



HAL
open science

Identification d'inhibiteurs physiologiques de métallo-ectopeptidases impliquées dans la réponse nociceptive

Mouna Mahbouli

► **To cite this version:**

Mouna Mahbouli. Identification d'inhibiteurs physiologiques de métallo-ectopeptidases impliquées dans la réponse nociceptive. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066701 . tel-01378389

HAL Id: tel-01378389

<https://theses.hal.science/tel-01378389>

Submitted on 10 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de doctorat

Présentée à

L'Université Pierre et Marie Curie

ÉCOLE DOCTORALE Complexité Du Vivant (ED 515 ; CDV)

Par **Mouna MAHBOULI**

Pour obtenir **LE GRADE DE DOCTEUR**

SPECIALITE : Biochimie et biologie moléculaire

Identification d'inhibiteurs physiologiques de métallo- ectopeptidases impliquées dans la réponse nociceptive

Directeurs de thèse :

Mr Thierry FOULON, Professeur

Directeur de thèse

Mme Marie-Sandrine CADEL, Docteur

Directrice de thèse

Devant la commission d'examen formée de :

Mr Frédéric DUCANCEL, Docteur

Rapporteur

Mr Philippe HOLZMULLER, Docteur

Rapporteur

Mme Catherine ROUGEOT, Docteur

Examineur

Mr Olivier LEQUIN, Professeur

Examineur

Mme Sarah BONNET, Docteur

Examineur

Mr Thierry FOULON, Professeur

Directeur de thèse

Date de soutenance prévue le 24 Septembre 2015



Thèse de doctorat

Présentée à

L'Université Pierre et Marie Curie

ÉCOLE DOCTORALE Complexité Du Vivant (ED 515 ; CDV)

Par **Mouna MAHBOULI**

Pour obtenir LE GRADE DE DOCTEUR

SPECIALITE : Biochimie et biologie moléculaire

Identification d'inhibiteurs physiologiques de métallo- ectopeptidases impliquées dans la réponse nociceptive

Directeurs de thèse :

Mr Thierry FOULON, Professeur
Mme Marie-Sandrine CADEL, Docteur

Directeur de thèse
Directrice de thèse

Devant la commission d'examen formée de :

Mr Frédéric DUCANCEL, Docteur
Mr Philippe HOLZMULLER, Docteur
Mme Catherine ROUGEOT, Docteur
Mr Olivier LEQUIN, Professeur
Mme Sarah BONNET, Docteur
Mr Thierry FOULON, Professeur

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Date de soutenance prévue le 24 Septembre 2015

Sommaire

Liste des abréviations	p. 5
Liste des figures	p. 6
Liste des tableaux	p. 8
Introduction	p. 9
I. Les enképhalines	p. 10
II. Le système opioïde endogène	p. 13
1. Généralités	p. 13
2. Distribution et rôles	p. 14
3. Peptides - Récepteurs opioïdes et affinité	p. 16
III. La famille M1 : les aminopeptidases à zinc essentiel à la catalyse	p. 17
IV. Aminopeptidase N et Endopeptidase neutre	p. 20
1. NEP	p. 21
1.1. Généralités	p. 21
1.2. Mécanisme enzymatique et spécificité du substrat	p. 22
2. L'aminopeptidase N	p. 23
2.1. Généralités	p. 23
2.2. L'Aminopeptidase N [EC.3.4.11.2]	p. 25
2.3. Mécanisme enzymatique et spécificité du substrat	p. 26
V. L'Aminopeptidase B	p. 29
VI. L'opiorphine et la sialorphine	p. 30
1. Découverte de la sialorphine et de l'opiorphine	p. 30
2. Mécanisme d'action chez les mammifères	p. 32
3. Analyse structure fonction de l'opiorphine	p. 34
VII. Les tiques	p. 38
1. Généralités	p. 38
2. Taxonomie et morphologie	p. 39
3. Distribution géographique	p. 40
4. Cycle biologique	p. 41
4.1. Types de cycles : nombre et nature des hôtes	p. 41
4.2. Exemple de <i>Ixodes ricinus</i>	p. 43
4.2.1. Généralités	p. 43
4.2.2. Pathogènes transmis par <i>Ixodes ricinus</i>	p. 45
4.3. Exemple d' <i>Amblyomma variegatum</i>	p. 47
4.3.1. Généralités	p. 47
4.3.2. Pathogènes transmis par <i>Amblyomma variegatum</i>	p. 48

Objectifs du travail de la thèse	p. 49
Matériels et Méthodes	p. 52
1. Collecte des tiques <i>Ixodes ricinus</i>	p. 53
2. Elevage	p. 53
3. Repas sanguin artificiel et dissection	p. 54
4. Extraction des peptides	p. 54
5. Fractionnement de l'extrait par HPLC en phase inverse (RP-HPLC)	p. 55
6. Electrophorèse capillaire microfluidique	p. 55
7. Recherche d'homologues de l'opiorphine et de la sialorphine <i>in silico</i>	p. 55
8. Synthèse peptidique en phase solide des analogues de l'opiorphine et de la sialorphine	p. 55
9. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF	p. 56
10. Tests enzymatiques	p. 56
10.1. Substrats utilisés	p. 56
10.2. Tests d'activité enzymatique	p. 58
10.3. Détermination des paramètres cinétiques	p. 58
Résultats	p. 60
I. <i>Ixodes ricinus</i>	p. 61
1. Identification d'homologues fonctionnels de l'opiorphine/sialorphine chez la tique <i>Ixodes ricinus</i>	p. 61
2. Analyse par RP-HPLC du contenu peptidique d'extraits de glandes salivaires d' <i>Ixodes ricinus</i>	p. 61
3. Analyse par spectrométrie de masse du contenu peptidique d'extraits de glandes salivaires d' <i>Ixodes ricinus</i>	p. 61
4. Tests des activités inhibitrices de l'APN et la NEP par l'extrait de glandes salivaires d' <i>I. ricinus</i>	p. 64
5. <i>Amblyomma variegatum</i>	p. 65
II. Recherche d'homologues de l'opiorphine et de la sialorphine <i>in silico</i>	p. 68
III. Analyse des propriétés inhibitrices des homologues « opiorphine/sialorphine »	p. 71
Conclusion - Discussion	p. 78
Autres travaux	p. 85
I. Produits naturels et activité de l'Ap-B	p. 86
II. Matériels et méthodes	p. 87
1. Provenance des agents chimiques	p. 87
2. Synthèse et purification de peptides	p. 87
3. Aminopeptidase B : expression et sécrétion dans le milieu de culture Sf9	p. 88

4. Tests enzymatiques de l'Ap-B vis-à-vis de l'Arg-AMC et tests d'inhibition <i>in vitro</i> de l'Ap-B avec différentes molécules naturelles	p. 88
5. Analyse cinétique de l'inhibition de l'activité Ap-B	p. 89
6. Test de l'activité Ap-B sur le peptide Arg ₀ -Leu ₅ -enképhaline	p. 89
7. Analyse en spectrométrie de masse	p. 89
8. Analyse du positionnement du resvératrol dans le modèle de la structure 3D de l'Ap-B.	p. 90
III. Résultats	p. 90
1. Détermination des paramètres cinétiques de l'Ap-B vis-à-vis du substrat Arg-AMC	p. 90
2. Effet de différentes molécules naturelles sur l'activité Ap-B	p. 91
2.1 Tests effectués avec la curcumine	p. 92
2.2 Tests effectués avec la mangiférine	p. 96
2.3 Autres molécules testées.	p. 97
IV. Conclusion-Discussion	p. 97
Bibliographie	p. 102
Résumé	p. 114

Liste des abréviations

- Ap-A** : aminopeptidase acide
Ap-B : aminopeptidase basique
h-APN : aminopeptidase neutre humaine
Ap-O : aminopeptidase O
Ap-Q : aminopeptidase Q
AMC : 7-amino-4-méthyl-coumarine
ColAP : « Cold-active » Aminopeptidase de *Colwellia psychrerythraea*
ERAP1 : aminopeptidase 1 du réticulum endoplasmique
ERAP2 : aminopeptidase 2 du réticulum endoplasmique
IRAP : aminopeptidase régulée par l'insuline
LE : Leu₅-enképhaline
LTA4H : leucotriène A4 hydrolase humaine
LTA4H76 : leucotriène A4 hydrolase de *Saccharomyces cerevisiae*
h-NEP : néprilysine humaine ou endopeptidase neutre
PENK : préproenképhaline
PepN : aminopeptidase N d'*Escherichia coli*
PfA-M1 : M1 alanyl-Aminopeptidaseneutre de *Plasmodium falciparum*
PSA : aminopeptidase sensible à la puromycine
RLE : Arg₀-Leu₅-enképhaline
TIFF3 : Tricorn Interacting Factor F3 » de *Thermoplasma acidophilum*
TLN : thermolysine
TRH : enzyme de dégradation de l'hormone relarguant la thyrotropine

Liste des figures

<i>Figure 1 : Les enképhalines endogènes (Met-enképhaline et Leu- enképhaline) se lient aux récepteurs opioïdes μ (MOR) et δ (DOR).</i>	<i>p. 11</i>
<i>Figure 2 : Les enképhalines sont synthétisées après maturation post-traductionnelle du précurseur préproenképhaline (PENK).</i>	<i>p. 11</i>
<i>Figure 3 : Voie de signalisation d'opioïdes.</i>	<i>p. 13</i>
<i>Figure 4 : Distribution anatomique des récepteurs opioïdes.</i>	<i>p. 15</i>
<i>Figure 5 : Identification d'homologues structuraux à l'aide du logiciel HHpred78.</i>	<i>p. 18</i>
<i>Figure 6 : Structure tridimensionnelle de métallo-aminopeptidases de la famille M1 et de la thermolysine.</i>	<i>p. 19</i>
<i>Figure 7 : Alignement partiel des séquences primaires de la région catalytique des 12 métallo-aminopeptidases de la famille M1 chez les mammifères.</i>	<i>p. 20</i>
<i>Figure 8 : Alignement multiple de séquences de métallopeptidases de mammifère NEP, ECE, KELL et PEX.</i>	<i>p. 22</i>
<i>Figure 9 : Topologie en Ruban de la NEP complexée avec le phosphoramidon.</i>	<i>p. 24</i>
<i>Figure 10: La néprilysine (code RCSB PDB : 4CTH). Mode de liaison du phosphoramidon au site actif de l'enzyme.</i>	<i>p. 24</i>
<i>Figure 11 : Représentation schématique d'un substrat peptidique ou protéique au site actif d'une aminopeptidase.</i>	<i>p. 26</i>
<i>Figure 12 : Représentation du site actif de l'APN et des acides aminés essentiels à la catalyse.</i>	<i>p. 27</i>
<i>Figure 13 : Représentation de l'interface du dimère de l'APN.</i>	<i>p. 28</i>
<i>Figure 14 : Structure tridimensionnelle de l'APN.</i>	<i>p. 28</i>
<i>Figure 15 : Représentation du modèle structural de l'Ap-B, mode de liaison du resveratrol au site actif.</i>	<i>p. 30</i>
<i>Figure 16 : Représentation des structures 3D de la sialorphine (NH₂-QHNPR-COOH, à gauche) et de l'opiorphine (NH₂- QRFSR-COOH, à droite).</i>	<i>p. 31</i>
<i>Figure 17 : Structure du modèle de la [D-Phe3]-opiorphine.</i>	<i>p. 36</i>
<i>Figure 18 : (a) Représentation de la structure 3D de l'opiorphine bioactive pour l'inhibition de l'APN. (b): Représentation de la structure 3D de l'opiorphine bioactive pour l'inhibition de la NEP.</i>	<i>p. 37</i>
<i>Figure 19 : Classification des tiques.</i>	<i>p. 40</i>
<i>Figure 20 : Schéma de la morphologie générale distinctive du stade adulte des trois familles de tiques.</i>	<i>p. 41</i>
<i>Figure 21 : Répartition géographique des tiques I. ricinus.</i>	<i>p. 42</i>
<i>Figure 22 : Cycle De vie I. ricinus. De gauche à droite : larve, nymphe, adulte femelle, adulte mâle.</i>	<i>p. 44</i>
<i>Figure 23 : Cycle biologique I. ricinus.</i>	<i>p. 44</i>
<i>Figure 24 : Femelle d'I. ricinus non gorgée et gorgée.</i>	<i>p. 45</i>
<i>Figure 25 : adulte mâle d' Amblyomma variegatum.</i>	<i>p. 47</i>
<i>Figure 26 : Cycle biologique de la tique Amblyomma variegatum.</i>	<i>p. 48</i>
<i>Figure 27 : Représentation schématique des objectifs des objectifs de la thèse.</i>	<i>p. 50</i>
<i>Figure 28 : Technique de collecte des tiques exophiles à l'affût sur la végétation.</i>	<i>p. 53</i>

