu éloignées l'une de l'autre (fig. 32).



Figure 32 : Stratégie de clonage de l'ECA de sangsue. Les a.a. encadrés sont retrouvés dans toutes les espèces. Le site catalytique C-ter est coloré en rouge

Un fragment de 180pb a été amplifié à partir d'ADNc de *Theromyzon tessulatum* de stade 3 et a servi de support à l'élaboration de trois oligonucléotides sens homologues. Ce jeu d'amorces couplé à un oligodT antisens a permis l'obtention d'un fragment d'environ 1kb correspondant, après séquençage au 3' de l'ADNc de l'ECA (fig. 33).

Comme nous l'avons noté précédemment, il existe plusieurs formes d'ECA chez les Mammifères : l'ECA somatique, à deux domaines catalytiques, ancrée ou non dans la membrane et l'ECA germinale, transmembranaire à un domaine. Chez les Insectes, les ECA caractérisées sont solubles et ne contiennent qu'un site catalytique. A ce jour, nous ne pouvons pas conclure quant à la structure de l'ECA de sangsue. Nous pouvons cependant noter, grâce à l'interrogation des banques de données, qu'elle s'aligne sur les séquences connues (fig. 34a), présentant une homologie de 59 % avec l'ECA de *Gallus domesticus* (domaine C), de 55 % avec l'ACE 1 d'*Homo sapiens* (domaine C) et d'environ 45 % avec les enzymes de *Drosophila melanogaster* et d'*Haemotobia irritans* (fig. 34b).

Bien que nous n'ayons pas la totalité de l'ADNc, nous pouvons d'ores et déjà affirmer que l'ECA présente la signature caractéristique des métalloprotéases (séquence consensus : HHEMGGH); le site actif semble conservé suggérant la fonctionnalité de l'enzyme. N'ayant mis en évidence aucun domaine

transmembranaire dans la séquence C-ter, l'ECA de sangsue, comme celles des Insectes, n'existerait que sous forme soluble .

La caractérisation du 5' de l'ADNc de l'ECA de sangsue est en cours au sein du laboratoire. Des amorces oligonucléotidiques antisens homologues ont été synthétisées à partir du 3' de notre séquence ; elles sont utilisées en 5' RACE-PCR sur la banque d'ADNc (*Theromyzon* de stade 2) récemment acquise.



*Theromyzon* VCHASAW DFYNRKDFRI KQCTVVDMMH FMTTHHEMGG IEYLLHYKDO PISFRSGANP GFHEALADIA SLSVATPEYM QSVSLL-PNF TDDPNGDINE LMQALTKVA FLPPGYLIDQ  
*Acer Dros.* RHVVCHASAW DFYQDSVRI KMCTEVDSHY FVYVHHEGGH LOYLYOYEQO PAVYRGAPNP GFHEAVGDVI ALSVMSAKHL KAIGLI-ENG RLDEKSRINQ LFKQALSKIV FLPPGYAVDK  
*Ance Dros.* RDLVCHASAW DFYLIDDVRI KQCTRVTDQD LFTVHHEGGH IOYFLOYOQO PFVYRTGANP GFHEAVGDVL SLSVSTPKHL EKIGLL-KDY VRDEARINQ LFLTALDKIV FLPEFTMDK  
*Hi ACE* RDLVCHASAW DFYLLTDDVRI KQCTRVTDQD FFTVHHEMGGH LOYFLOYOQO PFVYRTGANP GFHEAVGDVL SLSVSTPKHL ERVGLL-KNY VSDNEARINQ LFLTALDKIV FLPEFTMDK  
*Gd ACE* REVVCHASAW DFYNRKDFRI KQCTVVNDD LFTVHHEMGGH VOYFLOYMOO PISFRSGANP GFHEALGDVM ALSVSTPKHL HSLNLL-DQV HENEESDANY LMSIALDKIA FLPPGYLMDQ  
*ACE* REVVCHASAW DFYNGKDFRI KQCTTVNLED LVVAHHEMGGH IOYFMOYKDL PVALREGANP GFHEALGDVL ALSVSTPKHL HSLNLL-SSE GGSDEHDINE LMKMALDKIA FIPESYLVDO  
*ACE 2* REVVCHPTAW DL-GKGDFRI LMCRTKVTMD FLTAHHEMGGH LOYDMAYAAO PFLLRNGANE GFHEAVGETM SLSAATPKHL KSIGLLSEDE QEDNETEINE LKQALTIYIC TLPEFTMLEK

*Theromyzon* WRWDVFSQDT PRPKYNSKWW HNRCKYOGIY PPVKRSEDF DAGSKFHVNP NTPYIRYFVA HVIQFQFHEA LCKAAN---- -NSR-PLHRC NLANSKEAGE KLAGIMKSGS SIPWPKVLEN  
*Acer Dros.* YRYAVERNEL DESQWNCGFV QMRSEFGGVE PPVFRTEKDF DPPAKYHIDA DVEYLRYPAA HIFQFQFHKA LCRKAGQYAP NNSRLTLDNC DDFGSKAAGR SLSQFLSKGN SRHWKEVLE  
*Ance Dros.* YRWSLFRGEV DKANWNCAPV KLRDEYSGTE PPVVRSEKDF DAPAKYHISA DVEYLRYLVS FIIQFQFYKS ACIKAGQYDP DNVLEPLDNC DRYGSARAGA AFHNMLSMGA SKPWPDALEA  
*Hi ACE* YRWALFRGOA DKSEWNCAPV KLRREYSGTE PPVVRTEKDF DAPAKYHISA DVEYLRYLVS FIIQFQFYKS ACITAGEYVP NQTEYPLDNC DRYGSKEAGK LFNMLSLGA SKPWPDALEA  
*Gd ACE* WRWKVFDGRI KEDEYNQOWW NLRLKYQGLC PPVPRSEDDF DFGAKFHIEA NVPYIRYFVS FVIQFQFHQA LCKAAG---- -HTG-PLHTC DRYOSKEAGK LFGDAMKLEF SKPWEAMQL  
*ACE* WRWRVEDGSI TKENYNQEWV SIKLKYQGLC PPVPRTOGDF DFGAKFHIPS SVPYIRYFVS FIIQFQFHEA LCKAAG---- -HTG-PLHRC DRYOSKEAGK RLATAMKLEF SRPWEAMQL  
*ACE 2* WRWVEMGEI EKDQWMLKWW EMKREIVGVV EPVPHDETTC DPASLEHVSN DYSFLRYYTR TLYQFQFOEA LCKAAG---- -HEG-PLHRC DLSNSTEAGO KLFNMLRLCK SEPWTALLEN

*Theromyzon* ITGSEKMSAK SLMAYYKPLI DWPEKRPRA ENWMGGKMSS WII\*  
*Acer Dros.* FNGETEMDPA ALLEYFEPFLY QW-----LKO ENSRLGVPLG WGPTDKIPSD CCGTFST\*  
*Ance Dros.* FNGERTMSGK AIAEYFEPFLR VW-----LEA ENIKNNVHIG WTTSNKCVSS\*  
*Hi ACE* FNGERTMTGK AIAEYFEPFLR VW-----LEA VAVESLCHQR YKNVDL\*  
*Gd ACE* ITGQPNMSAE ALMSYFEPFLM TW-----LVK KNTENGEVLG WPEYSWTPYA VTEFHAATDT --ADFLGMSV GTKQATAGAW VLLALALVFL ITSIFLGVKL FSSRRKAFKS  
*ACE* ITGQPNMSAS AMLSYFEPFL DW-----LKT ENELHGEKLG WPOYNWTPNS ARSEGPLPDS GRVSLFLGLDL DAQQARVGQW LLLFLGLIALL VATLGLSURL FSIHRH-SLH  
*ACE 2* VVGAKNNVNR PILLNYFEPFL TW---LKDQN KNSFVCGWSTD WSPYADQSIK VRISLKSALG DRAYEWNDE MYLFRSSVAY AMROYFLKVK NQMILFGEED VRVANLKPRI

a

	<i>T. tessulatum</i>	Acer	Ance	Hi Ace	Gd Ace	ACE 1	ACE 2
<i>T. tessulatum</i>	100 100	44 64	45 63	46 63	59 75	55 73	45 64
Acer		100 100	59 72	60 73	48 64	47 63	41 56
Ance			100 100	85 91	50 63	43 58	43 58
Hi ACE				100 100	55 68	51 65	45 60
Gd ACE					100 100	75 88	47 66
ACE 1						100 100	47 65
ACE 2							100 100

b

Identité ; Similitude

Figure 34: Comparaison de la séquence en acides aminés de *Theromyzon tessulatum* déduite de l'ADNc avec différentes séquences connues a : Alignement des séquences en acides aminés (Invertébrés : -Acer et Ance : *Drosophila melanogaster* ; - Hi Ace : *Haemotobia irritans*. Vertébrés : - Gd Ace : *Gallus domesticus* ; - ACE 1 et ACE 2 : *Homo sapiens*). Les identités sont figurées en vert foncé et les similitudes en vert clair. Le consensus du site catalytique est coloré en violet. b : Pourcentage d'identité et de similitude entre les séquences