<i>Figure 29 : Dispositif expérimental utilisé pour l'élevage des tiques Ixodes ricinus.</i>	<i>p. 54</i>
<i>Figure 30 : Schéma du principe des tests d'activité enzymatique avec l'APN et son substrat L-Ala AMC</i>	<i>p. 57</i>
<i>Figure 31 : Schéma du principe des tests d'activité enzymatique avec la NEP et son substrat l'Abz-D-Arg-Gly-Leu-EDDnp.</i>	<i>p. 57</i>
<i>Figure 32 : Clivage du substrat H-Ala-AMC (7-Amido-4-methylcoumarin) par l'APN.</i>	<i>p. 59</i>
<i>Figure 33 : Chromatogramme RP-HPLC d'un extrait de glande salivaire d'I. ricinus pré-purifié sur Sep-Pak C18.</i>	<i>p. 62</i>
<i>Figure 34 : Chromatogramme correspondant à l'éluion, avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 60 %, de la sialorphine et de l'opiorphine (10 µg).</i>	<i>p. 62</i>
<i>Figure 35 : Spectre MALDI-TOF montrant la distribution isotopique de l'extrait pré-purifié de glandes salivaires d'I. ricinus et des fractions 60 % et 100 % ACN.</i>	<i>p. 63</i>
<i>Figure 36 : Schéma de plaque de la cinétique de fluorescence sur 15 min vis-à-vis de l'APN.</i>	<i>p. 65</i>
<i>Figure 37 : Effet inhibiteur des différentes fractions sur l'activité de l'APN.</i>	<i>p. 65</i>
<i>Figure 38 : SDS-PAGE en conditions dénaturantes de la salive d'Amblyomma variegatum.</i>	<i>p. 66</i>
<i>Figure 39 : Profil d'électrophorèse capillaire microfluidique de la salive brute.</i>	<i>p. 67</i>
<i>Figure 40 : Alignement des régions NH₂-terminales de l'opiorphine et de la sialorphine et de protéines similaires.</i>	<i>p. 69</i>
<i>Figure 41 : Alignement des régions NH₂-terminales de l'opiorphine et de la sialorphine et de protéines similaires d'arthropodes.</i>	<i>p. 71</i>
<i>Figure 42 : Histogrammes représentant l'IC₅₀ des peptides synthétiques vis-à-vis de l'APN.</i>	<i>p. 73</i>
<i>Figure 43 : Histogrammes représentant l'IC₅₀ des peptides synthétiques vis-à-vis de la NEP.</i>	<i>p. 74</i>
<i>Figure 44 : Exemple de l'activité du peptide O10 (QRGFR) en fonction du rapport V/V0.</i>	<i>p. 75</i>
<i>Figure 45 : Détermination des paramètres cinétiques de l'Ap-B vis-à-vis du substrat Arg-AMC.</i>	<i>p. 76</i>
<i>Figure 46 : Effet inhibiteur de la curcumine sur l'activité Ap-B.</i>	<i>p. 93</i>
<i>Figure 47 : Détermination du Ki de la curcumine vis-à-vis de l'activité Ap-B.</i>	<i>p. 94</i>
<i>Figure 48 : Profil HPLC montrant l'activité enzymatique de l'Ap-B vis-à-vis du Arg₀-Leu₅-enképhaline.</i>	<i>p. 94</i>
<i>Figure 49 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du contenu des pics 1 et 2.</i>	<i>p. 95</i>
<i>Figure 50 : Effet inhibiteur de la mangiférine sur l'activité Ap-B.</i>	<i>p. 96</i>
<i>Figure 51 : Détermination du Ki de la mangiférine vis-à-vis de l'activité Ap-B.</i>	<i>p. 97</i>
<i>Figure 52 : Représentation schématique de la structure 3D partielle de la LTA4H co-cristallisée en présence de resvératrol et du modèle de la structure 3D de l'Ap-B en présence de resvératrol.</i>	<i>p. 99</i>
<i>Figure 53 : Superposition des structures pdb 3F7S (en présence de resvératrol) et 3B7S (en présence du tripeptide RSR) de la LTA4H.</i>	<i>p. 100</i>

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1 : Identité de séquence entre APN et les membres de la famille M1 dont la structure tridimensionnelle a été résolue.</i>	<i>p. 17</i>
<i>Tableau 2 : Inhibition de l'APN et la NEP par les Ala- analogues de l'opiorphine.</i>	<i>p. 35</i>
<i>Tableau 3 : Activité inhibitrice in vitro de l'opiorphine et de ses analogues vis-à-vis de l'ApN humaine et de la NEP humaine.</i>	<i>p. 36</i>
<i>Tableau 4 : Liste des pathogènes connus transmis par I. ricinus.</i>	<i>p. 46</i>
<i>Tableau 5 : Liste des peptides homologues de l'opiorphine et la sialorphine.</i>	<i>p. 72</i>
<i>Tableau 6 : IC₅₀ des peptides synthétiques vis-à-vis de l'APN et la NEP.</i>	<i>p. 76</i>
<i>Tableau 7 : Noms, formules et structures des différentes molécules naturelles testées pour leurs effets sur l'activité de l'Ap-B.</i>	<i>p. 92</i>

Introduction

I. Les enképhalines

La nécessité à disposer de nouveaux traitements ciblant les différentes douleurs neuropathiques et en particulier, la douleur aiguë, demeure aujourd'hui un challenge. Ces traitements doivent être capables d'allier une plus grande efficacité et une meilleure tolérance avec des marges de sécurité plus larges. Le traitement classique utilise un alcaloïde, la morphine, extrait du pavot à opium (*Papaver somniferum*), dont l'action mime les molécules analgésiques endogènes appelées opioïdes. En effet, la morphine reconnaît les récepteurs opioïdes et induit une réponse analgésique intense dans l'organisme. Cependant, des effets secondaires graves peuvent exister, comme la dépression respiratoire, la sédation, la constipation, la nausée, la tolérance et la dépendance. Des stratégies alternatives d'exploitation des systèmes opioïdes endogènes constituent donc une piste sérieuse pour la mise au point de nouvelles molécules thérapeutiques.

Les principaux opioïdes endogènes dotés de propriétés antinociceptives sont les Met-_(NH₂-YGGFM-COOH) et Leu-_(NH₂-YGGFL-COOH) enképhalines. Ces peptides sont synthétisés dans des neurones spécifiques, sous forme de précurseurs [267 résidus d'acides aminés ; préproenképhaline (PENK)]. Après maturation par la Signal Peptidase dans le réticulum endoplasmique, la structure primaire de la proenképhaline (31 kDa) contient plusieurs fois la séquence de ces molécules bioactives, encadrées par des sites de maturation constitués par des doublets d'acides aminés basiques (RR, KK, KR). Après hydrolyse, au niveau de ces sites, par des endo- et exopeptidases spécifiques, les peptides matures sont libérés par un mécanisme Ca²⁺-dépendant et interagissent spécifiquement avec deux sous-types de récepteurs couplés à une protéine G : les récepteurs opioïdes μ (MOR) et les récepteurs opioïdes δ (DOR). L'affinité des enképhalines pour les MOR est similaire à celle de la morphine, tandis que leur affinité pour les DOR est environ dix fois plus importante (Figure 1). Le rôle crucial des enképhalines dans le contrôle de la douleur physiologique est validé par l'augmentation de la sensibilité aux stimuli nociceptifs (douloureux) suscitée par l'inactivation du gène PREPROENK. Lorsque la Met-enképhaline est injectée dans le cerveau des rongeurs, elle produit un effet morphinique antinociceptif transitoire. Cet effet limité dans le temps est lié à la protéolyse spécifique de ces peptides par deux métallopeptidases à zinc, l'endopeptidase neutre ou Néprilysine (NEP) et l'aminopeptidase N (APN) qui clivent les enképhalines pour produire des métabolites inactifs Tyr-Gly-Gly et Tyr, respectivement. (Figure 2, 3 ; pour revue, Roques et al., 2012)

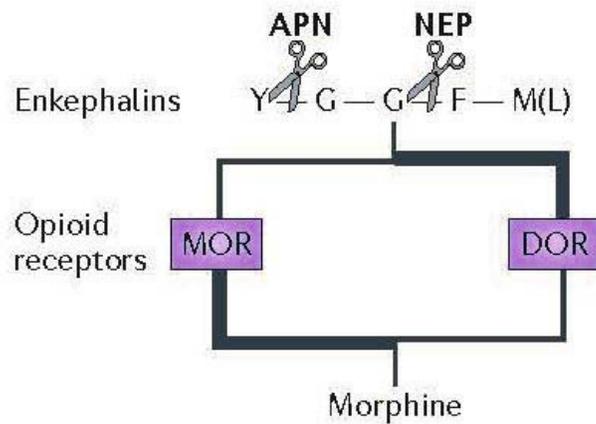


Figure 1 : Les enképhalines endogènes (Met-enképhaline et Leu- enképhaline) se lient aux récepteurs opioïdes μ (MOR) et δ (DOR). Les enképhalines ont une plus grande affinité pour DOR alors que la morphine a une plus grande affinité pour MOR. Les ciseaux indiquent les sites de clivage de l'enképhaline par l'aminopeptidase N (APN) et la néprilysine (NEP). (Illustration tirée de Roques et al., 2012)

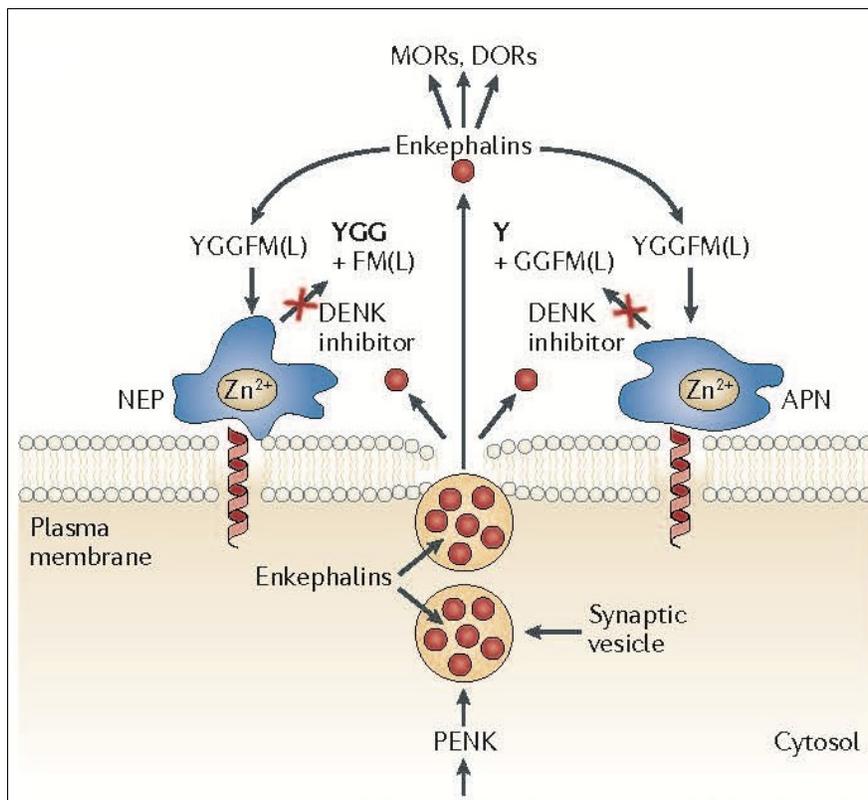


Figure 2 : Les enképhalines sont synthétisées après maturation post-traductionnelle du précurseur préproenképhaline (PENK). Stockées dans des grandes vésicules synaptiques, les enképhalines sont libérées par exocytose Ca^{2+} -dépendante. À l'extérieur des cellules, les enképhalines interagissent spécifiquement avec les récepteurs opioïdes, et leur signal est interrompu par l'action concomitante de deux métallopeptidases à zinc (NEP et APN ; enképhalinas) qui génère des métabolites inactifs. Les concentrations circulantes des enképhalines, qui modulent la réponse physiologique analgésique, sont augmentées en présence d'un « double inhibiteur » des enképhalinas (DENK). (Illustration tirée de Roques et al., 2012)

Les opioïdes endogènes sont présents à tous les niveaux de contrôle de la douleur : ils sont largement distribués dans le système nerveux central, la moelle épinière et les organes périphériques. A la périphérie, les opioïdes endogènes sont présents dans les cellules épithéliales de l'intestin et du foie, des articulations, des poumons, des testicules et de la peau, ainsi que dans différents types de cellules du système immunitaire, y compris les oligodendrocytes et les cellules de Schwann entourant les fibres nerveuses.

Les récepteurs opioïdes μ et δ sont principalement situés dans les terminaisons des fibres afférentes présynaptiques de la corne dorsale de la moelle épinière, alors que la NEP se trouve au niveau des interneurons. La distribution de la NEP et de l'APN dans le cerveau se chevauche avec celle des MOR et DOR dans les structures impliquées dans le contrôle de la douleur et des émotions, telles que le thalamus, le cortex et le système limbique. (*Figure 3 ; pour revue Roques et al., 2012*)

L'inhibition de la dégradation des enképhalines, par la NEP et l'APN, augmente leurs concentrations basales extracellulaires près de leur site de libération, donc le fait de bloquer la NEP et l'APN est limité aux récepteurs opioïdes locaux. L'intensité de la réponse dépend donc : *i*) du taux d'enképhalines libérées par un stimulus donné ; *ii*) du nombre de récepteurs opioïdes ; *iii*) de l'activité des métallopeptidases à zinc. Ces trois facteurs varient selon les voies neuronales impliquées et le type de stimulations. Lorsqu'ils sont administrés par voie systémique, les inhibiteurs sélectifs de la NEP n'ont pas d'effets analgésiques significatifs chez le rongeur ou l'humain du fait d'une stimulation insuffisante des récepteurs opioïdes, suite à la dégradation des enképhalines. Cette constatation a conduit à la proposition que la combinaison d'inhibiteurs ciblant aussi bien la NEP que l'APN pourrait être plus efficace et des résultats prometteurs ont été obtenus dans ce sens pour soulager différentes douleurs provoquées chez les animaux. Ces résultats ont donc encouragé le développement d'inhibiteurs double NEP-APN (DENK). (*pour revue Roques et al., 2012*)

Les opioïdes endogènes sont présents dans les neurones sensoriels primaires, offrant la possibilité de soulager, ou du moins de réduire la sensation douloureuse. En outre, plus de 50% des effets de la morphine sont attribuables à la stimulation des neurones périphériques. Par conséquent, le développement des inhibiteurs DENK a mis l'accent sur le traitement de la douleur neuropathique et inflammatoire avec des molécules incapables d'atteindre le cerveau et qui sont donc dépourvues de possibles troubles du comportement. Les résultats obtenus avec PL37, l'un

des premiers inhibiteurs DENK synthétiques, actif par voie orale dans divers modèles animaux, ont révélé un effet analgésique intéressant. PL37 est le premier inhibiteur DENK à entrer en phase d'essais cliniques. (pour revue, Roques et al., 2012)

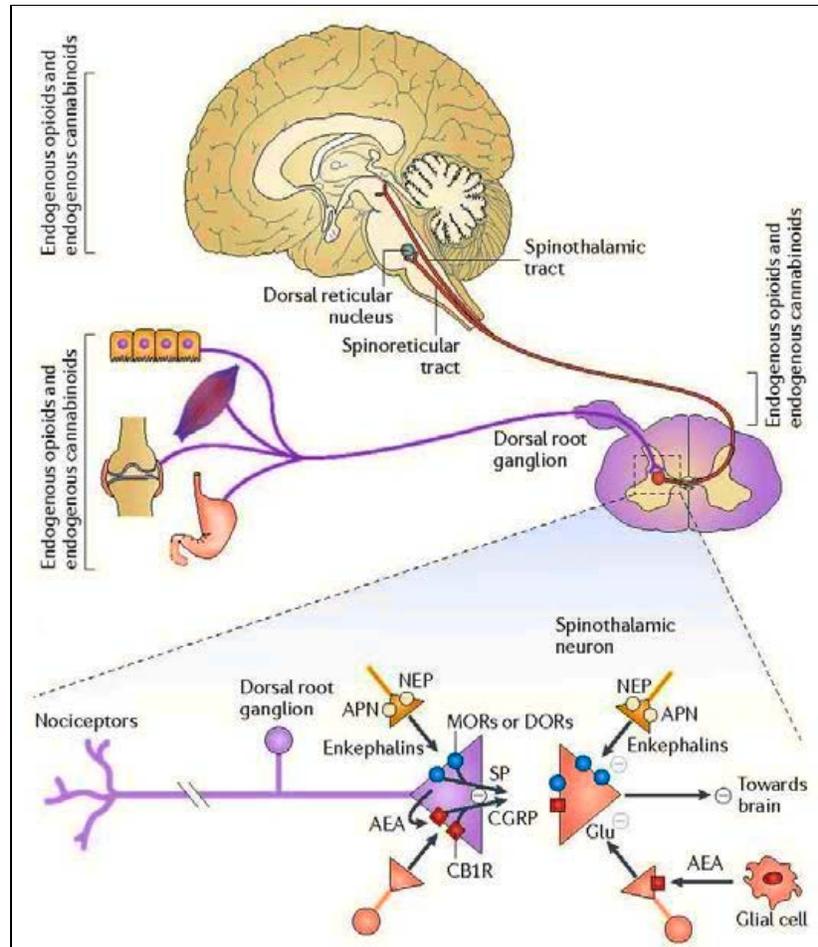


Figure 3 : Voie de signalisation d'opioïdes endogènes : schéma du mécanisme d'action et du métabolisme des enképhalines. (Illustration tirée de Roques et al., 2012)

II. Le système opioïde endogène

1. Généralités

L'interaction entre les peptides et les récepteurs opioïdes représente le système opioïde endogène (Figure 3). Les récepteurs opioïdes sont largement distribués dans le système nerveux central ainsi que dans plusieurs tissus périphériques. Cette large distribution est liée à l'importance du rôle que le système opioïde joue dans le contrôle de plusieurs réponses physiologiques, telle que la nociception, le comportement émotionnel, l'apprentissage, la

mémoire et la régulation des circuits de récompense. (pour revue, (Bodnar, 2008) L'existence de récepteurs membranaires spécifiques des opiacés dans le cerveau a été montré pour la première fois en 1973 par trois groupes de chercheurs différents (Pert & Snyder, 1973 ; Terenius, 1973). Quelques années plus tard a été démontré que ces sites de liaison ne sont pas homogènes (pour revue, Bodnar, 2008 ; Lord et al., 1977 ; Gilbert & Martin, 1976). Dans les années 90 ont été réalisés le clonage et la caractérisation moléculaire des trois différents types de récepteurs opioïdes: mu (μ), delta (δ) et kappa (κ) (Chen et al., 1993 ; Evans et al., 1992 ; Kieffer et al., 1992 ; Yasuda et al., 1993). Les récepteurs opioïdes appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés à des protéines G (à sept hélices transmembranaires), l'activation de ces derniers induit au niveau cellulaire des effets inhibiteurs : diminution de la synthèse d'AMPc, de l'activité des canaux Ca^{2+} voltage-dépendant et de l'ouverture de canaux K^{+} (Law et al., 2000). Le récepteur cloné en 1994 et baptisé nociceptine/orphanine FQ (ORL1) est le quatrième membre de la famille des récepteurs opioïdes (Mollereau et al., 1994). Une forte homologie existe entre ce récepteur et les autres récepteurs opioïdes, mais n'a pas d'affinité en ce qui concerne les ligands classiques comme la naloxone (Mollereau et al., 1994).

2. Distribution et rôles

Grâce aux techniques de liaison (Goodman et al., 1980 ; Waksman et al., 1986), d'hybridation *in situ* (Mansour et al., 1995) et d'immunohistochimie (Arvidsson et al., 1995 ; Mansour et al., 1996), la distribution de récepteurs opioïdes a été obtenue (Figure 4). Les récepteurs opioïdes μ sont distribués préférentiellement dans le thalamus, le striatum, le locus coeruleus et le noyau du tractus solitaire. Les récepteurs δ sont trouvés surtout au niveau du cortex, le striatum et les noyaux du pont, et les récepteurs kappa dans l'hypothalamus, le noyau accumbens, la substance noire, l'aire tegmentale ventrale et le noyau du tractus solitaire. En ce qui concerne le récepteur ORL1, les plus hautes densités de sites de liaison ont été trouvées dans le cortex, l'amygdale, l'hippocampe postérieur, le thalamus, l'hypothalamus, les noyaux mamillaires, le locus coeruleus et le noyau du raphé dorsal (Florin et al., 1997). Les récepteurs et les peptides opioïdes sont largement exprimés dans le cerveau. La Figure 4 présente une vue d'ensemble de l'anatomie du système opioïde dans le cerveau de rongeurs (souris et rat). La figure 4-A résume le schéma de distribution anatomique des récepteurs mu, delta et kappa, tel que déterminé par autoradiographie de ligand opioïde et la distribution des corps cellulaires exprimant des récepteurs opioïdes et en fonction de la détection des ARNm par hybridation *in situ* (ISH).

La Figure 4-B illustre la distribution des peptides opioïdes contenant des fibres neuronales et les corps cellulaires, déterminée par immunohistochimie, afin de compléter la cartographie des corps cellulaires opioïdes, des ISH ont été effectuées.

D'autre part, trois familles de peptides endogènes : proopiomélanocortine (POMC), proencéphaline (PENK) ou prodynorphine (PDYN) ont également été identifiés et clonés. Ces précurseurs génèrent plusieurs peptides opioïdes : β -endorphine ; met- et leu-enképhaline ; dynorphines et néo-endorphines, respectivement (Kieffer & Gaveriaux-Ruff, 2002). Dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse est produite essentiellement la propiomélanocortine, mais elle est aussi retrouvée dans des neurones de l'hypothalamus et du tronc cérébral (Meador-Woodruff et al., 1988). Dans le cerveau sont très largement distribués Les dérivés de la proenképhaline. Le striatum est la région la plus riche en ARNm de la proenképhaline et en peptides dérivés de ce précurseur, et la majorité de ces neurones enképhalinergiques innerve le globus pallidus. De fortes concentrations d'ARNm de la proenképhaline sont présentes également dans de nombreux noyaux hypothalamiques (Pittius et al., 1985). Sinon dans d'autres régions cérébrales, comme le noyau accumbens, l'amygdale, le septum latéral, l'hippocampe, le thalamus, le bulbe et les tubercules olfactifs, le cortex, les enképhalines sont impliquées dans le contrôle physiologique de la douleur, la respiration et les fonctions motrices (Hollt et al., 1986). Dans le cerveau, sont largement distribués les dérivés de la prodynorphine, notamment dans des noyaux qui renferment de la bêta-endorphine ou des dérivés de la proenképhaline (Khachaturian et al., 1985).

3. Peptides - Récepteurs opioïdes et affinité

La différence d'affinité entre les peptides opioïdes endogènes pour chaque type de récepteur révèle que la met- et la leu-enképhaline montrent une meilleure affinité pour les récepteurs δ , les dynorphines et néoendorphines pour les récepteurs κ et la bêta-endorphine manifeste une affinité préférentielle pour les récepteurs μ (Roth-Deri et al., 2008).

Un autre peptide opioïde endogène N/OFQ a été découvert plus récemment, il présente une forte affinité pour le récepteur nociceptine/orphanine FQ (Meunier et al., 1995). Dans les neurones de multiples structures situées au niveau du diencephale et du tronc cérébral est détecté l'ARNm de ce peptide N/OFQ (Ikeda et al., 1998). Enfin les endomorphines 1 et 2, sont deux autres peptides identifiés comme de possibles ligands endogènes sélectifs des récepteurs μ (Zadina et al., 1997).

Les peptides opioïdes endogènes sont inactivés par un mécanisme de dégradation enzymatique. Deux enzymes sont impliquées dans la dégradation des enképhalines endogènes : la NEP qui coupe la liaison Glycine-Phénylalanine ; et l'APN qui hydrolyse la liaison Tyrosine-Glycine (Roques et al., 1993). Pour concevoir de manière rationnelle des inhibiteurs hautement spécifiques, il faut s'intéresser au mécanisme catalytique ainsi qu'à la spécificité de substrat de ces enzymes, ainsi que de celles de la même famille et des familles voisines.

III. La famille M1 : les aminopeptidases à zinc essentiel à la catalyse

La famille M1 regroupe à ce jour exclusivement des aminopeptidases. Il existe plus de 2000 protéines identifiées réparties entre les Archées, les Bactéries et les Eucaryotes (de la Levure aux Mammifères en passant par les Insectes et les Plantes), mais elles sont absentes chez les virus. Cette famille se situe dans le clan MA caractérisé par la présence au sein de leur séquence d'un motif HEXXH dans lequel les deux histidines sont les ligands d'un atome de zinc et où le glutamate joue un rôle essentiel dans l'activité catalytique. La famille M1 appartient au sous-clan des gluzincines, défini par la présence d'un autre glutamate situé 19 résidus en aval du motif HEXXH et jouant le rôle de troisième ligand du zinc. Une seconde signature, le motif GXMEN, situé 22 à 38 résidus en amont de la première, intervient dans la fixation et la reconnaissance du substrat (Rawlings & Barrett, 1995 ; Iturrioz et al., 2001). L'APN humaine (h-APN) présente peu d'identité de séquence avec les autres membres de la famille (Tableau 1).

	Membre de la famille M1 dont la structure tridimensionnelle a été résolue	Identité de séquence avec h-APN (UniProtKB/Swiss-Prot P15144)
ERAP1	Aminopeptidase 1 humaine du réticulum endoplasmique (UniProtKB/Swiss-Prot ID Q9NZ08)	31 %
ERAP2	Aminopeptidase 2 humaine du réticulum endoplasmique (UniProtKB/Swiss-Prot ID Q6P179)	30 %
TIFF3	« Tricorn Interacting Factor F3 » de <i>Thermoplasma acidophilum</i> (UniProtKB/Swiss-Prot ID O93655)	22 %
PfA-M1	M1 Aminopeptidase neutre de <i>Plasmodium falciparum</i> (UniProtKB/Swiss-Prot ID O96935)	17 %
pepN	Aminopeptidase-N d' <i>Escherichia coli</i> (UniProtKB/Swiss-Prot ID P04825)	14 %
LTA4H	Leucotriène A4 hydrolase humaine (UniProtKB/Swiss-Prot ID P09960)	14 %
ColAP	« Cold-Active » Aminopeptidase de <i>Colwellia psychrerythraea</i> (UniProtKB/Swiss-Prot ID Q7WVY1)	14 %

Tableau 1 : Identité de séquence entre l'APN et les membres de la famille M1 dont la structure tridimensionnelle a été résolue. L'outil alignement de séquences du serveur UniProt a été utilisé (Jain et al., 2009)

Dans ce tableau, 3 enzymes sont exprimées chez les mammifères

- ERAP1 et ERAP2 : les aminopeptidases sont présentes dans le réticulum endoplasmique, des enzymes multifonctionnelles et impliquées dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires ainsi que dans une maladie chronique, la spondylarthrite ankylosante (maladie inflammatoire chronique des articulations sacro-iliaques et de la colonne vertébrale) (Tsui et al., 2010).
- LTA4H : la leucotriène A4 hydrolase [EC.3.3.2.6] : est une enzyme bifonctionnelle qui présente une activité époxyde hydrolase et aminopeptidase. Elle participe *via* son activité époxyde hydrolase à la biosynthèse du leucotriène B4, un puissant médiateur lipidique de l'inflammation, et *via* son activité aminopeptidase, à l'hydrolyse du peptide PGP limitant ainsi le processus inflammatoire (Snelgrove et al., 2010). Cette enzyme a donc deux activités distinctes qui interviennent dans deux mécanismes de « fonctions opposées ».