Les séquences présentées dans cette figure proviennent d'une banque de données informatique (Serveur Pubmed) et sont accessible sous les numéros suivant : - Acer : JC5354 ; - Ance : Q10174 ; - Hi Ace : Q10175 ; - Gd Ace : JC2489 ; - ACE 1 : P12821 ; - ACE 2 : NP 00068576

```

GTG TGC CAT GCG AGT GCG TGG GAC TTC TAC AAT CGC AAG GAT TTC AGA ATC AAA CAA
V C H A S A W D F Y N R K D F R I K Q

TGC ACG GTT GTG GAC ATG CAC TGG TTC ATG ACG ACT CAC CAT GAG ATG GGA CAC ATC
C T V V D M H W F M T T H H E M G H I

GAA TAC TAC CTC CAC TAC AAG GAC CAA CCC ATC AGT TTC AGA TCT GGC GCT AAT CCA
E Y Y L H Y K D Q P I S F R S G A N P

GGA TTT CAT GAG GCC ATT GCC GAT ATT GCA TCA CTG TCA GTG GCC ACA CCT GAA TAT
G F H E A I A D I A S L S V A T P E Y

ATG CAA TCC GTC AGC CTG TTG CCT AAT TTC ACT GAC GAT CCA AAT GGC GAT TTA AAC
M Q S V S L L P N F T D D P N G D L N

TTC TTA ATG AAC CAA GCC TTA ACG AAG GTG GCC TTC CTA CCA TTC GGT TAC CTG ATC
F L M N Q A L T K V A F L P F G Y L I

GAC CAG TGG AGA TGG GAC GTG TTC TCG GGA GAT ACC CCT CGA CCA AAA TAC AAC TCC
D Q W R W D V F S G D T P R P K Y N S

AAG TGG TGG CAC AAC AGG TGT AAG TAC CAG GGC ATA TAT CCT CCA GTG AAA AGG TCA
K W W H N R C K Y Q G I Y P P V K R S

GAG CAA GAT TTT GAT GCC GGT TCC AAG TTC CAT GTA CCC AAC AAC ACT CCA TAC ATC
E Q D F D A G S K F H V P N N T P Y I

AGG TAC TTT GTT GCT CAC GTC ATC CAA TTC CAA TTC CAT GAA GCC CTG TGC AAG GCT
R Y F V A H V I Q F Q F H E A L C K A

GCC AAC AAC AGC AGA CCT CTA CAT AGA TGT AAC ATC GCC AAT TCC AAG GAA GCT GGA
A N N S R P L H R C N I A N S K E A G

GAG AAA CTG GCT GAA TTG ATG AAA TCT GGA TCT TCA ATT CCG TGG CCT AAA GTT CTA
E K L A E L M K S G S S I P W P K V L

GAA AAT CTT ACT GGA TCG GAA AAA ATG TCA GCG AAA TCT CTC ATG GCC TAT TAC AAA
E N L T G S E K M S A K S L M A Y Y K

CCG TTG ATC GAT TGG CCT GAA AAA AGA AAA CCA AGG GCA GAA AAT TGG ATG GGA GGA
P L I D W P E K R K P R A E N W M G G

AAA ATG TCC TCC TGG ATC ATT TGA ACCATGAAATTATTTATTTGATTTTATGTCATTTTCATAATTTT
K M S S W I I *

TCTACCACTTTTTTAATAAACTTAGGTGCCTATTGAATATGTTCTTGCAATTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figure 33 : Séquence nucléotidique partielle et séquence primaire déduite. L'astérisque indique le codon stop. Le signal de polyadénylation est souligné. Le site catalytique est coloré en vert



CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES

Chez *Theromyzon tessulatum*, après chaque repas, il y a mise en place de mécanismes osmorégulateurs. Lors du passage aux stades 1 et 2, l'animal est soumis à une diurèse assurant la concentration des cellules sanguines ingérées. Lors du passage au stade 3, une profonde antidiurèse est indispensable à sa reproduction. Ces caractéristiques font de cette sangsue d'eau douce, un bon modèle pour l'étude de l'osmorégulation.

La diurèse est sous contrôle de plusieurs peptides : la Lysine-conopressine, le GPDFRLF  $\alpha$ -amidé et l'angiotensine II  $\alpha$ -amidé. Cette dernière provient de l'hydrolyse de l'angiotensine I par l'ECA. L'existence d'un système rénine-angiotensine complet et apparemment fonctionnel a été mise en évidence biochimiquement, ce qui, à ce jour, est unique chez les Invertébrés. Nous nous sommes focalisés lors de cette étude sur l'une des enzymes de ce système : l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

## L'enzyme de conversion de l'angiotensine

La caractérisation à l'échelle moléculaire des enzymes de conversion de l'angiotensine d'Invertébré n'a été réalisée que chez les Insectes Diptères et les

Arachnides Acariens. L'enzyme d'Hirudinée est, de ce fait, la première ECA caractérisée chez les Invertébrés en dehors des Arthropodes.

Bien que la caractérisation de l'ADNc ne soit pas complète, une séquence C-ter de 273 acides aminés a pu être déduite de l'ADNc cloné et analysée.

Le messenger code pour une forme soluble de l'enzyme. Aucun domaine transmembranaire potentiel n'est observé dans la séquence. Il est à remarquer que cette caractéristique est commune aux Insectes. Par contre, chez *Boophilus microplus* (Arachnide, Acarien), l'enzyme possède une région C-ter hydrophobe vraisemblablement transmembranaire ce qui laisse supposer que la transition forme soluble/forme ancrée se soit produite avant la divergence Chélicérates et Trachéates (Coates et coll., 2000). Néanmoins, nous ne pouvons exclure l'éventualité de l'existence d'autres formes d'ECA dans notre modèle, lesquelles pourraient posséder un domaine hydrophobe comme cela a été suggéré par Vandebulcke et coll. en 1997.

Les ECA présentes chez les Insectes ne sont pas impliquées dans l'osmorégulation, le SRA n'existant pas chez les Arthropodes. L'enzyme est engagée dans d'autres mécanismes comme la reproduction et l'embryogenèse. Ainsi, une mutation du gène de l'Ance rend les mâles de *Drosophila melanogaster* stériles (Takei et coll., 1995). Une observation similaire a été faite chez les Mammifères : l'inactivation du gène de l'ECA par recombinaison homologe, chez les souris mâles, réduit fortement la fertilité (Hagaman et coll., 1998). Au niveau embryonnaire, des modifications du gène Ance entraînent un phénotype létal (Takei et coll., 1995). De la même façon, l'injection d'inhibiteurs spécifiques de l'ECA à une larve de *Manduca sexta* inhibe le développement embryonnaire (Lamango et coll., 1997). Les substrats des ECA d'Insectes restent cependant inconnus. Bien que de nombreuses molécules soient hydrolysables par l'ECA *in vitro*, seules deux d'entre elles, à ce jour, le sont *in vivo* : l'angiotensine I et la bradykinine, lesquelles n'ayant pas été mises en évidence chez les Insectes. Dans notre modèle, *Theromyzon tessulatum*, l'ECA paraît être impliquée dans l'osmorégulation (et

plus précisément dans la diurèse par production d'angiotensine II). Elle pourrait néanmoins exercer également d'autres fonctions.

Nous savons, d'après l'étude de sa séquence, que le site catalytique de l'ECA de sangsue est potentiellement fonctionnel. Les acides aminés essentiels à l'activité sont conservés. Des activités ECA ont été détectées chez les Annélides et les Arthropodes mais pas chez les Nématodes. Au niveau génomique, 6 gènes codant des molécules apparentées à l'ECA ont été identifiées chez *Drosophila melanogaster* : seules deux enzymes se révèlent fonctionnelles (Coates et coll., 2000). Chez *Caenorhabditis elegans*, l'analyse du génome montre l'existence d'un gène unique qui code potentiellement pour une enzyme inactive (Isaac et coll., 2000). De récentes études de phylogénie moléculaire ont permis l'élaboration d'un nouvel arbre basé essentiellement sur l'analyse des ARNr des différents groupes bouleversant les hypothèses antérieures. Les Protostomiens seraient subdivisés en lophotrochozoaires (Annélides entre autres) et en ecdysozoaires (Arthropodes et Nématodes). La divergence entre les Annélides et les 2 autres groupes serait antérieure à celle des Arthropodes et des Nématodes (Adoutte et coll., 2000). Les données sur l'ECA de *Theromyzon tessulatum* ne s'intègrent pas dans ce schéma évolutif : chez les sangsues, au minimum, un gène ECA code pour un produit actif si on se réfère aux résultats biochimiques obtenus auparavant (Laurent et Salzet, 1996). Ainsi, si l'on prend le critère de la seule ECA, la divergence Nématodes-(Arthropodes/Annélides) aurait précédé celle des Arthropodes et des Annélides ce qui montre clairement la complexité de la construction des arbres phylogénétiques et du choix des critères.

Les molécules impliquées dans l'antidiurèse sont moins connues. Bien que Malecha ait démontré que l'antidiurèse est sous le contrôle de « facteurs » cérébraux (1983) et que, par la suite, il ait montré que l'injection d'antisérum anti-ocytocine au cours du stade 3B inhibe la rétention d'eau, l'étude des peptides antidiurétiques n'était guère

ébauchée jusqu'à ces dernières années. Récemment en se basant sur ces données, le LORF et le LORF  $\alpha$ -amidé furent caractérisés (Salzet et coll., 1996). Au cours de ce travail, nous avons tenté de comprendre le mécanisme d'action de ces peptides et entrepris la purification d'un nouveau peptide impliqué dans l'antidiurèse.

## Le LORF et les hémérythrines

Dans le but de déterminer le mode d'action du LORF, nous avons mis au point un protocole expérimental original basé sur la détection de protéines par électrophorèse capillaire. Cette technique électrophorétique est utilisée pour la première fois en vue de caractériser un inhibiteur enzymatique. Quantitative, elle présente un intérêt de par sa rapidité d'analyse et son coût très peu élevé.

Dans le système hétérologue développé, le LORF  $\alpha$ -amidé n'est pas clivé par l'ECA mais inhibe l'activité de l'enzyme ; le peptide est donc un inhibiteur et non un substrat compétitif. Son  $IC_{50}$  est d'environ 20  $\mu M$ . Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les « bradykinin-potentiating peptides » issus du venin de *Bothrops jararaca*, inhibiteurs compétitifs endogènes de l'ECA, dont les  $IC_{50}$  fluctuent entre 0,7 et 76  $\mu M$  (Cheung et Cushman, 1973).

Une étude structure/fonction indique que l'activité inhibitrice du peptide proviendrait de sa partie N-ter riche en prolines. En effet, le tétrapeptide N-ter (IPEP) est sensiblement deux fois plus actif que la molécule complète ( $IC_{50}$  11,5  $\mu M$ ) alors que le tétrapeptide C-ter ne produit aucun effet. Etant donné que seule la région N-ter de l'octapeptide semble importante, le LORF et le LORF  $\alpha$ -amidé devraient avoir les mêmes propriétés. Nous en avons obtenu confirmation en testant le LORF non amidé dans notre système (données non montrées).

Au cours des études menées sur les peptides d'ophidiens, l'importance du tripeptide N-ter a été rapportée. Les conditions les plus favorables correspondent à un acide aminé aromatique en antépénultième et en dernière position ; une substitution de l'aromatique terminal par un acide dicarboxylique n'inhibe pas l'efficacité (Cushman et coll., 1979). Le tétrapeptide IPEP répond à ces critères ; néanmoins bien que son  $IC_{50}$

demande à être confirmée, il semble qu'il ne soit pas aussi efficace que le peptide BBP5a de *Bothrops jararaca* dont l'IC<sub>50</sub> est de 0,7  $\mu$ M. Cette grande différence au niveau des constantes peut se justifier par la présence chez la molécule reptilienne d'un résidu pyroglutamique ; en effet, la modification de celui-ci entraîne une diminution d'activité, multipliant par 10 l'IC 50 initiale (Cushman et coll., 1979).

De façon intéressante, une séquence apparentée à celle de l'octapeptide est retrouvée dans la partie N-ter des membres de la famille des hémérythrine ; dans la plupart de ces molécules, la région N-ter (IPEP) est parfaitement conservée. De ce fait, il n'est pas impensable que les hémérythrine, dans leur intégralité, puissent réaliser une inhibition de l'ECA. Chez *Theromyzon tessulatum*, les isoformes d'hémérythrine s'accumulent lors du stade 3. Toutefois, des différences d'expression dans le temps et peut être même dans l'espace peuvent être observées. Ainsi, les hémérythrine peuvent, dans certains cas, posséder un peptide signal permettant une excrétion extracellulaire (Baert, communication personnelle). A ce jour, 2 isoformes ont fait l'objet d'études approfondies. L'ovohémérythrine semble être synthétisée de façon importante au cours des étapes 3A, 3B, 3C et moins en 3D ; elle est retrouvée dans le liquide coelomique et dans les ovaires où elle est stockée (Baert et coll., 1992). La synthèse de la myohémérythrine commence en fin d'étape 3B, se poursuit lors de l'étape 3C et est maximale durant l'étape finale de l'ovogénèse (étape 3D). Le gène de cette hémérythrine est largement exprimé dans l'animal. La protéine ne semble cependant pas pouvoir être excrétée dans le liquide coelomique du fait de l'absence de peptide signal (Coutte et coll., 2001). Dans les deux cas, l'expression et la détection protéique sont inexistantes après la ponte des cocons.

Dans l'hypothèse où l'hémérythrine entière ne serait pas active, une maturation pourrait libérer un peptide identique ou apparenté au LORF dont la séquence N-ter serait IPEP. Nous pensons, en effet, que l'octapeptide non amidé proviendrait d'une isoforme non encore caractérisée. Dans tous les cas, la maturation de ce précurseur ne peut se faire que par un processus non classique ; en effet, aucun site de clivage mono-

basique ou dibasique n'est observé à la suite des séquences connues. La libération de l'octapeptide peut par contre se faire grâce à des enzymes capables de générer une coupure post-aspartique.

Les caspases sont une famille de protéases à cystéine ; toutes présentent la caractéristique de réaliser une hydrolyse après un résidu aspartique. Elles sont impliquées dans le processus apoptotique des cellules et sont retrouvées aussi bien chez les Vertébrés que chez les Invertébrés. Sept caspases fonctionnelles ont été caractérisées chez *Drosophila melanogaster* dont une semble susceptible de couper aussi bien en arrière d'un résidu aspartique que glutamique (Hawkins et coll., 2000). Ces enzymes semblent très anciennes, et sont déjà présentes sous au moins deux formes chez *Hydra vulgaris*. (Cikala et coll., 1999). Il est, de ce fait, légitime de penser que de telles protéases puissent exister au sein de notre modèle.

L'action des caspases permettrait la libération du LORF avec une extension N-ter hydrolysable par une aminopeptidase. Cet octapeptide pourrait alors servir de substrat à d'autres enzymes soit pour le désactiver soit au contraire pour augmenter son activité : le fragment IPEP pourrait être produit par l'action d'une prolyl endopeptidase qui réalise des clivages post-proline. Les données concernant cette enzyme chez les Invertébrés sont rares ; néanmoins, nous pouvons affirmer qu'une protéase de cette famille existe chez *Theromyzon tessulatum* puisque nous avons cloné une partie de l'ADNc correspondant.

Le LORF  $\alpha$ -amidé ne peut en aucun cas provenir du même précurseur que la forme non amidée pour les raisons que nous avons indiquées précédemment. Il serait donc issu de la maturation d'une autre molécule encore inconnue. De même l'hypothèse d'un précurseur du LORF non amidé, différents des hémérythrines ne peut être complètement exclue. La caractérisation à l'échelle moléculaire de ce(s) précurseur(s) s'avère(nt) difficile du fait de l'existence même des hémérythrines. Une solution pourrait être d'utiliser l'anticorps anti-LORF  $\alpha$ -amidé pour une purification biochimique : si la maturation du précurseur se fait en plusieurs étapes, des fragments plus longs

pourraient être isolés et utilisés pour la synthèse de nouvelles amorces oligonucléotidiques.

## Le PLG $\alpha$ -amidé

Nous avons caractérisé un nouveau facteur antidiurétique chez *Theromyzon tessulatum*. Il est apparenté à la famille du Melanocyte Inhibiting Factor (MIF) uniquement connu chez les Vertébrés (Reed et coll., 1994). Il s'agit de peptides opioïdes non-classiques se fixant sur les récepteurs  $\mu$ . Le PLG-amide de sangsue est identique à MIF-1. L'activité osmorégulatrice que nous avons observée ne semble pas exister chez les Vertébrés.

## Le LORF, les hémérythrines et l'ECA

A partir de nos résultats, il est possible d'établir un mécanisme hypothétique du contrôle de l'osmorégulation de *Theromyzon tessulatum*. Les hypothèses concernant la reproduction sont extrapolées des données obtenues chez les Insectes (figure 35).

Au cours des stades 0, 1 et 2, la sangsue est soumise à la diurèse : l'ECA transforme l'angiotensine I en angiotensine II, molécule diurétique.

Après le 3<sup>ème</sup> repas, l'anatomie et la physiologie de la sangsue subissent des modifications importantes. L'animal grossit suite à une rétention d'eau. Les glandes salivaires dégèrent (apoptose ?) et l'animal entre en phase mâle. La spermatogenèse se réalise au cours des étapes 3A et 3B. Au niveau du liquide coelomique, l'ovohémérythrine est sécrétée dès le début du stade 3. Par action directe ou indirecte (production de LORF ou de peptides apparentés), elle inhibe l'ECA ; et empêche ainsi la libération d'angiotensine II et donc la diurèse. Au niveau testiculaire, l'ECA assure le clivage de peptide essentiel à la spermatogenèse (Insecte, Takei et coll., 1995).

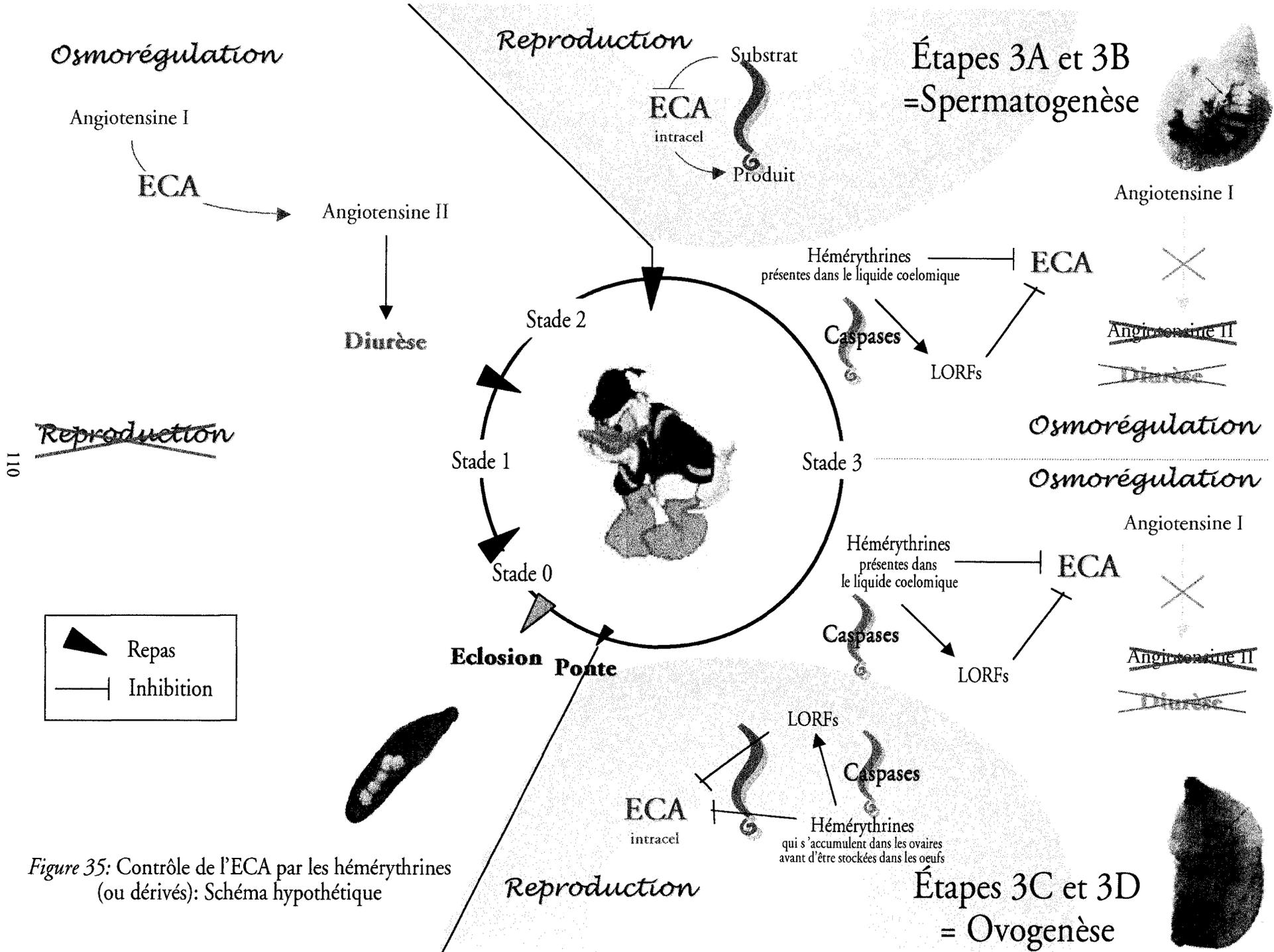


Figure 35: Contrôle de l'ECA par les hémérythrines (ou dérivés): Schéma hypothétique

110

Conclusions et perspectives