Cette famille de métallo-aminopeptidases présente un repliement très similaire, bien que l'homologie de séquence soit partielle. La comparaison des alignements de séquence de l'APN avec l'ensemble des séquences des structures répertoriées dans la PDB (« Protein Data Bank »), confirme l'homologie structurale entre ces enzymes (Figure 5). L'analyse est effectuée à l'aide du logiciel HHpred (Soding, 2005).

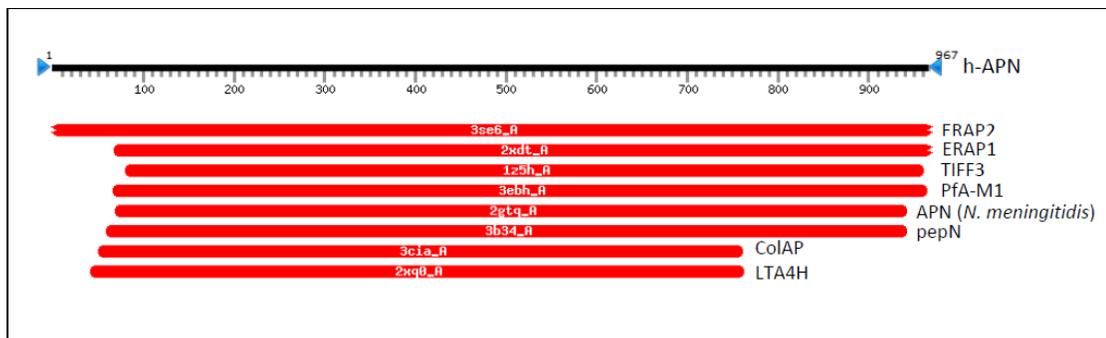


Figure 5 : Identification d'homologues structuraux à l'aide du logiciel HHpred78 (Soding, 2005). La séquence protéique de **h-APN** (en noir) est comparée à l'ensemble des séquences des structures répertoriées dans la PDB. Seules les protéines pour lesquelles la probabilité de l'homologie structurale est de 100% sont représentées (en rouge). Aminopeptidase 2 du réticulum endoplasmique humain (**ERAP2** ; Code PDB 3se6), Aminopeptidase 1 du réticulum endoplasmique humain (**ERAP1** ; 2xdt), « Tricorn Interacting Factor F3 » de *Thermoplasma acidophilum* (**TIFF3** ; 1z5h), M1 alanyl-Aminopeptidase neutre de *Plasmodium falciparum* (**PfA-M1**; 3ebh), Aminopeptidase N de *Neisseria meningitidis* (**APN**; 2gtq), Aminopeptidase N d'*Escherichia coli* (**PepN** ; 3b34), « Cold-active » Aminopeptidase de *Colwellia psychrerythraea* (**ColAP** ; 3cia), Leucotriène A4 Hydrolase de *Saccharomyces cerevisiae* (**LTA4H**; 2xq0).

D'un point de vue structural, le domaine C-terminal (Figure 6 ; en magenta) est le

domaine protéique qui a été le moins bien conservé au cours de l'évolution. Il est par exemple, constitué de 10 hélices dans la LTA4H, 17 pour pep N ou encore 16 pour ERAP1. À l'inverse du domaine catalytique (en vert) qui est très conservé, contenant l'atome de zinc, essentiel à la catalyse. Le repliement de ce dernier dérive de celui de la Thermolysine [EC.3.4.24.27], qui semble être un ancêtre commun à ces métallo-aminopeptidases (Nguyen et al., 2011 ; Birtley et al., 2012).

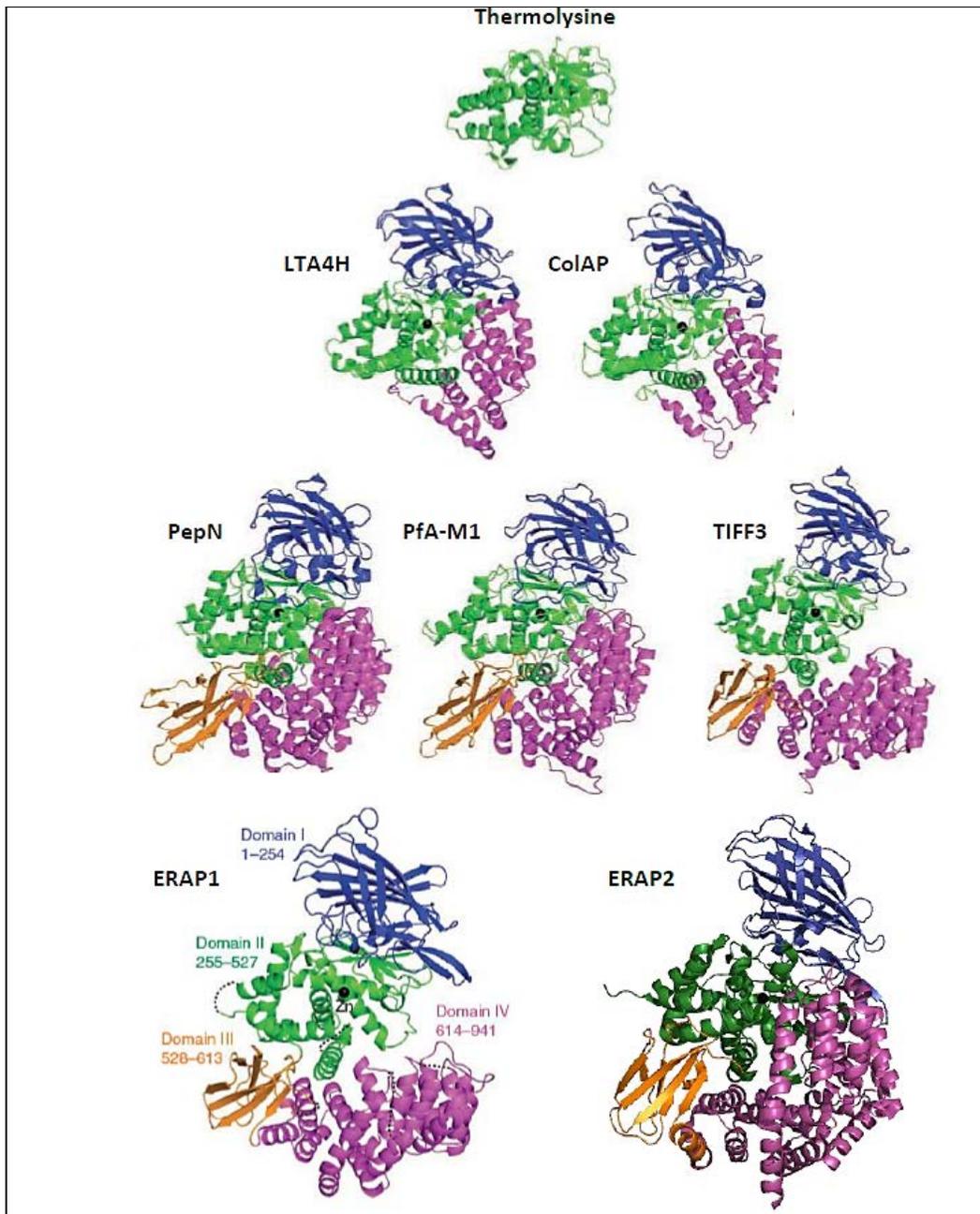


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de métallo-aminopeptidases de la famille M1 et de la Thermolysine (ancêtre commun), représentation en ruban adaptée de (Nguyen et al., 2011)

Les séquences des structures primaires révèlent la présence du motif HEXXH-X₁₈-E de fixation du zinc et GXMEN (Figure 7), indispensable à la reconnaissance de l'amine libre en position N-terminale du substrat peptidique ou protéique. Tous les membres de cette famille ont cette caractéristique, sauf l'aminopeptidase O, elle apparaît être une exception car ce motif a pour séquence LGMAS (Diaz-Perales et al., 2005)

```

Ap-N      DFNAGAMENWGLVITYRENSLLFDPLSSSSSNKERVVTVIAHELAHQWFGNLVTIEWWNDLWLNEGFAS 397
Ap-Q      SFDNHAMENWGLMIFDESGLLLEPKDQLTEKKTLSYVVSHEIGHQWFGNLVTMNWNNIWLNEGFA 424
TRH-DE    KHPYAAMENWGLSIFVEQRILLDPSVSSISYLLDVTMVIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF 449
PSA       DFAAGAMENWGLVITYRETALLIDPKNSCSSSRQWVALVVGHELAHQWFGNLVTMEWWTWHLWLN 361
Ap-A      DFGTGAMENWGLITYRETNLLYDPKESASSNQQRVATVVAHELVAHQWFGNIVTMDWEDLWLN 402
ERAP1     DFQSGAMENWGLTTYRESALLFDAEKSSASSKLGITMTVAHELAHQWFGNLVTMEWWTWHLWLN 362
ERAP2     DFAPGAMENWGLITYRETSLLFDPKTSSASDKLWVTRVIAHELAHQWFGNLVTMEWWTWHLWLN 379
IRAP      DFEAGAMENWGLLTFREETLLYDSNTSSMADRKLVTKIIAHELAHQWFGNLVTMKWWTWHLWLN 471
LTA4H     SFPYGGMENPCLTFVTPCLLAGD-----KSLSNVIAHEISHSWTGNLVTNKTWDHFWLNEGHT 305
RNPEPL1   SFPIVAMENPCLTFIISILESD-----EFLVIDVIEVAHSWFGNAVTNATWEEMWLSSEGLAT 362
Ap-B      SFPFGGMENPCLTFVTPCLLAGD-----RSLADVIIHEISHSWFGNLVTNANWGEFWLNEGFT 334
Ap-O      NFPSLGMASPHIMFLSQSILTGG-----NHLCGTRLCHEIAHAWFGLAIGARDWTEEWLSEGF 488

```

Figure 7 : Alignement partiel des séquences primaires de la région catalytique des 12 métallo-aminopeptidases de la famille M1 chez les mammifères. Le programme clustal a été utilisé pour aligner les séquences humaines de l'aminopeptidase N (Ap-N, P15144), l'aminopeptidase Q (Ap-Q ; Q6Q4G3), l'enzyme de dégradation de l'hormone relarguant la thyrotropine (TRH-DE ; Q9UKU6), l'aminopeptidase sensible à la puromycine (PSA ; P55786), l'aminopeptidase A (Ap-A ; Q07075), les aminopeptidases du réticulum endoplasmique (ERAP1 et 2 ; Q9NZ08 et Q6P179), l'aminopeptidase régulée par l'insuline (IRAP ; Q9UIQ6), la leucotriène A4 hydrolase l'aminopeptidase O (Ap-O ; Q8N6M6). (LTA4H ; P09960); l'aminopeptidase B-like 1 (RNPEP-L1 ; Q9HAU8), l'aminopeptidase B (Ap-B ; Q9H4A4) et l'aminopeptidase O (Ap-O, Q8N6M6).

IV. Aminopeptidase N et Endopeptidase neutre

La NEP et l'APN sont des Zn²⁺ métallopeptidases transmembranaires avec un site catalytique extracellulaire qui leur permet d'hydrolyser des peptides tels que les enképhalines. De manière plus générale, les métallopeptidases (plus de 100 familles à ce jour en se référant à la banque de données MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family>)) sont des enzymes ubiquitaires qui participent à tous les grands processus physiologiques, ainsi leur dérégulation conduit à des maladies comme les cancer, l'inflammation les infections microbiennes, les agressions neurologiques et les troubles cardiovasculaires. C'est pour cette raison que le clivage des liaisons peptidiques par les métallopeptidases est essentiel à la vie. L'activité catalytique de la plupart de ces métallopeptidases dépend de la présence dans leur site actif d'un ou deux ions métalliques tels que le zinc (le plus répandu), le cobalt ou le manganèse. La plupart de ces métallopeptidases fixent un ion Zn²⁺ dans leur site actif. Les enzymes rangées dans le clan MA

de la classification internationale (IUMB ; Enzyme Nomenclature; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) possèdent un motif HEXXH, qui comprend deux histidines liant le cation et une glutamate ayant une fonction catalytique. Un 3^{ème} ligand du cation Zn²⁺ est nécessaire, cela peut être un résidu glutamate, histidine ou aspartate (42 familles différentes à ce jour). L'APN et la NEP appartiennent respectivement aux familles M1 (HEXX₁₈HE) et M13 (HEXX₅₉HE) et possèdent un glutamate jouant le rôle de 3^{ème} ligand du cation Zn²⁺. Des études ont montré que les sites catalytiques et les mécanismes enzymatiques de la NEP et de l'APN présentaient des similitudes et s'apparentaient notamment avec ceux de la thermolysine qui appartient à la famille M4 (HEXX₂₀₋₃₃HE).

1. NEP

1.1. Généralités

La néprilysine NEP (EC3.4.24.11) est également une Zn²⁺-ectopeptidase (Vallee & Auld, 1990). Elle est spécifiquement exprimée chez les Mammifères (Kenny et al., 1987). Cette endoprotéase hydrolyse les liaisons peptidiques en NH₂-terminal des résidus hydrophobes phénylalanine, tyrosine, leucine et valine (Phe, Tyr, Leu, Val). La NEP est une protéine monomérique de 90-100 kDa, fortement glycosylée qui est également connue sous les noms suivants : neutral endopeptidase, CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen), ou enképhalinase (Letarte et al., 1988). Elle possède un court domaine intracellulaire et un large domaine extracellulaire qui porte le site actif de l'enzyme. Il s'agit d'une zinc-métalloprotéase qui clive préférentiellement les peptides circulants d'une taille inférieure à 5 kDa. Elle est impliquée dans l'inactivation de nombreux peptides biologiquement actifs, comme la substance P, les endorphines, les enképhalines et la neurotensine (Roques et al., 1980). Elle est présente à la surface de nombreux types cellulaires et intervient dans plusieurs fonctions physiologiques en inactivant des peptides régulateurs tel que le facteur atrial natriurétique (Roques et al., 1993).