Au début de l'étape 3C, la spermatogenèse est terminée et les gonades mâles commencent à régresser. Les ovaires se développent. Au niveau du liquide cœlomique, l'ECA est toujours inhibée et l'ovohémérythrine débute son stockage dans les ovaires. Au niveau des ovaires (et dans les testicules en cours de régression), une nouvelle hémérythrine (myohémérythrine) est produite ; de par l'absence de peptide signal, elle ne peut pas être sécrétée et de ce fait, s'accumule dans les organes. Comme la protéine du liquide cœlomique, elle pourrait exercer un contrôle de l'ECA. L'action se poursuit tout au long du stade 3D.

Au stade 3E, l'animal pond des cocons et le développement embryonnaire débute dans les oeufs. L'ECA devient essentielle à la croissance (Insecte : Lamango et coll., 1997).

Suite aux résultats obtenus et aux hypothèses émises, plusieurs questions se posent :

- L'ECA de sangsue possède-t-elle un ou deux domaines catalytiques ?

Le clonage du 5' de l'ADNc nous permettra d'y répondre, grâce aux techniques de 5'RACE-PCR avec des amorces homologues déduites de la séquence en notre possession ;

- Existe-t-il d'autres ECA chez *Theromyzon tessulatum* ?

Nous savons que les ECA sont particulièrement bien conservées au niveau des sites catalytiques. La réalisation d'un anticorps dirigé contre le domaine enzymatique devrait permettre la reconnaissance de toutes les ECA, anticorps que nous utiliserions en immunohistochimie. En parallèle, une sonde spécifique de la molécule que nous connaissons peut servir à des expériences d'HIS. La comparaison des résultats (immunohistochimie/HIS) devrait nous renseigner sur l'éventualité de la présence d'une nouvelle isoforme de l'enzyme dans la mesure où celle-ci serait exprimée dans un tissu différent ;

- L'expression du gène de l'ECA est-elle constante au cours de la vie de l'animal ?

Nous avons émis l'hypothèse d'une régulation au niveau de l'activité ; il est néanmoins possible d'observer une régulation transcriptionnelle de l'enzyme. Par une technique de PCR semi-quantitative, il est possible de comparer les taux d'expression en fonction des différents stades et dans les différents organes ;

- Le clone 2 obtenu lors de la tentative de clonage du LORF-amide renferme-t-il la séquence du LORF ?

De même que pour l'ECA, des amorces homologues dessinées à partir de la séquence connue seront utilisées en 5' RACE-PCR.

- Les hémérythrines peuvent-elles agir dans leur intégralité ? Toutes les hémérythrines sont-elles à même de produire des peptides présentant une activité ?

Notre technique basée sur la détection par électrophorèse capillaire étant au point, nous projetons de tester l'activité de peptides LORF à extension C- ou N-ter ainsi que celles d'octapeptides apparentés au LORF et déduits des hémérythrines connues. Leur activité sera comparée à celle du LORF.

En conclusion, ce travail ouvre de nouvelles perspectives. Il semble important que la poursuite de cette étude ne se cantonne pas au seul mécanisme de l'osmorégulation. Si l'on en juge par le rôle de l'ECA chez les insectes, de nombreuses activités peuvent lui être attribuées.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Acher, R., Chauvet, J., Chauvet, M.T., Crepy, D. (1965). Phylogénie des peptides neurohypophysaires : Isolement d'une nouvelle hormone, la glutitocine ([Ser4-Gln8]-ocytocine) présente chez un poisson cartilagineux, la raie *Raja clavata*. Biochim. Biophys. Acta 107, pp 393-6.
- Acher, R., Chauvet, J., Chauvet, M.T. (1967). Phylogeny of the neurohypophysial hormones. Nature 216, pp 1037-8.
- Acher, R., Chauvet, J., Chauvet, M.T. (1972). Phylogeny of the neurohypophysial hormones : two new active peptides isolated from a cartilaginous fish, *Squalus acanthias*. Eur. J. Biochem. 29, pp 12-9.
- Acher, R., Chauvet, J., Chauvet, M.T. (1970). A tetrapod neurohypophysial hormone in African lungfishes. Nature 227, pp 186-7.
- Acher, R. (1985). The nonmammalian-mammalian transition through neurohypophysial peptides. Peptides 6, pp 309-14.
- Acher, R., Chauvet, J., Chauvet, M.T., Rouillé, Y. (1999). Unique evolution of neurohypophysial hormones in cartilaginous fishes : possible implications for urea-based osmoregulation. J. Exp. Zool. 284, pp 475-84.
- Alexander, H., Alexander, S., Heffron, F., Fieser, T.M., Hay, B.N., Getzoff, E.D., Tainer, J.A., Lerner, R.A., 1991. Synthesis and characterisation of a recombinant myohemerythrin protein encoded by a synthetic gene. Gene 99, pp 151-6.
- Arimura, J.J., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. (1991). Isolation and identification of C-type natriuretic peptide in chicken brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 174 (1), pp 142-8.
- Atlas, S.A., Kleinert, H.D., Camargo, M.J., Volpe, M., Laragh, J.H., Lewicky, J.A., Maack, T. (1985). Atrial natriuretic factor (Auriculín): structure and biological effects. J. Clin. Hypertens. 1 (2), pp 187-98.
- Babiker, M.M., Rankin, J.C. (1978). Neurohypophysial hormonal control of kidney function in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) adapted to sea-water or fresh-water. J. Endocrinol. 76, pp 346-58.
- Baert, J.L., Britel, M., Sautière, P., Malecha, J. (1992). Ovohemerythrin, a major 14-kDa yolk protein distinct from vitellogenin in leech. Eur. J. Biochem. 209, pp 563-9.
- Balment, R.J., Loveridge, J.P. (1989). Endocrine and osmoregulatory mechanisms in the Nile crocodile, *Crocodylus niloticus*. Gen. Comp. Endocrinol. 73, pp 361-7.
- Baranowska, D., Braszko, J.J., Wisniewski, K. (1983). Effect of angiotensin II and vasopressin on acquisition and extinction of conditioned avoidance in rats. Psychopharmacol. 81, pp 247-51.
- Barnes, R.D (1987). Invertebrate zoology. 5<sup>th</sup> edition. New York, Saunders College Publishing, pp 312-41.
- Beldent V, Michaud A, Bonnefoy C, Chauvet MT, Corvol P (1995) .Cell surface localization of proteolysis of human endothelial angiotensin I-converting enzyme. Effect of the amino-terminal domain in the solubilization process. J Biol Chem. 270, pp 28962-9.
- Benyajati, S., Yokota, S.D. (1990). Renal effects of atrial natriuretic peptide in a marine elasmobranch. Am. J. Physiol. 258, pp 1201-6.
- de Bold, A.J. (1979). Heart atria granularity effects of changes in water-electrolyte balance. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161(4), pp 508-11.
- de Bold, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T., Sonnenberg, H. (1981). A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Life Sci. 28 (1), pp 89-94.
- de Bold, A.J. (1985). Atrial natriuretic factor : a hormone produced by the heart. Science 230, pp 767-70.
- Braszko, J.J., Wlasienko, J., Koziolkiewicz, W., Janecka, A., Wisniewski, K. (1991). The 3-7 fragment of the angiotensin II is probably responsible for psychoactive properties. Brain Res. 542, pp 49-54.

- Brenner, B.M., Ballerman, B.J., Gunning, M.E., Zeidel, M.C. (1990). Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol. Rev.* 70, pp 665-99.
- Broadhead, C.L., O'Sullivan, U.T., Deacon, C.F., Henderson, I.W. (1992). Atrial natriuretic peptide in the eel, *Anguilla anguilla* L., its cardiac distribution, receptors and actions on isolated brachial cells. *J. Mol. Endocrinol.* 9, pp 103-14.
- Brownstein, M.J. (1983). Biosynthesis of vasopressin and oxytocin. *Annu. Rev. Physiol.* 45, pp 129-35.
- Bumpus, F.M., Khosla, M.C. (1977). Angiotensin analogues as determinants of the physiological role of angiotensin and its metabolites. *Hypertension: Pathophysiology and treatment.* (Genest, J., Koiv, E., Kuchel, O., eds) McGraw-Hill, pp 183-201.
- Calamita, G., Goumon, P., Gobin, R., Bourguet, J. (1994). Antidiuretic response in the urinary bladder of *Xenopus laevis*: presence of typical aggregophores and apical aggregates. *Biol Cell* 80, pp 35-42.
- Campbell, D.J. (1995). Angiotensin peptides in the brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 377, pp 349-55.
- Chappell, M.C., Pirro, N.T., Sykes, A., Ferrario, C.M. (1998). Metabolism of angiotensin (1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 31, pp 362-7.
- Chauvet, J., Chauvet, M.T., Beaupain, D., Acher, R. (1965). Les hormones neurohypophysaires des Raies : comparaison des hormones du Pocheteau blanc (*Raia batis*) et de la raie bouclée (*Raia clavata*). *CR Acad. Sci. Paris* 261, pp 4234-6.
- Chauvet, J., Rouillé, Y., Cahuveau, C., Chauvet, M.T., Accher, R. (1994). Special evolution of neurohypophysial hormones in cartilaginous fishes : asvatocin and phasvatocin, two new oxytocin-like peptides in the spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, pp 11266-70.
- Chauvet, M.T., Colne, T., Hurpet, D., Chauvet, J. and Acher, R. (1983). Marsupial neurohypophysial hormones: identification of mesotocin, lysine vasopressin, and phenypressin in the quokka wallaby (*Setonix brachyurus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 51 (2), pp 309-15.
- Cheung, H.S., Cushman, D.W. (1973). Inhibition of homologous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. *Bioch. Biophys. Acta* 293, pp 451-63.
- Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F., Cushman D.W. (1980) Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* 225, pp 401-7.
- Cho, W.W., Kim, S.H., Koh, G.Y., Seul, K.H. (1988). Renal and hormonal responses to atrial natriuretic peptide and turtle atrial extract in the freshwater turtle, *Amyda japonica*. *J. Exp. Zool.* 247, pp 139-45.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Böttger, A., David, C.N. (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. *Cur. Biol.* 9, pp 959-62.
- Cleland, S.J., Reid, J.L. (1996). The renin-angiotensin system and the heart: a historical review. *Heart* 76 (suppl. 2), 7-12.
- Coates, D., Isaac, R.E., Cotton, J., Siviter, R., Williams, T.A., Shirras, A., Corvol, P., Dive, V. (2000). Functional conservation of the active sites of human and *Drosophila* angiotensin I-converting enzyme. *Biochem.* 39, pp 8963-9.
- Coleman, J. 1998. Zinc enzymes. *Curr. Op. Chem. Biol* 2, pp 222-34.
- Cornelle, M.J., Williams, T.A., Lamango, N.S., Coates, D., Corvol, P., Soubrier, F., Hoheisel, J., Lehrach, H., Isaac, R.E. (1995). Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 270, pp 13613-9.
- Corvol, P., Williams, T.A., Soubrier, F. (1995). Peptidyl dipeptidase A: Angiotensin-converting enzyme. *Methods in enzymology* (Barrett, ed.) Academic press, Vol. 248, pp 283-305.

- Coutte, L., Slomianny, M., Malecha, J., Baert, J.L. (2001) Cloning and expression analysis of a cDNA that encodes a leech hemerythrin. *Biochem. Biophys. Acta* 1518 (3), pp 282-6.
- Coviello, A., Elso, G., Fernandez, F.M. (1976). Effect of angiotensin II on short-circuit current in amphibian membranes. *Biochem. Pharmacol.* 25, pp 106-7.
- Cruz, L.J., de Santos, V., Zafaralla, G.C., Ramilo, C.A., Zeikus, R., Gray, W.R., Olivera, B.M. (1987). Invertebrate Vasopressin/Oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus striatus* venoms. *J. Biol. Chem.* 262, 33, pp 15821-4.
- Cushman, D.W., Pluscec, J., Williams, N.J., Weaver, E.R., Sabo, E.F., Kocy, O., Cheung, H.S., Ondetti, M.A. (1973). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia* 29, pp 1032-5.
- Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F., Rubin, B., Ondetti, M.A. (1979). Development of specific inhibitors of angiotensin I converting enzyme (Kinase II). *Fed. Proc.* 38, pp 2778-82.
- Davidson, N.C., Barr, C.S., Struthers, A.D. (1996). C-type natriuretic peptide: An endogenous inhibitor of vascular angiotensin-converting enzyme activity. *Circ.* 93, pp 1155-9.
- Deddish, P.A., Marcic, B., Jackman, H.L., Wang, H.Z., Skidgel, R.A., Erdős, E.G. (1998). N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: Angiotensin (1-7) and keto-ACE. *Hypertension* 31, pp 912-7.
- Delkers, W., Kleiner, S.S., Bähr, V. (1988). Effects of incremental infusions of atrial natriuretic factor on aldosterone, renin and blood pressure in humans. *Hypertension* 12, pp 446-62.
- Dicker, S.E., Elliott, A.B. (1969). Effects of neurohypophysial hormones on the skin permeability of *Rana cancrivora*, *in vivo*. *J. Physiol.*, 203(1), pp 74-5.
- Dicker, S.E., Elliott, A.B. (1970). Effects of neurohypophysial hormones on fluid movement across isolated bladder of *Rana cancrivora*, *Rana temporaria* and *Bufo melanostictus*. *J. Physiol.*, 210(2), pp 137-49.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 87(5), pp 1-9.
- Elhers, M.R.W., Fox, E.A., Strydom, D.J., Riordan, J.F. (1989). 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. USA* 86, pp 7741-5.
- Elliott, A.B., Chew, M.M. (1975). Vasotocin-like activity in the plasma of the euryhaline frog (*Rana cancrivora*) after transfer from fresh water to saline. *J. Endocrinol.*, 66(3), pp 427-34.
- Erickson, R.P., Kessler, S., Kromling, H., Sen, G.C. (1996). Species variation in the testicular angiotensin-converting enzyme promoter studied in transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* 44, pp 324-31.
- Esther, C.R., Thomas, K.E., Bernstein, K.E. (1994). Chicken lacks the testis specific isozyme of angiotensin converting enzyme found in mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, pp 1916-21.
- Ekbote, U., Coates, D., Isaac, R.E. (1999). A mosquito (*Anopheles stephensis*) angiotensin I-converting enzyme (ACE) is induced by a blood meal and accumulates in the developing ovary. *FEBS Let.* 455, pp219-22.
- Evans, D.H. (1990). A emerging role for a cardiac peptide hormone in fish osmoregulation. *Annu. Rev. Physiol.* 52, pp 43-60.
- Ferrario, C.M. (1998). Angiotensin (1-7) and antihypertensive mechanisms. *J. Nephrol.* 11, pp 278-83.
- Ferreira L.A., Alves W.E., Lucas M.S., Habermehl G.G. (1996). Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptoria* venom. *Toxicon.* 34(5), pp 599-603.

- Ferreira L.A., Galle A., Raida M., Schrader M., Lebrun I., Habermehl G. (1998). Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *J. Protein Chem.* 17(3), pp 285-9.
- Ferreira, S.H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararacca*. *J. Pharmacol. Chemother.* 24, pp 163-9.
- Ferreira, S.H., Bartelt, D.C. Greene, L.J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptide from *Bothrops jararaca* venom. *Biochem.* 9, pp 2283-93.
- Fitzsimons, J.T. (1972). Thirst. *Physiol. Rev.* 52, pp 468-561.
- Flynn, T.G., de Bold, M.L., de Bold, A.J. (1983). The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117(3), pp 859-65.
- Fowkes, R.C., McArdle, C.A. (2000). C-type natriuretic peptide: An important neuroendocrine regulator? *Trends Endocrinol. Metab.* 11 (8), pp 333-8.
- Fujino, Y., Nagahama, T., Oumi, T., Ukena, K., Morishita, F., Furukawa, Y., Matsushima, O., Ando, M., Takahama, H., Satake, H., Minakata, H., Nomoto, K. (1999). Possible functions of oxytocin/vasopressin-superfamily peptides in annelids with special reference to reproduction and osmoregulation. *J. Exp. Zool.*, 284, pp 401-6.
- Fukuzawa, A., Watanabe, T.X., Itahara, Y., Nakajima, K., Yoshizawa-Kumagaye, K., Takei, Y. (1996). B-type natriuretic peptide isolated from frog cardiac ventricles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, pp 323-9.
- Gerstberger, R., Gray, D.A., Simon E. (1984). Circulatory and osmoregulatory effects of angiotensin II perfusion of the third ventricle in a bird with salt glands. *J. Physiol.* 349, pp 167-82.
- Gonzalez GC, Roger I, Gonzalez E, Martinez-Padron M, Moore GJ, Lukowiak K. (1995). Angiotensinogen-like epitopes are present in the CNS of *Aplysia californica* and co-localize with urotensin I- and urotensin II-like immunoreactivities in the cerebral ganglia. *Neurorep.* 15; pp 541-4.
- Gray, D.A., Gerstberger, R., Simoon, E. (1989). Role of angiotensin II in aldosterone regulation in the Pekin duck. *J. Endocrinol.* 123, pp 445-52.
- Hagiwara, H., Hirose, S., Takei, Y. (1995). Natriuretic peptides and their receptors. *Zool. Sci.* 12 (2), pp 141-9.
- Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Peterson, E.P., Wang, S.L., Vernooy, S.Y., Hay, B.A. (2000). The *drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID and GRIM. *J. Biol. Chem.* 275, pp 27084-93.
- Hillyard, S.D., Hoff, K.S., Propper, C. (1998). The water absorption response : a behavioural assay for physiological processes in terrestrial amphibians. *Physiol. Zool.* 71, pp 127-138.
- Hirano, T., Takei, Y., Kobayashi, H. (1978). Angiotensin and drinking in the eel and the frog. Osmotic and volume regulation (Jorgensen, C.B., Skadhauge, E., eds.), Copenhagen, pp 123-8.
- Hoff, K.S., Hillyard, S.D. (1991). Angiotensin II stimulates cutaneous drinking in the toad, *Bufo punctatus*. *Physiol. Zool.* 64, pp 1165-72.