La séquence de la NEP a été déterminée par clonage de son ADNc à partir de plusieurs espèces (Devault et al., 1988 ; Malfroy et al., 1987 ; Malfroy et al., 1988). La NEP est considérée comme le prototype d'un groupe de métallopeptidases qui comprend les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE-1 et ECE-2), de la surface des erythrocytes, et le produit du gène PEX. Elles appartiennent à la sous-famille M13 des endopeptidases neutres de

Mammifères et sont constituées d'un domaine cytoplasmique N-terminal court, suivi d'une seule hélice transmembranaire, et d'un large domaine extracellulaire C-terminal qui contient le site actif (HYP Consortium 1995 ; Emoto & Yanagisawa, 1995 ; Lee et al., 1991 ; Shimada et al., 1994). Le domaine extracellulaire de la NEP contient 12 résidus cystéine (C), tous impliqués dans des ponts disulfures, dont dix sont conservés dans la CEE, KELL, et PEX (Figure 8). L'homologie globale entre NEP et ECE-1, la CEE-2, KELL et PEX est de 35%, 30%, 31% et 25%, respectivement, mais augmente à 51%, 44%, 43%, et 39% si seulement les 250 derniers résidus C-terminaux sont considérés. Ce degré de similitude est suffisant pour indiquer que ces protéines partagent une origine commune et un repliement similaire.

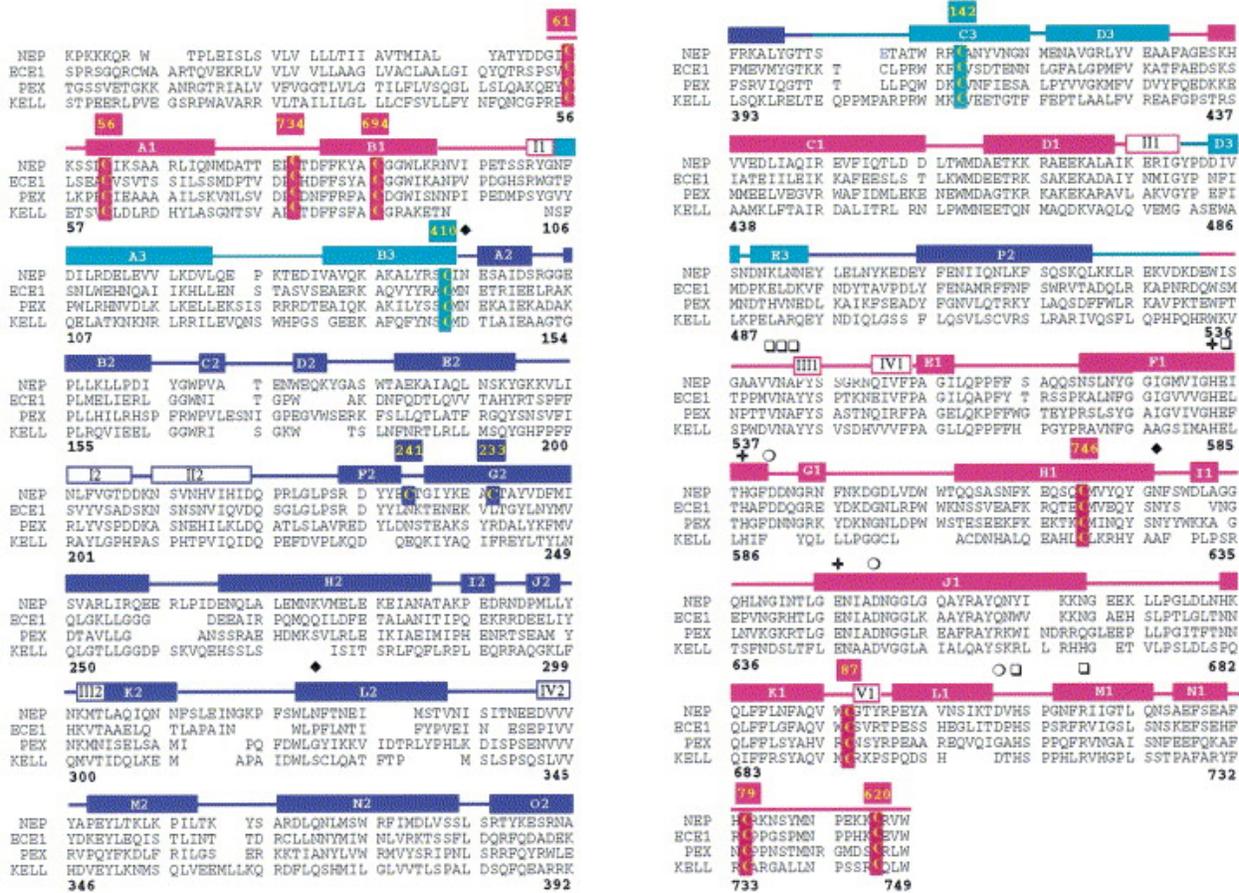


Figure 8 : Alignement multiple de séquences de métallopeptidases de mammifère NEP, ECE, KELL et PEX. Les hélices α , des cylindres remplis, brins β , cylindres ouverts, sont dessinés au-dessus de la séquence. (Oefner et al., 2000)

1.2. Mécanisme enzymatique et spécificité du substrat

Les propriétés catalytiques de la NEP ressemblent à celles d'un groupe d'endopeptidases bactériennes zinc-dépendantes dont la mieux caractérisée est la thermolysine (TLN). Des études

de structure-activité ont montré que TLN et NEP clivent la liaison peptidique de leurs substrats du côté amine des résidus hydrophobes et que les deux enzymes sont inhibées par le même type de molécules, telles que le phosphoramidon et le thiorphan, avec la même dépendance stéréochimique (Benchetrit et al., 1987 ; Fulcher et al., 1982 ; Hersh & Morihara, 1986). Bien qu'il y ait une homologie très limitée entre les structures primaires des enzymes bactériennes et celles des mammifères, Elles sont caractérisées par deux séquences consensus HEXXH et EXXXD, impliquées dans la liaison au cation zinc et la catalyse (Tronrud et al., 1992).

L'analyse de l'alignement de séquences de métallopeptidases de mammifère suggère d'importantes similitudes dans leurs sites actifs. Les résidus putatifs impliqués dans la coordination de zinc, la catalyse et la liaison du substrat ont été identifiés dans la NEP par des expériences de mutagenèse dirigée (Benchetrit et al., 1988 ; Devault et al., 1988 ; Devault et al., 1988 ; Dion et al., 1993 ; Dion et al., 1995 ; Le Moual et al., 1991 ; Le Moual et al., 1994). Dans un premier temps la structure tri-dimensionnelle observée pour la famille de la TLN a été utilisée pour générer un modèle de la région du site actif de la NEP, afin de concevoir de nouveaux inhibiteurs (Gaucher et al., 1999 ; Ksander et al., 1997 ; Ksander et al., 1997 ; Tiraboschi et al., 1999). En l'absence d'informations structurales pour la famille de la néprilysine et pour réussir la conception d'inhibiteurs puissants et sélectifs, la structure tridimensionnelle de la NEP humaine a été caractérisée par cristallographie aux rayons X en présence de l'inhibiteur phosphoramidon. (Figure 9, 10 ; Oefner et al., 2000)

2. L'aminopeptidase N

2.1. Généralités

Les aminopeptidases sont des exopeptidases présentes entre autres chez les mammifères sous forme soluble ou associées aux membranes, elles catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques d'un ou plusieurs résidus situés à l'extrémité N-terminale de peptides ou de protéines. Elles se répartissent dans différents groupes en fonction du nombre d'acides aminés libérés. Si l'enzyme retire un, deux ou trois résidus on parle alors d'aminopeptidase, de dipeptidyl aminopeptidase et de tripeptidyl aminopeptidase.

Dans la classification internationale des enzymes (IUMB; Enzyme Nomenclature; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) chacune d'entre elle est représentée par un code. Ce

dernier se base sur l'activité de l'enzyme, le type de réaction chimique catalysée et la nature du substrat. Il se traduit par les lettres EC suivies de quatre nombres.

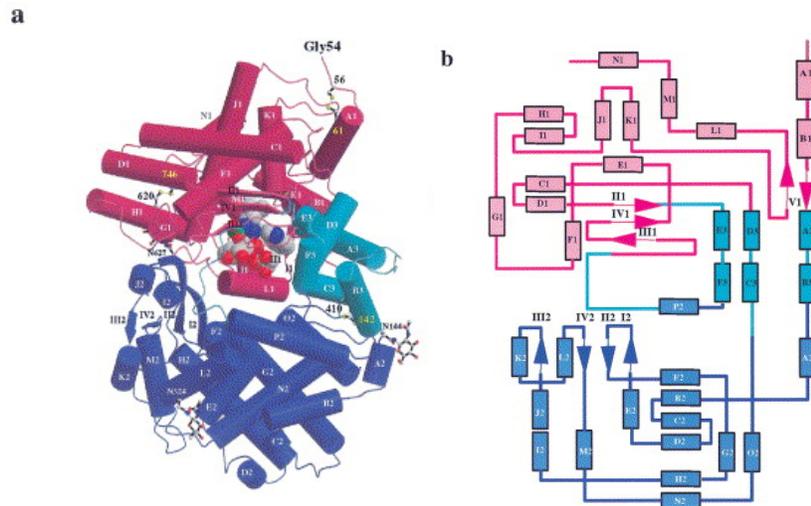


Figure 9 : Topologie en Ruban de la NEP complexée avec le phosphoramidon (a) : vue Stéréoscopique d'un modèle structural de la néprilysine humaine, montrant le domaine catalytique 1 (violet), le domaine 2 (bleu), et les trois fragments de liaison inter-domaines (cyan). L'état de transition mimétique du phosphoramidon est représenté dans la représentation CPK. Des sites de glycosylation et les ponts disulfures sont indiqués. (b) schéma topologique de la NEP. Le code couleurs est le même que Figure 8. (Oefner et al., 2000)

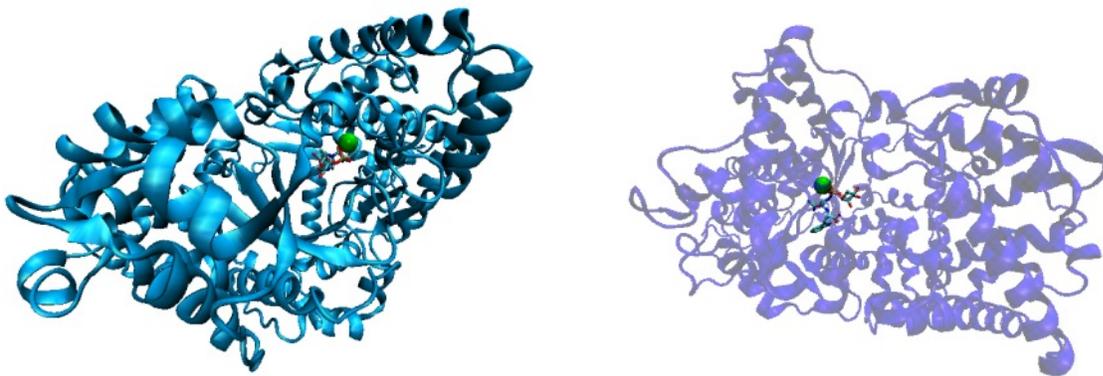


Figure 10 : la néprilysine (code RCSB PDB : 4CTH). Mode de liaison du phosphoramidon au site actif de l'enzyme. Le logiciel VMD est utilisé pour visualiser la structure tridimensionnelle de la protéine.

Le premier désigne le type d'activité: EC 1, oxydoréductases; EC 2, transférases; EC 3, hydrolases; EC 4, lyases; EC 5, isomérases; EC 6, ligases. Le second indique le type de substrat, par exemple EC 3.4 pour les hydrolases agissant sur les liaisons peptidiques. Le

troisième nombre indique le type d'enzyme (nature ou type de réaction catalysée), 11 pour les aminopeptidases. Enfin le dernier qualifie l'enzyme du point de vue spécificité et propriétés propres. Certaines de ces aminopeptidases présentent de larges spécificités de clivage, leur nom n'est pas toujours adéquat. Par exemple la leucyl aminopeptidase (EC 3.4.11.1) est capable de retirer les résidus neutres, notamment la leucine, mais aussi des résidus basiques (pour revues : Hill & Smith, 1960 ; DeLange & Smith, 1971 ; Henson & Frohne, 1976 ; Kim & Lipscomb, 1994). Au contraire, d'autres enzymes sont plus spécialisées, voire très spécifiques. L'aminopeptidase A (Ap-A, EC 3.4.11.21) est spécifique des résidus acides aspartate et glutamate (Glenner et al., 1962). L'aminopeptidase B (Ap-B, EC 3.4.11.6) retire spécifiquement les résidus basiques arginine et lysine (Hopsu et al., 1964 ; Cadel et al., 1995).