- Holtz, H. (1938). *Proclepsis tessellata* (O.F. Müller) Ein Beitrag zur Kenntnis von bau und Lebensweise der Hirudineen. *Rev. Suisse Zool.* 45, pp 1-380.
- Houard, X., Williams, T.A., Michaud, A., Dani, P., Isaac, R.E., Shirras, A.D., Coates, D., Corvol, P. (1998). The *Drosophila melanogaster*-related angiotensin I-converting enzymes Acer and Ance—distinct enzymic characteristics and alternative expression during pupal development. *Eur. J. Biochem.* 257, pp 599-606.
- Isaac, R.E., Schoofs, L., Williams, T.A., Veelaert, D., Sajid, M., Corvol, P., Coates, D. (1998). A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme): the hydrolysis of lysyl-arginine and arginyl-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide. *Biochem. J.* 330, pp 61-5.

- Isaac, R.E., Siviter, R.R.R.J., Stacombe, P., Coates, D., Shirras, A.D. (2000). Conserved roles for peptidases in the processing of invertebrate neuropeptides. *Biochem. Soc. Trans.* 28 (4), pp 460-4.
- Januszewicz, P. (1992). Interactions between atrial natriuretic factor and vasopressin. *Mater Med. Pol.* 24 (4), pp 233-6.
- Jaspard, E., Wei, L., Alhenc-Gelas, F. (1993). 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, pp 9496-503.
- Jorgensen, C.B. (1997). Urea and amphibian water economy. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, 117(2), pp 161-70.
- Kaiya, H., Takei, Y. (1996). Osmotic and volaemic regulation of atrial and ventricular natriuretic peptide secretion in conscious eels. *J. Endocrinol.* 149, pp 441-7.
- Kajstura, J., Cigola, E., Malhotra, A., Li, P., Cheng, W., Meggs, L.G., Anversa, P. (1997). Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes *in vitro*. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, pp 859-70.
- Kamm, O., Aldrich, T.B., Grote, I.W., Rowe, L.W., Brugbee, E. (1928). *J. Am. Chem. Soc.*, 50, pp 573-601.
- Kato, H., Suzuki, T. (1970). Structure of bradykinin-potentiating peptide containing tryptophan from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *Experientia* 26(11), pp 1205-6.
- Kawamura, T., Kiruno, K., Oda, T., Muramatsu, T. (2000). Some molecular and inhibitory specifications of a dipeptidyl carboxypeptidase from the polychaete *Neanthes virens* resembling angiotensin converting enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, pp 2193-200.
- Kenny AJ, Ingram J. (1987). Proteins of the kidney microvillar membrane. Purification and properties of the phosphoramidon-insensitive endopeptidase ('endopeptidase-2') from rat kidney. *Biochem J.* 245, pp 515-24.
- Klotz, I.M., Klippenstein, G.L., Hendrickson, W.A., 1976. Hemerythrin : alternative oxygen carrier. *Science*, 192, 335-44.
- Kobayashi, H. (1981). Angiotensin-induced drinking in parrots. *Gen. Comp. Endocrinol.* 43, pp 399-401.
- Kobayashi, H., Takei, Y. (1996). *The renin-angiotensin system: Comparative aspects*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M., Mimura, T. (1988). Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, pp 332-7.
- Kohama, Y., Oka, H., Kayamori, Y., Tsujikawa, K., Mimura, T., Nagase, Y., Satake, M. (1991). Potent synthetic analogues of Angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *Agric. Biol. Chem.* 55, pp 2269-70.
- Kojima, M., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. (1990). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a precursor for rat C-type natriuretic peptide (CNP). *FEBS Lett.* 276 (1-2), pp 209-13.
- Kojima, M., Ohyama, Y., Miyamoto, K., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. (1994). Cloning and characterisation of a novel natriuretic peptide in frog (*Rana catesbeiana*). 269 (18), pp 13136-40.
- Krege, J.H., John, S.W.M., Langenbach, L.L., Hodgin, J.B., Hagaman, J.R., Backman, E.S., Jennette, J.C., O'Brien, D.A., Smithies, O. (1995). Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375, pp 146-8.
- Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R., (1979). Effect of dehydration through desiccation on brain neurosecretory cells of the freshwater Indian leech *Poecilobdella viridis* (Blanchard). *J. An. Morphol. Physiol.* 26, pp 121-5.
- Kurtz, A., Della Bruna, R., Pfeilschifter, J., Taugner, R., Bauer, C. (1986). Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP mediated process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, pp 4769-73.

- Lamango, N.S., Sajid, M., Isaac, R.E. (1996). The endopeptidase activity and the activation by Cl<sup>-</sup> of angiotensin-converting enzyme is evolutionarily conserved: purification and properties of an angiotensin-converting enzyme from the housefly, *Musca domestica*. *Biochem. J.* 314, pp 639-46.
- Lamango, N.S., Nachman, R.J., Hayes, T.K., Strey, A., Isaac, R.E. (1997). Hydrolysis of insect neuropeptides by an angiotensin-converting enzyme from the housefly, *Musca domestica*. *Peptides* 18, pp 47-52.
- Lane, T.F., Sower, S.A., Kawauchi, H. (1988). Arginine vasotocin from the pituitary gland of the lamprey (*Petromyzon marinus*): isolation and amino acid sequence. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 70(1), pp 152-7.
- Langford, K.G., Shai, S.-Y., Howard, T.E., Kovac, M.J., Overbeek, P.A., Bernstein, K.E. (1991). Transgenic mice demonstrate a testis specific promoter for angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 266, 15559-62.
- Laurent, V., Salzet, M. (1995a). Isolation of a renin-like enzyme from the Leech *Theromyzon tessulatum*. *Peptides* 16 (8), pp 1351-8.
- Laurent, V., Salzet, M. (1995b). A comparison of the N-terminal sequence of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin converting-like enzyme with the forms of vertebrate angiotensin converting enzymes. *Neurosci. Lett.* 198, pp 60-4.
- Laurent, V., Salzet, M. (1996). Biochemical properties of the angiotensin converting enzyme from the Leech *Theromyzon tessulatum*. *Peptides* 17, pp 737-45.
- Laurent, V., Stefano, G., Salzet, M. (1997). Presence and biochemical properties of a molluscan invertebrate angiotensin converting enzyme. *Regul. peptides* 69, pp 53-61.
- Levin, E.R., Hu, R.M., Rossi, M., Pickart, M. (1992). Arginine vasopressin stimulates atrial natriuretic peptide gene expression and secretion from rat diencephalic neurons. *Endocrinol.* 13 (3), pp 1417-23.
- Maack, T., Kleinert, H.D. (1986). Renal and cardiovascular effects of atrial natriuretic factor. *Biochem. Pharmacol.* 35 (13), pp 2057-64.
- Malecha, J. (1979). Mise en évidence du système nerveux central sur les échanges d'eau chez l'hirudinée rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 288, pp 693-6.
- Malecha, J. (1983). L'osmorégulation chez l'hirudinée rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). Localisation expérimentale de la zone sécrétrice d'un facteur de régulation de la balance hydrique. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 49, pp 344-51.
- Malecha, J., Verger-Bocquet, M., Leprêtre, A., Tramu, G. (1989). Mise en évidence d'une action des anticorps anti-ocytocine sur les échanges d'eau chez la sangsue, *Theromyzon tessulatum*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 309, pp 127-30.
- Matsumura N., Fuji M., Takeda Y., Shimizu T. (1993). Isolation and characterisation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci Biotechnol Biochem* 57(10):1743-4.
- McMaster, D., Kobayashi, Y., Lederis, K. (1992). A vasotocin-like peptide in *Aplysia kurodai* ganglia: HPLC and RIA evidence for its identity with Lys-conopressin G. *Peptides* 13, pp 413-21.
- Meki, A.R., Nassar, A.Y. and Rochat, H. (1995). A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus* *Peptides* 16 (8), pp 1359-65.
- Moore, G.J., Thornhill, J.A., Gill, V., Lederis, K., Lukowiak, K. (1981). An arginine vasotocin-like neuropeptide is present in the nervous system of the marine mollusc *Aplysia California*. *Brain Res.* 206, pp 213-18.
- Michel, G., Chauvet, J., Chauvet, M.T., Clarke, C., Bern, H., Acher, R. (1993). Chemical identification of the mammalian oxytocin in a Holocephalian fish, the ratfish (*Hydrolagus colliei*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 92, pp 260-8.
- Minamino N, Kangawa K, Matsuo H (1988). Isolation and identification of a high molecular weight brain natriuretic peptide in porcine cardiac atrium. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 157, pp 402-9.