2.2. L'Aminopeptidase N [EC.3.4.11.2]

L'Aminopeptidase (APN) [EC.3.4.11.2] est une ecto-peptidase ubiquitaire, c'est une Zn^{2+} métallopeptidase de la famille M1. Chez l'homme, elle est exprimée de manière abondante à la surface des cellules épithéliales de l'intestin et du rein, le système nerveux central (synapses) et dans de nombreuses cellules dendritiques, monocytes et macrophages (Look et al., 1989). Elle est homodimérique (2x110 kDa) et de large spécificité. Elle clive préférentiellement les résidus neutres Leucine et Alanine (L et A), mais elle retire aussi certains résidus basiques Lysine et Arginine (K et R) et aromatiques tyrosine et phénylalanine (Y et F) en N-terminal de dérivés chromogéniques (Ward et al., 1990). *In vitro*, elle hydrolyse de nombreux peptides comme la substance P (Palmieri et al., 1989), la neurotensine (Churchill et al., 1987) et la bradykinine (Bathon et al., 1992). Elle participe au métabolisme des enképhalines (Roques, 1991) et est également impliquée dans les réactions anti-inflammatoires, le contrôle des réponses immunitaires, ainsi que dans la différenciation cellulaire (Kunii et al., 2005) et au système rénine-angiotensine en clivant l'angiotensine III en angiotensine IV (Zini et al., 1996).

L'APN contrôle des peptides régulateurs comme les facteurs de croissance, les hormones (somatostatine), les chémokines et les cytokines. Son expression est régulée par l'interféron γ (Gabrilovac et al., 2005). Cette enzyme est également un récepteur pour les coronavirus du groupe 1 (Kolb et al., 1997). Elle joue un rôle important dans l'angiogenèse et intervient dans la régulation de la pression artérielle (Danziger, 2008). Des inhibiteurs de son activité bloquent le processus de formation des vaisseaux et l'expansion des tumeurs (Bhagwat et al., 2003). Un

modèle structural du domaine compris entre Y₃₃₅ et Q₆₀₇ a été construit (Bukowska et al., 2004, non publié). Toutes ces caractéristiques font de l'APN une cible intéressante pour la recherche d'inhibiteurs spécifiques à des fins thérapeutiques (Drag et al., 2010)

2.3. Mécanisme enzymatique et spécificité du substrat

La spécificité de substrat propre à l'APN est très large. Cette métallo-aminopeptidase clive préférentiellement les acides aminés neutres et hydrophobes comme la leucine, la valine et la phénylalanine en position N-terminale, d'où la présence de nombreux noyaux aromatiques dans le sous-site S1. D'ailleurs au niveau de ce sous-site, la charge positive du résidu R peut interagir avec un carboxylate. Il est également établi que l'arginine peut interagir par des liaisons cation- π avec des noyaux aromatiques présents dans sous-site S1 (Du et al., 2012). (Figure11)

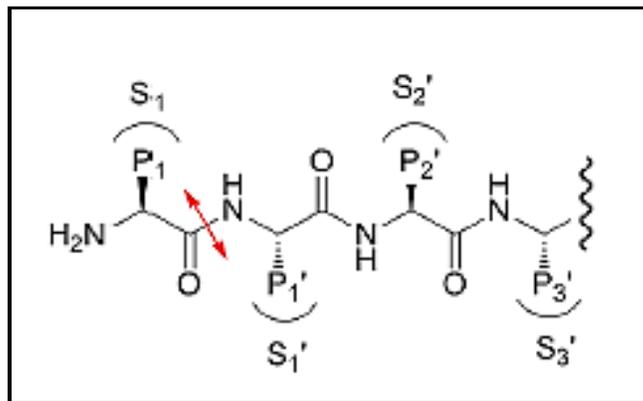


Figure 11 : Représentation schématique d'un substrat peptidique ou protéique au site actif d'une aminopeptidase selon la nomenclature de Schechter et Berger : la liaison peptidique hydrolysée se situe entre les résidus P1 et P1' ; les résidus P et P' interagissent avec les sous-sites S et S' du site catalytique de la protéase (Schechter & Berger, 1967)

La structure 3D de l'APN humaine a été déterminée par cristallographie (Figure 12), en présence de bestatine. Chaque monomère possède une structure à quatre domaines (domaines I-IV) caractéristique de certaines métallopeptidases M1 dont les structures ont été déterminées (Addlagatta et al., 2006 ; Birtley et al., 2012 ; Reeves et al., 2002). Le domaine II contient à la fois le site de liaison au zinc et le site catalytique, ainsi que les motifs consensus caractéristiques, ³⁸⁸HEXXHX₁₈E⁴¹¹ and ³⁵²GXMEN³⁵⁶ (Wong et al., 2012).

Un mécanisme catalytique a été proposé pour tous les membres de la famille M1 d'après l'analyse du mode de liaison de substrats peptidiques et d'analogues de l'état de transition. La liaison de la bestatine (inhibiteur naturel) au site actif de l'Aminopeptidase-N humaine (code RCSB PDB 4FYR) est représentée (Figure 12), sa fixation est similaire à celle d'un substrat peptidique.

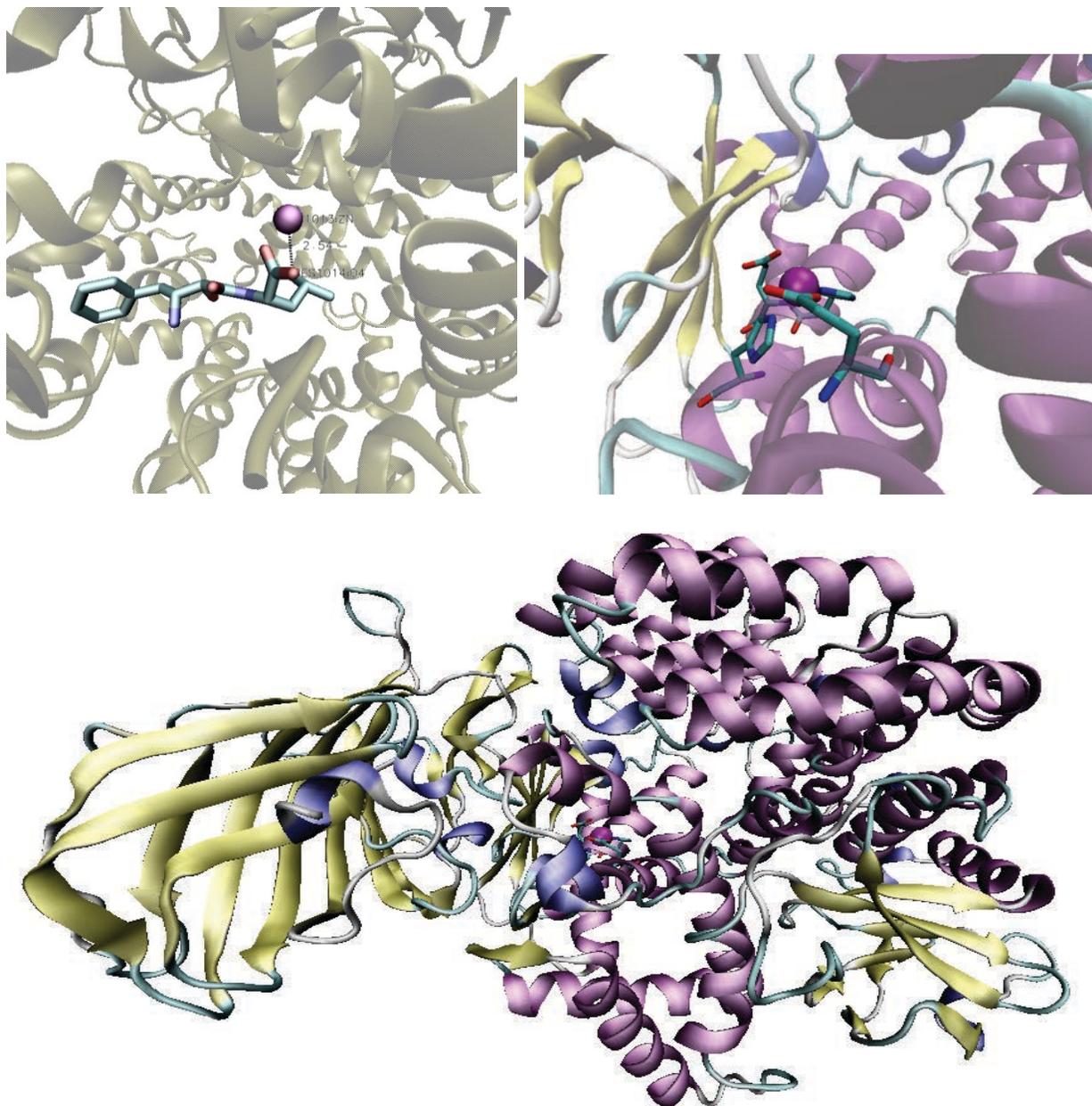


Figure 12 : Représentation du site actif de l'APN (code RCSB PDB : 4FYR) et des acides aminés essentiels à la catalyse. (A) illustre les acides aminés du site actif, essentiels à la catalyse chez l'APN humaine (code RCSB PDB : 4FYR). Dans l'enzyme native, l'ion zinc est tétra-coordonné par deux résidus histidine (His-388 et His-392), un résidu acide glutamique (Glu-411) et une molécule d'eau (agent nucléophile dans la réaction d'hydrolyse). Cette dernière est également liée par liaison hydrogène au carboxylate du résidu Glu-411. Le résidu Glu-355 du motif GXMEN participe à la reconnaissance du substrat peptidique : une liaison hydrogène se forme entre le groupement carboxylate de Glu-355 et l'amine primaire du substrat peptidique. (B) Représentation de la structure 3D de l'APN humaine (code RCSB PDB : 4FYR) et du mode de liaison de la bestatine au site actif de l'enzyme. Les distances entre les hétéroatomes et l'ion métallique sont données en Angström (Å). Le logiciel VMD est utilisé pour visualiser la structure tridimensionnelle de la protéine.

L'interface du dimère est médiée par des interactions hydrophobes et un réseau de liaisons hydrogène et de ponts disulfure, à $\sim 840 \text{ \AA}^2$ de la surface de chaque monomère (Figure 13, 14).

Dans chaque monomère, le site catalytique est exposé à une grande cavité interne ($\sim 2800 \text{ \AA}^3$), qui est inaccessible au solvant. Les liaisons du peptide natif sont similaires aux liaisons de l'inhibiteur, sauf pour une boucle souple dans le domaine IV qui est structurée par le substrat et les liaisons avec l'inhibiteur.

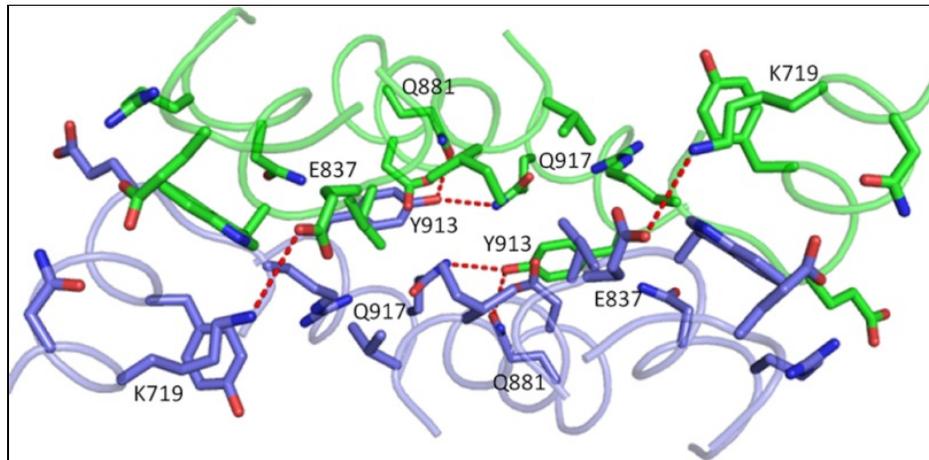


Figure 13 : Représentation de l'interface du dimère de l'APN. Les chaînes latérales des résidus qui interagissent sont représentées par des atomes d'oxygène et d'azote de couleur rouge et bleu, respectivement. Les liaisons hydrogène et des ponts salins sont représentés par des lignes en pointillés rouges. Adaptée de Wong et al., 2012

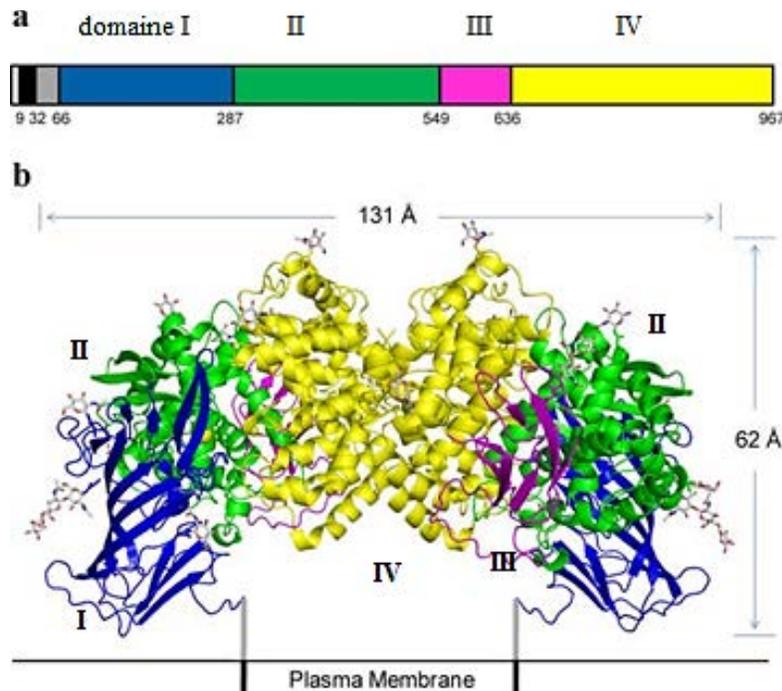


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de l'APN, (a) : l'organisation des domaines de la chaîne polypeptidique de l'APN. Le domaine cytoplasmique est blanc ; le segment transmembranaire est noir ; la partie riche en Ser / Thr est grise ; et les domaines : I, II, III, et IV sont colorés en bleu, vert, magenta et jaune, respectivement. Les chiffres indiquent les limites du domaine. b, représentation en ruban du dimère APN-h représenté dans son orientation probable par rapport à la membrane plasmique. Coloré selon les domaines décrits ci-dessus. Adaptée de Wong et al., 2012

V. L'Aminopeptidase B (Ap-B ; EC 3.4.11.6)

Nous nous intéresserons également à une autre aminopeptidase de la famille M1 : l'Aminopeptidase B (Ap-B). Cette dernière est impliquée dans la maturation d'hormones et de neuropeptides et sera, d'une part, utilisée pour vérifier la spécificité d'inhibition des peptides de type opiorphine/sialorphine, et d'autre part, dans le cadre d'une recherche de molécules naturelles susceptibles d'inhiber son activité enzymatique (voir section « Autres travaux »). L'Ap-B (EC 3.4.11.6), ubiquitaire chez les Mammifères, retire spécifiquement les résidus basiques Lysine et Arginine (K et R) en N-terminal (Hopsu et al., 1964 ; Cadel et al., 1995). L'Ap-B purifiée, à partir de testicules de rat, a été caractérisée : membranaire et monomérique (72 kDa ; Cadel et al., 1995 ; Balogh et al., 1998), elle appartient aux Zn^{2+} -métallopeptidases de la famille M1. Elle est détectée dans un grand nombre de tissus : testicule, épидидyme, cerveau, muscle, foie, cœur, poumon, pancréas, rein, intestin grêle, gros intestin, estomac et rate (Cadel et al., 1995 ; Piesse et al., 2002 ; Foulon et al., 1996). *In vitro* l'Ap-B est capable de maturer de nombreux substrats peptidiques comme la somatostatine 14 et *in vivo* l'Arg0-Met-enképhaline associée à la membrane des vésicules de sécrétion de l'hypophyse bovine (Gainer et al., 1984 ; Cadel et al., 1995).

La détermination de la structure primaire a mis en évidence une forte proximité phylogénétique avec une autre enzyme de la famille M1 des métallopeptidases, la Leucotriène A4 hydrolase (LTA4H) (Cadel et al., 1997), une enzyme bi-fonctionnelle possédant une activité époxyde hydrolase, mais aussi une activité aminopeptidase de large spécificité (Haeggstrom et al., 1990). La découverte *in vivo* de la maturation du glucagon en miniglucagon par la NRD convertase et l'Ap-B a prouvé l'existence de ce mécanisme de maturation des précurseurs hormonaux (Fontes et al., 2005). Le glucagon est impliqué dans la régulation de la glycémie au niveau du pancréas et le miniglucagon régule négativement les effets du glucagon. L'Ap-B pourrait jouer un rôle dans la régulation de la glycémie et dans le diabète de type II.

L'Ap-B est de forme globulaire et présente trois domaines structuraux bien définis. Un domaine N-terminal constitué de feuilletts β , un domaine C-terminal en hélices α et un domaine central mixte, essentiellement en hélices, contenant les motifs HEXXHX₁₈E et GXMEN. Le centre catalytique s'organise autour d'un cation Zn^{2+} situé au fond d'une cavité à l'interface des trois domaines (Figure 15).

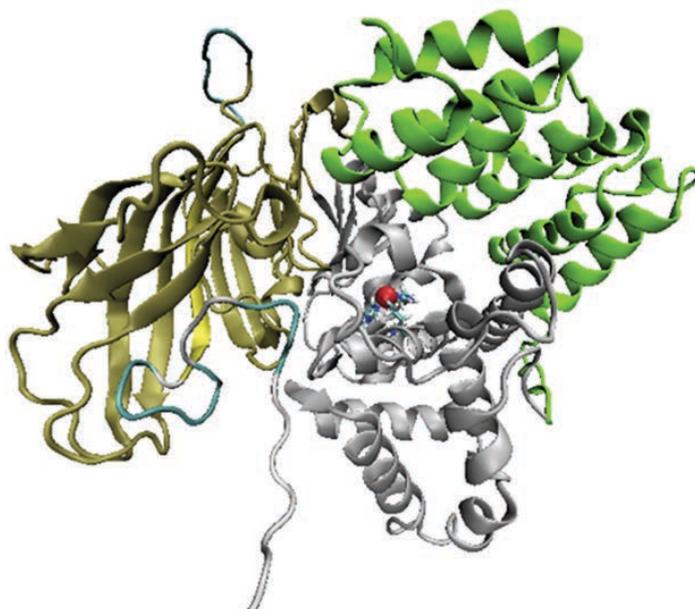


Figure 15 : Représentation du modèle structural de l'Ap-B, mode de liaison du résveratrol au site actif. Trois domaines structuraux sont représentés pour l'Ap-B humaine : le domaine N-terminale en jaune, le domaine catalytique en gris, et le domaine C-terminal en vert. L'ion zinc est représenté par une sphère rouge. Le logiciel VMD est utilisé pour visualiser la structure tridimensionnelle de la protéine.

VI. L'opiorphine et la sialorphine

1. Découverte de la sialorphine et de l'opiorphine

Identifiés dans la salive, l'opiorphine chez l'Homme ($\text{NH}_2\text{-QRFSR-COOH}$; Rougeot et al., 2007; Figure 16) et la sialorphine ($\text{NH}_2\text{-QHNPR-COOH}$; Rougeot et al., 2003 ; Figure 16) chez le rat sont des inhibiteurs peptidiques physiologiques de l'APN et de la NEP et ils jouent un rôle dans la modulation de la douleur (Wisner et al., 2006).

La sialorphine est majoritairement exprimée, sous contrôle d'hormones androgènes, dans la glande sous-mandibulaire et la prostate du rat mâle adulte. Elle est le produit d'hydrolyse, par des pro-hormones convertases (furine et/ou PACE4), d'une préproprotéine de 146 acides aminés, selon un mécanisme classique de maturation des hormones peptidiques chez les Mammifères (Rougeot et al., 2003). Sa sécrétion répond à un stress environnemental et s'effectue dans la salive et dans la circulation générale du rat. Le peptide peut alors se lier aux sites actifs de l'APN et de la NEP, ce qui inhibe de manière compétitive la dégradation des enképhalines par ces ectopeptidases permettant ainsi une forte réponse analgésique. Ce mécanisme a été démontré *in vitro*, et *in vivo* chez le rat (doses de 100-200 $\mu\text{g/kg}$, i.v.) dans deux modèles d'analyse de la douleur : le modèle comportementale de la douleur aiguë mécanique et le test pin-douleur (Rougeot et al., 2003).

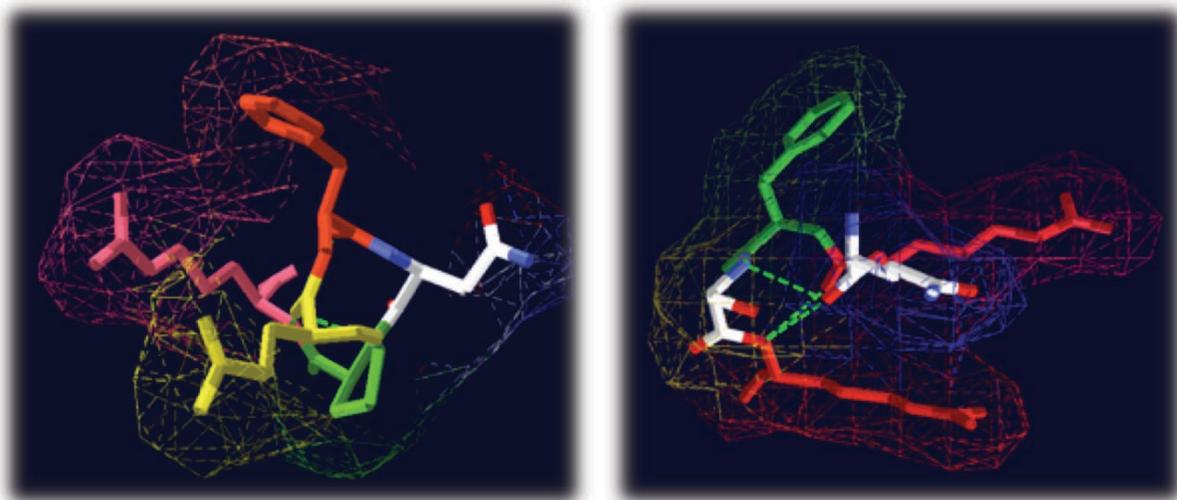


Figure 16 : Représentation des structures 3D de la sialorphine ($\text{NH}_2\text{-QHNPR}\text{-COOH}$, à gauche) et de l'opiorphine ($\text{NH}_2\text{-QRFSR}\text{-COOH}$, à droite).

Suite à la découverte de la sialorphine les recherches ont été dirigées vers un homologue fonctionnel chez l'homme, plus précisément dans la salive, étant donné les propriétés innovantes de la sialorphine chez le rat (Rougeot et al., 2007). L'opiorphine est l'homologue humain de la sialorphine. Ce peptide a également été identifié et purifié à partir de la salive. La maturation de l'opiorphine est différente de celle de la sialorphine car elle est produite par le clivage du peptide signal du précurseur par la signal peptidase (NH₂-terminal), et par celui d'une prohormone convertase de type furine en COOH-terminal. Des tests *in vitro* et *in vivo* (dose de 1 mg/kg; i.v.) ont démontré que ce pentapeptide était bien un inhibiteur double des activités des enképhalines APN et NEP et qu'il possédait des propriétés analgésiques similaires à celles de la sialorphine (Wisner et al., 2006).

La concentration extracellulaire des enképhalines libérées lors de la stimulation nociceptive entraînant des réponses analgésiques puissantes est augmentée par un facteur variant de 2 à 5, grâce à la double inhibition de la NEP et l'APN. Ainsi, le PL37 semble être une molécule prometteuse dans les douleurs nociceptives, vu que par voie intraveineuse (IV) il possède une ED₅₀ (median effective dose) de 1,6 mg/kg, donc très proche de celle de la morphine (1,3 mg/kg ; Roques et al., 2012). Par contre, il faudra attendre la suite des recherches et des essais cliniques pour mesurer son efficacité.

Aujourd'hui, aucun autre homologue fonctionnel n'a été caractérisé dans d'autres espèces animales et les mécanismes d'action de ces peptides sont encore mal connus. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats démontrait l'existence de nouveaux médiateurs peptidiques présentant des propriétés analgésiques. Ils agissent par potentialisation des activités

physiologiques des enképhalines endogènes libérées en réponse au stimulus douloureux, tout simplement en inhibant leur dégradation par les ectopeptidases.

2. Mécanisme d'action chez les mammifères

Face à l'importance des constantes biologiques régulées par le système opioïde, l'identification des mécanismes qui contrôlent, en amont, l'activité des enképhalines, revêt une importance fondamentale tant sur le plan physiologique que thérapeutique (Roques, 2000). L'opiorphine est un double inhibiteur des activités NEP et APN et protège *in-vitro* la Met-enképhaline de la dégradation par ces deux ectoenzymes. Cette molécule exerce une activité antinociceptive puissante à 1 mg/kg IV, similaire à celle de la morphine à 6 mg/kg par voie intra-péritonéale (IP) ou à 2 mg/kg IV. De plus, l'effet antalgique induit par l'opiorphine est bloqué en présence d'un antagoniste des récepteurs opioïdes, la naloxone, ce qui indique que son action antinociceptive est relayée par les voies opioïdiques endogènes dépendantes de ces récepteurs (Wisner et al., 2006).

Le but des études sur le rat était de comparer l'opiorphine avec la morphine dans leur efficacité analgésique, en termes de durée et d'intensité des réponses, et de survenue des effets indésirables majeurs, avec un accent sur le profil d'effets indésirables à des doses équi-analgésiques. Une conclusion était que l'opiorphine suscite des effets indésirables minimes associés à la morphine, pour des doses systémiques actives de 1 à 2 mg/kg par voie intraveineuse (IV) (Rougeot et al., 2010). Ces doses produisent une analgésie comparable dans les modèles, bien établis et validés expérimentalement, de douleur sensible à la morphine chez le rat. Ces modèles incluent une nociception aiguë induite mécaniquement et contrôlée au niveau spinal, une nociception aiguë induite thermiquement et contrôlée au niveau spinal et une nociception aiguë, tonique et inflammatoire, induite chimiquement. Ces données sont également comparables avec celles d'autres études démontrant que l'effet supprimeur de la douleur par l'administration d'opiorphine à des doses centrales actives de 5 µg/kg par voie intra cérébro ventriculaire (ICV) est aussi efficace que la morphine à 10 µg/kg par voie ICV sur la douleur aiguë induite thermiquement, chez la souris (Tian et al., 2009). Compte tenu de toutes les données, il est important de signaler qu'à travers ces quatre modèles de douleurs induites par des stimuli de modalité et d'intensité différentes, l'opiorphine est aussi efficace que la morphine en termes de délai d'action et d'effet-dose. Cependant, elle semble moins

efficace que la morphine au niveau de la puissance inhibitrice maximale et de la durée d'action. Plus généralement, le pouvoir analgésique de l'opiorphine varie de 30 à 60%, à une dose de 1 à 2 mg/kg IV ou 5 µg/kg ICV, alors qu'il varie de 40 à 80% pour la morphine à 1 à 2 mg/kg IV, 6 mg/kg IP ou 10 µg/kg ICV. Comme observé par d'autres groupes de recherche utilisant des inhibiteurs synthétiques de la NEP et de l'APN, l'inhibiteur naturel qu'est l'opiorphine ne produit pas l'effet analgésique maximum produit par la morphine (Noble & Roques, 2007 ; Noble et al., 2008). Cette observation laisse suggérer que le niveau local d'enképhalines endogènes, libérées en réponse aux stimuli nociceptifs et protégées ensuite de la dégradation par l'opiorphine, soit trop faible pour saturer les récepteurs aux opioïdes. Un tel mécanisme intégré protège les récepteurs d'une sur-stimulation comme c'est le cas dans l'induction causée par les agonistes μ -opioïdes exogènes, comme la morphine.