- Misono, K.S., Fukumi, H., Grammer, R.T., Inagami, T. (1984). Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119 (2), pp 524-9.
- Miyata, A., Minamino, K., Kangawa, K., Matsuo, H. (1988). Identification of a 29-amino acid natriuretic peptide in chicken heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155(3), pp 1330-7
- Nakao, K., Itoh, H., Kambayashi, Y., Hosoda, K., Saito, Y., Yamada, T., Mukoyama, M., Arai, H., Shirakami, G., Suga, S., Ogawa, Y., Jougasaki, M., Inouye, K., Imura, H. (1989). Rat brain natriuretic peptide. Isolation from rat heart and tissue distribution. *Hypertension* 15 (6pt2), pp 774-8.
- Needleman, T., Adams, S.P., Cole, B.R., Currie, M.G., Geller, D.M., Michener, M.L., Saper, C.B., Schwartz, D., Standaert, D.G. (1985). *Hypertension* 7 (4), pp 469-82.
- Nielsen, D.B., Dykert, J., Rivier, J.E., McInstosh, J.M. (1994). Isolation of Lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail, *Conus imperialis*. *Toxicon.* 32, pp 845-8.
- Okawara, Y., Karakida, T., Aihara, M., Yamaguchi, K., Kobayashi, H. (1987). Involvement of angiotensin II in water intake in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Zool. Sci.* 4, pp 523-8.
- Olson, K.R. (1993). Blood and extracellular fluid volume regulation: Role of the renin-angiotensin system, kallikrein-kinin system and atrial natriuretic peptides. *Fish physiol.* Vol. XIIB (Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P., eds.), San Diego, Academic press inc., pp 136-232.
- Ogawa, Y., Nakao, K., Mukoyama, M., Hosoda, K., Shirakami, G., Arai, H., Saito, Y., Jougasaki, M., Imura, H. (1991). Natriuretic peptides as cardiac hormones in normotensive and spontaneous hypertensive rats. The ventricle is a major site of synthesis and secretion of brain natriuretic peptide. *Circ. Res.* 69 (2), pp 491-500.
- Oppong, S.Y., Hooper, N.M. (1993). Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. *Biochem. J.* 292, pp 597-603.
- Oumi, T., Ukena, K., Matsushima, O., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H., Nomoto, K. (1994). Annetocin: an oxytocin-related peptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 198, pp 393-9.
- Oumi, T., Ukena, K., Matsushima, O., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H., Nomoto, K. (1996). Annetocin, an annelid oxytocin-related peptide, induces egg-laying behaviour in the earthworm, *Eisenia foetida*. *J. Exp. Zool.*, 276, pp 151-6.
- Page, I.H., Helmer, O.M. (1940). A crystalline pressor substance (angiotensin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J. Exp. Med.* 771, pp 29-42.
- Pang, P.K., Sawyer, W.H. (1978). Renal and vascular responses of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) to mesotocin. *Am. J. Physiol.* 235(2), pp 151-5.
- Phillips, M.I., Summers, C. (1998). Angiotensin II in central nervous system physiology. *Reg. Pep.* 78, pp 1-11.
- Picquot, M., Proux, J. (1990). Biosynthesis and degradation of the arginine-vasopressin-like insect diuretic hormone, a neurohormone in the migratory locust. *Regul. Pept.*, 31, pp 139-56.
- Pierzchalski, P., Reiss, K., Cheng, W., Cirielli, C., Kajstura, J., Nitahara, J.A., Rizk, M., Capogri, M.C., Anversa, P. (1997). P53 induces myocyte apoptosis via the activation of the renin-angiotensin system. *Exp. Cell Res.*, 234, pp 57-65.
- Politi, V., de Luca, G., di Stazio, G., Shinina, E., Bossa, F. (1985). A new peptide from *Crotalus atrox* snake venom. *Peptides* 6, pp 343-6.
- Proux, J.P., Miller, C.A., Li, J.P., Carney, R.L., Girardie, A., Delaage, M., Schooley, D.A. (1987). Identification of an arginine vasopressin-like diuretic hormone from *Locusta migratoria*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 149 (1), pp 180-6.

- Proux, J.P., Picquot, M., Herault, J.P., Fournier, B. (1988). Diuretic activity of a newly identified neuropeptide – the arginine-vasopressin-like insect diuretic hormone : use of an improved bioassay. *J. Insect Physiol.* 34, pp 919-27.
- Quang, G., Mita, K., Okano, K., Shimada, T., Nanako, U., Xia, Z., Goto, N., Kanke, E., Kkawasaki, H. (2001). Isolation and expression of the ecdysteroid-inducible angiotensin-converting enzyme related gene in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, pp 97-103.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290, pp 205-18.
- Reed GW, Olson GA, Olson RD. (1994). The Tyr-MIF-1 family of peptides. *Neurosci Biobehav Rev* 18, pp 519-25.
- Reich, G. (1992). A new peptide of the oxytocin/vasopressin family isolated from nerves of the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Neurosci. Lett.* 134, pp 191-4.
- Richter, D. (1983). Synthesis, processing and gene structure of vasopressin and oxytocin. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 30, pp 245-66.
- Rosca, D.I., Wittenberger, C., Rusdea (1958). Comportarea la variatii de salinitate. XLV. Cercetari asupra osmoreglarii si a rolului sistemului nervos in fenomenele de osmoreglare la *Hirudo medicinalis*. *Stud. Cercet. Biol. Ser. Zool.* 9, pp 113-36.
- Rosenzweig, A., Seidman, C.E. (1992). Atrial natriuretic factor and peptide hormones. *Ann. Rev. Biochem.* 60, pp 229-55.
- Roks, A.J.M., van Geel, P.P., Pinto, Y.M., Buikema, H., Henning, R.H., de Zeeuw, D., van Gilst, W.H. (1999). Angiotensin (1-7) is a modulator of the human Renin-Angiotensin system. *Hypertension* 34, pp 296-301.
- Rouillé, Y., Michel, G., Chauvet, M.T., Chauvet, J., Acher, R. (1989). Hydrins, hydroosmotic neurohypophysial peptides : osmoregulatory adaptation in amphibians through vasotocin precursor processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(14), pp 5272-5.
- Salzet, M., Bulet, P., Van Dorsselaert, A., Malecha, J. (1993a). Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the nervous system of the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. *J. Biochem.* 217, pp 897-903.
- Salzet, M., Watzet, C., Baert, J.L., Malecha, J. (1993b). Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the rhynchobdellid Leech *Theromyzon tessulatum*. *Brain Res.* 631, pp 247-55.
- Salzet, M., Bulet, P., Watzet, C., Malecha, J. (1994). FMRFamide-related peptides in the sex segmental ganglia of the Pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. *Eur. J. Biochem.* 221, pp 269-75.
- Salzet, M., Bulet, P., Watzet, C., Verger-Bocquet, M., Malecha, J. (1995). Structural characterisation of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*: angiotensin II-amide. *J. Biol. Chem.* 270 (4), pp 1575-82.
- Salzet, M., Bulet, P., Weber, W.-M., Clauss, W., Verger-Bocquet, M., Malecha, J. (1996a). Structural characterization of a novel neuropeptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*. *J. Biol. Chem.* 271 (12), pp 7237-43.
- Salzet, M., Vandenbulcke, F., Verger-Bocquet, M. (1996b). Structural characterisation of osmoregulator peptides from the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*: IPEPYVWD and IPEPYVWD-amide. *Mol. Brain Res.* 43, pp 301-10.
- Salzet, M., Stefano, G.B. (1997). A renin-like enzyme in the Leech *Theromyzon tessulatum*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 131 (1), pp 1-8.
- Samson, W.K., Skala, K.D., Huang, F.L. (1991). CNP-22 stimulates rather than inhibits water drinking in the rat: evidence for a unique biological action of the C-type natriuretic peptides. *Brain Res.* 568, pp 285-8.

- Sataka, J., Kangawa, K., Matsuo, H. (1988). Identification of new atrial natriuretic peptides in frog heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 (3), pp 1338-45.
- Seidman, C.E., Bloch, K.D., Zisfein, J., Smit, J., Haber, E., Homcy, C.J., Duby, A.D., Choi, E., Graham, R.M., Seidman, J.G. (1985). Molecular studies of the atrial natriuretic factor gene. *Hypertension* 7, pp 31-4.
- Shimada, K., Neldon, H.L., Koike, T.I. (1991). Effects of saline infusion on plasma levels of vasotocin (AVT) and mesotocin in laying hens (*Gallus domesticus*). *Jpn Poult. Sci.* 28, pp 214-9.
- Silva, P., Stoff, J.S., Solomon, R.J., Lear, D., Kniaz, D., Greger, R., Epstein, F.H. (1987). Atrial natriuretic peptide stimulates salt secretion by shark rectal gland by releasing VIP. *Am. J. Physiol.* 252, pp 99-103.
- Skeggs, L.L., Kahn, J.R. Shumway, N.P. (1956). Preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 103, pp 295-9.
- Skidgel, R.A., Engelbrecht, S., Johnson, A.R., Erdos, E.G (1984). Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 5, pp 769-76.
- Skidgel, R.A., Erdos, E.G. (1985). Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH<sub>2</sub> and COOH-terminal tripeptides from three luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, pp 1025-6.
- Sokade, H., Oide, H., Ogawa, M., Utida, S. (1973). Plasma renin activity in Japanese eels (*Anguilla japonica*) adapted to seawater or dehydration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21, pp 160-67.
- Stingo, H.J., Clavell, A.L., Aarhus, L.L., Burnett, J.C. (1992). Cardiovascular and renal actions of C-type natriuretic peptide. *Am. J. Phys.* 262, pp 308-12.
- Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H. (1988a). A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332, pp 78-81.
- Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. (1988b). Brain natriuretic peptide-32: N-terminal six amino acid extend form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain. *Biochem. Biophys., Res. Commun.* 155 (2), pp 726-32.
- Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. (1990). C-type natriuretic peptide (CNP) : a member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, pp 863-70.
- Suga, S., Nakao, K., Itoh, H., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Hama, N., Imura, H. (1992). Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-. *J. Clin. Invest.* 90, pp 1145 - 9.
- Takahashi, T., Kawashima, M., Yasuoka, T., Kamiyoshi, M., Tanaka, K. (1995). Diuretic and antidiuretic effects of Mesotocin as compared with the antidiuretic effect of arginine vasotocin in the hen. *Poult. Sci.* 74, pp 890-2.
- Takei, Y. (2000). Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation. *Jpn J. Physiol.* 50, pp 171-86.
- Takei, Y., Balment, R.J. (1993). Natriuretic factors in nonmammalian vertebrate. « New insight in Vertebrate kidney function » édité par Brown, Balment et Rankin, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp 351-85.
- Takei, Y., Okawara, Y., Kobayashi, H. (1988). Water intake induced by water deprivation in the quail, *Coturnix coturnix japonica*. *J. Comp. Physiol. B* 158, pp 519-25.
- Takei, Y., Takahashi, A., Watanabe, T.X., Nakajima, K., Sakakibara, S. (1989). Amino acid sequence and relative biological activity of eel atrial natriuretic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (1), pp 537-43.
- Takei, Y., Takahashi, A., Watanabe, T.X., Nakajima, K., Sakakibara, S. (1991). A novel natriuretic peptide isolated from eel cardiac ventricles. *FEBS Lett.* 282, pp 317-20.

- Takei, Y., Tsuchida, T. (2000). Role of the renin-angiotensin system in drinking of seawater-adapted eels *Anguilla japonica*: a reevaluation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, pp 1105-11.
- Tatei, K., Cai, H., Ip, Y.T., Levine, M. (1995). Race: a *Drosophila* homologue of the angiotensin-converting enzyme. *Mech. Dev.* 51, pp 157-68.
- Taylor, C.A.M., Coates, D., Shirras, A.D. (1996) The *Acer* gene of *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. *Gene* 181, pp 191-7.
- Tiegerstedt, R., Bergman, P.G. (1898). Niere und kreislauf. *Skand arch physiol.* 8, pp 223-31.
- Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A.J. (2000). A human homolog of angiotensin converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275, pp 33238-43.
- Yang, H.Y.T., Erdos, E.G., Levin, Y. (1970). A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochem. Biophys. Acta* 214, pp 374-6.
- Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, V., Ross, G.T. (1971). A method for producing antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33, pp 988-91.
- Vandenbulcke F, Laurent V, Verger-Bocquet M, Stefano GB, Salzet M. (1997). Biochemical identification and ganglionic localisation of leech angiotensin-converting enzymes. *Mol Brain Res.* 49, pp 229-37.
- Van der Lande, V.M. (1983). Observations on the growth and development of the duck leech, *Theromyzon tessulatum* (Hirudinea: Glossiphoniidea), as a function of feeding. *J. Zool.*, 201, pp 377-93.
- Van Kesteren, R.E., Smit, A.B., Dirks, R.W., De Wilh, N.D., Geraerts, W.P.M., Joosse, J. (1992). Evolution of the vasopressin/Oxytocin superfamily: characterization of a cDNA encoding a vasopressin-related precursor, preprocompressin, from the mollusc, *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, pp 4593-7.
- Verger-Bocquet, M., Malecha, J., Watzet, C., Tramu, G. (1988). Immunohistochemical localization of peptidergic neurons in the supraoesophageal ganglion of the leech *Theromyzon tessulatum*. *Comp. Endocrinol.* 7, pp 21-7.
- Van Kersteren, R.E., Smith, A.B., de Lange, R.P.J., Kits, K.S., Van Golen, F.A., Van der Schors, R.C., de With, N.D., Burke, J.F., Geraerts, W.P.M. (1995). Structural and functional evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: vasopressin-related conopressin is the only member present in *Lymnaea* and is involved in the control of sexual behaviour. *J. Neurosci.* 15, pp 5989-98.
- Weber, K.T., Swamynathan, S.K., Guntaka, R.V., Sun, Y. (1999). Angiotensin II and extracellular matrix homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, pp 395-403.
- Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., Clauser, E. (1991). The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J. Biol. Chem.* 266, pp 9002-8.
- Welches, W.R., Brosnihan, K.B., Ferrario, C.M. (1993). A comparison of the properties and enzymatic activity of three angiotensin processing enzymes: Angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life sci.* 52, pp 1461-80.
- Wheeler-Schilling, T.H., Sautter, M., Guenther, E., Kolher, K. (2001). Expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) in the developing chicken retina. *Exp. Eye Res.* 72, pp 173-82.
- Wijffels, G., Fitzgerald, C., Gough, J., Riding, G., Elvin, CC., Kemp, D., Willadsen, P. (1996). Cloning and characterisation of angiotensin-converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproduction system. *Eur. J. Biochem.* 237, pp 414-23.
- Wijffels, G., Gough, J., Muharsini, S., Donaldson, A., Eisemman, C. (1997). Expression of angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidases in the larvae of four species of fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, pp 451-60.
- Wilkielis, J. (1970). Investigations on the biology of leeches of the Glossiphoniidae family. *Zool. Pol.*, 20, pp 29-57.

Wilkialis, J., Davies, R.W. (1980). The reproductive biology of *Theromyzon tessulatum* (Glossiphoniidae; Hirudinoidea), with comments on *Theromyzon rude*. J. Zool. London, 192, pp 421-9.

Williams, G.H., Chao, J., Chao, L. (1997). Kidney hormones. The Kallikein-Kinin and Renin-Angiotensin Systems. Endocrinology: Basic and clinical Principles. Part V / Diseases and systems (Conn et Melmed, eds) Humana press inc., pp 393-404.

Woodmann Z.L., Oppong S.Y., Cook S., Hooper N.M., Schwager S.L., Brandt W.F., Ehlers M.R., Sturrock E.D. (2000). Shedding of somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) is inefficient compared with testis ACE despite cleavage at identical stalk sites. Biochem. J. 347, pp 711-8.

Zini, S., Fournie-Zaluski, M.C., Chauvel, E., Roques, B.P., Corvol, P., Llorens-Cortes, C. (1996). Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors : Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, pp 11968-73.

# ANNEXES

**Codes à 3 lettres et à 1 lettre 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
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

---

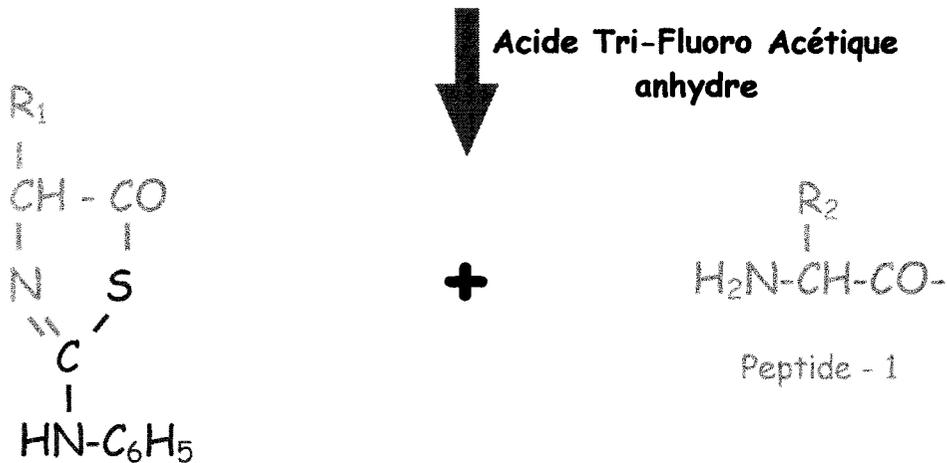
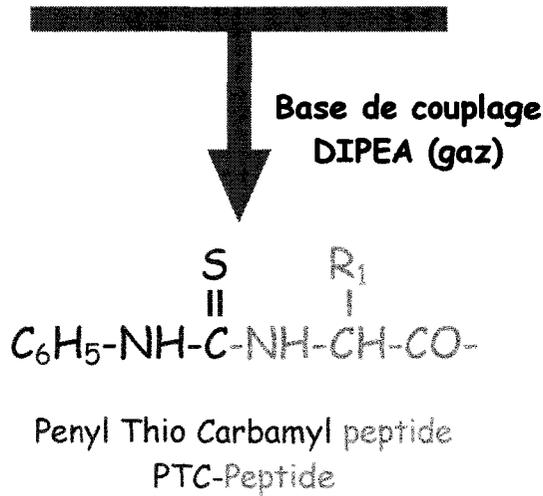
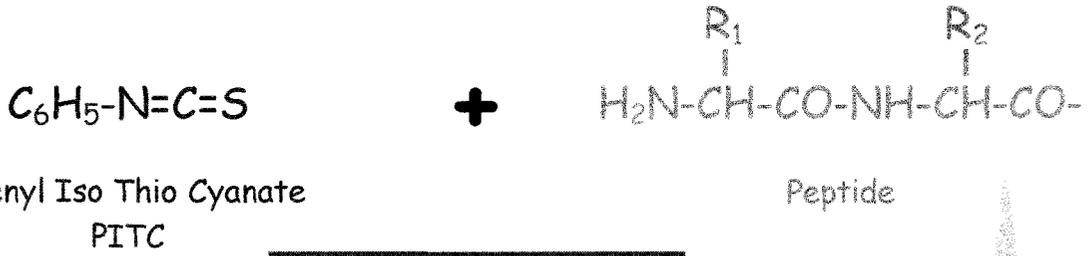
**Préparation de tampon Sodium Phosphate 0,1M (25°C)**

pH	Volume de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M (ml)	Volume de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M (ml)
5,8	7,9	92,1
6,0	12,0	88,0
6,2	17,8	82,2
6,4	25,5	74,5
6,6	35,2	64,8
6,8	46,3	53,7
7,0	57,7	42,3
7,2	68,4	31,6
7,4	77,4	22,6
7,6	84,5	15,5
7,8	89,6	10,4
8,0	93,2	6,8

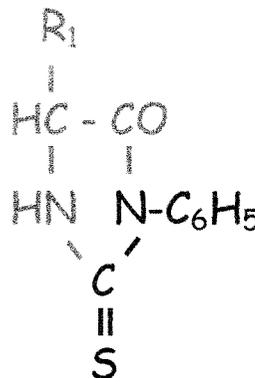
---

# Dégradation d'Edman

Séquence protéique



2-Anilino 5-Thiazolinone - AA  
ATZ - AA



Phenyl Thio Hydantoin - AA  
PTH - AA