Il a été montré que la réponse analgésique induite par l'administration systémique d'opiorphine dans la douleur inflammatoire chimique chez le rat requiert préférentiellement l'activation des voies μ -opioïdes endogènes (Rougeot et al., 2010). Les récepteurs μ sont des composants critiques du système opioïde, nécessaires à l'action antinociceptive des ligands opioïdes sur les neurones cibles périphériques et spinaux. Une autre étude a montré que l'effet analgésique induit par l'administration centrale d'opiorphine, dans le modèle de douleur thermique chez des souris, se produit via l'activation des récepteurs endogènes μ et δ -opioïdes (Matthes et al., 1996). Par ailleurs, dans des études de liaisons utilisant des cellules portant les récepteurs opioïdes, il a été montré que contrairement aux agonistes opioïdes, l'opiorphine ne se lie pas directement aux récepteurs μ et δ -opioïdes, même pour des concentrations inhibitrices des ectopeptidases (Tian et al., 2009). Ainsi, tous ces résultats ont amené les chercheurs à conclure que l'opiorphine est un inhibiteur de la perception de la douleur via l'activation des voies μ et δ -opioïdes, dépendante des enképhalines endogènes libérées en réponse aux stimuli douloureux.

De façon intéressante, l'opiorphine est dix fois plus puissante, en terme de dose-effet dans l'efficacité de suppression de la douleur, par rapport à l'inhibiteur synthétique de la NEP et de l'APN, RB101 (10-20 mg/kg IV) (Noble & Roques, 2007 ; Noble et al., 2008). Cela suggère que le double inhibiteur naturel qu'est l'opiorphine, porte une signature structurale, adaptée in vivo en terme d'affinité, de sélectivité et de biodisponibilité, aux caractéristiques fonctionnelles et topologiques de ses cibles. En outre, le faible degré de risques d'addiction et

de tolérance, observé après traitement subchronique avec l'opiorphine, comparé à la morphine, peut résulter d'une occupation limitée et d'une stimulation spécifique des récepteurs opioïdes, ainsi que d'un mécanisme non altéré de recyclage des récepteurs opioïdes dans un état pleinement actif à la surface cellulaire (Yoburn et al., 2004). Conformément aux résultats, l'opiorphine augmente la durée de vie des enképhalines endogènes qui sont libérées en relation avec la nature et l'intensité du stimulus douloureux dans les voies spécifiquement impliquées dans le contrôle de la nociception. Elle pourrait ainsi activer de manière spécifique et limitée les voies dépendantes des récepteurs opioïdes, minimisant ainsi la stimulation excessive des récepteurs opioïdes et l'apparition des effets indésirables qui sont associés aux agonistes opiacés exogènes tels que la morphine.

Un ensemble important de données fournit également des preuves de l'existence d'interactions bidirectionnelles fonctionnelles entre la transmission des opioïdes endogènes et la dopamine pour moduler les comportements émotionnels de la motivation et du plaisir (Ambrose et al., 2006). C'est probablement une des raisons majeures pour lesquelles l'administration systémique répétée d'opiorphine, à une dose analgésique, activant les voies opioïdes endogènes, induit une pharmacodépendance modérée, soit chez 40% des rats traités mais pas un effet de manque comme celui associé aux opioïdes (Noble & Roques, 2007 ; Noble et al., 2008).

Il a été déclaré que tout analgésique qui produit moins d'effets indésirables que la morphine à des doses équianalgésiques serait un progrès puisqu'il améliorerait la qualité de vie du patient (Mordarski et al., 2009). Il est clair que d'après les données présentées, l'opiorphine pourrait conduire à de nouveaux analgésiques dotés d'une puissance antinociceptive similaire à celle de la morphine, mais avec une propension limitée à induire les effets indésirables des opioïdes. L'optimisation chimique de l'opiorphine, pour générer des dérivés fonctionnels dotés d'une biodisponibilité (lipophilie et résistance métabolique) améliorée par rapport au peptide natif, pourrait conduire à une nouvelle classe de composés analgésiques (Rougeot et al., 2010).

3. Analyse structure fonction de l'opiorphine

Une étude de mutagenèse dirigée a été menée sur l'opiorphine et a démontré que pour une substitution de la Phénylalanine en position 3 (par une alanine) : l'analogue est moins actif,

indiquant ainsi le rôle important que ce résidu aromatique peut jouer dans l'activité de liaison et de la spécificité de l'opiorphine avec ses deux cibles, NEP et APN (Rosa et al., 2012).

Les 5 résidus de l'opiorphine ont été remplacés par mutagenèse dirigée par des résidus Alanine (Tableau 2). Afin d'améliorer les propriétés biologiques de l'opiorphine à travers l'halogénéation de Phe3, il a été constaté que l'ortho- et para-halogénéation du cycle aromatique Phe3 ne conduisent pas de l'opiorphine à des nouvelles liaisons halogènes qui stabilisent les interactions. De plus, la fluoration bloque complètement son activité inhibitrice de l'enzyme. Une autre préparation d'une série de dérivés substitués Phe3 a montré que la substitution de la L-Phe3 par D-Phe3 augmente l'activité inhibitrice de l'opiorphine par rapport à l'APN par 1 ordre de grandeur tout en diminuant son activité d'inhibition par rapport à la NEP. (Rosa et al., 2012)

peptide	compound	sequence	hAP-N IC ₅₀ ± SD (µM)	hNEP-endoP IC ₅₀ ± SD (µM)
1	opiorphin	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8.1 ± 0.1	30 ± 3
2	[Ala ¹]-opiorphin	H-Ala-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	37 ± 3	>70
3	[Ala ²]-opiorphin	H-Gln-Ala-Phe-Ser-Arg-OH	65 ± 3	12 ± 1
4	[Ala ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-Ala-Ser-Arg-OH	>70	»100
5	[Ala ⁴]-opiorphin	H-Gln-Arg-Phe-Ala-Arg-OH	47 ± 2	39 ± 2
6	[Ala ⁵]-opiorphin	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Ala-OH	>70	33 ± 2

Tableau 2 : Inhibition de l'APN et la NEP par les analogues de l'opiorphine (Rosa et al.,2012).

Des études de Résonance Magnétique Nucléaire et des calculs de mécanique moléculaire sur D-Phe3 ont montré que l'amélioration de la puissance d'inhibition de l'APN observée, peut être due à des interactions d'empilement CH-π entre le cycle aromatique de Phe3 et le proton Hγ de Arg2, ce qui concerne que l'analogue D-Phe3 (Figure 17).

Cette première étude structure activité de l'opiorphine n'a pas donné suite à un double inhibiteur NEP et APN plus puissant, mais a permis d'identifier une stratégie visant à accroître son activité d'inhibition APN en fournissant simultanément des analogues plus stable métaboliquement que le peptide natif (Rosa et al., 2012)

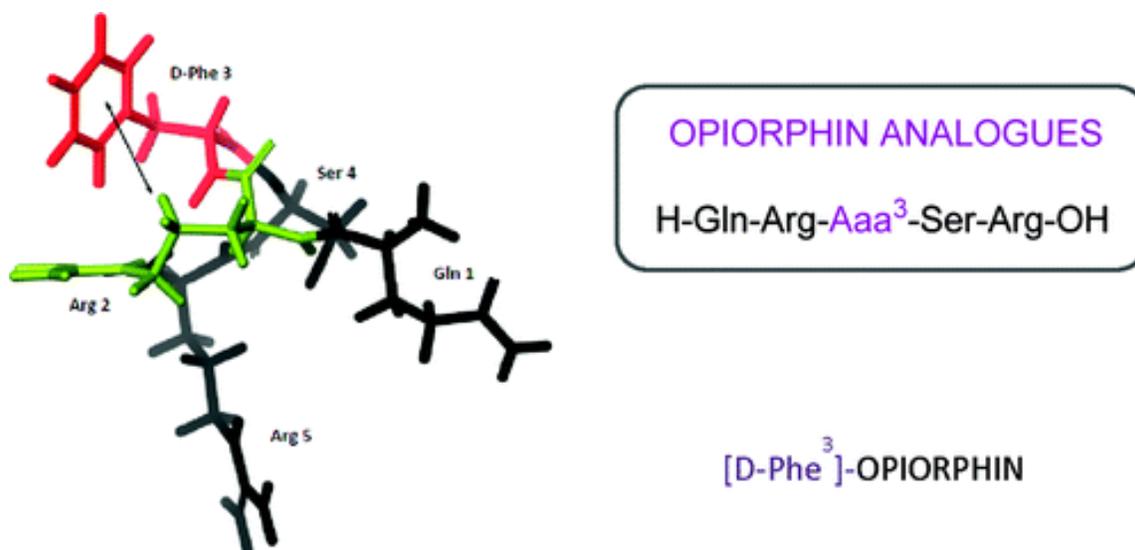


Figure 17 : Structure du modèle de la [D-Phe³]-opiorphine montrant l'interaction éventuelle entre les protons H γ de Arg2 en vert et D-Phe3 en rouge (Rosa et al., 2012).

Une autre équipe a travaillé sur les profils de conformation du peptide endogène opiorphine et de ses sept analogues présentant les différentes activités inhibitrices vis-à-vis de l'aminopeptidase N humaine et la néprilysine humaine (Pinto et al., 2012). Les activités inhibitrices ont été calculées indépendamment pour en déduire une conformation bioactive que l'Opiorphine pourrait adopter lors de la liaison avec ces deux enzymes. Les résultats obtenus fournissent une explication structurale de la double activité inhibitrice de l'opiorphine vis-à-vis de l'APN et la NEP. Les résultats montrent que la flexibilité innée de cette dernière est essentielle pour son activité analgésique, et souligne la complexité de conception de doubles inhibiteurs APN et NEP (Tableau 3).

peptide	name	sequence	IC ₅₀ (μ M)	
			hAPN	hNEP
1	Opiorphin	Q R F S R	8 \pm 1	30 \pm 3
2	Opiorphin-(3-5)	F S R	120 ^b	7 ^b
3	Opiorphin-(2-5)	R F S R	27 ^b	\sim 180 ^b
4	Opiorphin-(1-4)	Q R F S	75 ^b	\gg 100 ^b
5	[Asn ¹]-Opiorphin	N R F S R	\gg 100	\sim 130
6	[Thr ⁴]-Opiorphin	Q R F T R	\gg 100	\gg 100
7	[Phe ⁰]-Opiorphin	F Q R F S R	122	51 \pm 7
8	[Cys ⁰]-Opiorphin	C Q R F S R	0.8 \pm 0.1 ^b	7 \pm 3 ^b

Tableau 3 : Activité inhibitrice in vitro de l'opiorphine et de ses analogues vis-à-vis de l'APN humaine et de la NEP humaine. D'après (Pinto et al., 2012)

Le peptide 2 : F-S-R les trois derniers résidus de l'opiorphine, est considéré comme inactif puisque son IC₅₀ = 120 μ M vis-à-vis de l'APN, même s'il inhibe mieux la NEP que

l'opiorphine. Le peptide 3 : R-F-S-R les quatre derniers résidus de l'opiorphine, est considéré comme inactif puisque son $IC_{50} = 180 \mu M$ vis-à-vis de la NEP. Le peptide 4 : Q-R-F-S les quatre premiers résidus de l'opiorphine, est considéré comme inactif puisque son $IC_{50} > 70 \mu M$ vis-à-vis de l'APN, et son $IC_{50} > 100 \mu M$ vis-à-vis de la NEP. Le peptide 5 : N-R-F-S-R et le peptide 6 : Q-R-F-T-R sont considérés comme inactifs puisque leurs $IC_{50} > 100 \mu M$ vis-à-vis de l'APN et de la NEP. Le peptide 7 : F-Q-R-F-S-R le premier hexa-peptide des analogues, est considéré comme inactif puisque son $IC_{50} > 100 \mu M$ vis-à-vis de l'APN, même si son $IC_{50} = 51 \mu M$ vis-à-vis de la NEP. Enfin le deuxième hexa-peptide C-Q-R-F-S-R et le seul double inhibiteur des analogues, ce qui nous donne une idée de l'existence d'un espace supplémentaire dans la poche de liaison qui permet d'accueillir des peptides plus longs qu'un penta-peptide. La nature et le volume du résidu Cystéine sont également des déterminants importants de l'activité enzymatique.

En conclusion, concernant l'activité inhibitrice de l'APN, les peptides 1, 3, sont actifs ($IC_{50} < 50 \mu M$), tandis que les peptides 2, 4-7 sont considérés comme inactifs ($IC_{50} > 70 \mu M$). En ce qui concerne la NEP-h, les bons candidats sont les peptides 1, 2, 7 et 8, tandis que les peptides 3-6 sont considérés comme inactifs. Seuls l'opiorphine et l'analogue 8, sont considérés comme de véritables des double inhibiteurs de l'APN et de la NEP *in vitro*.

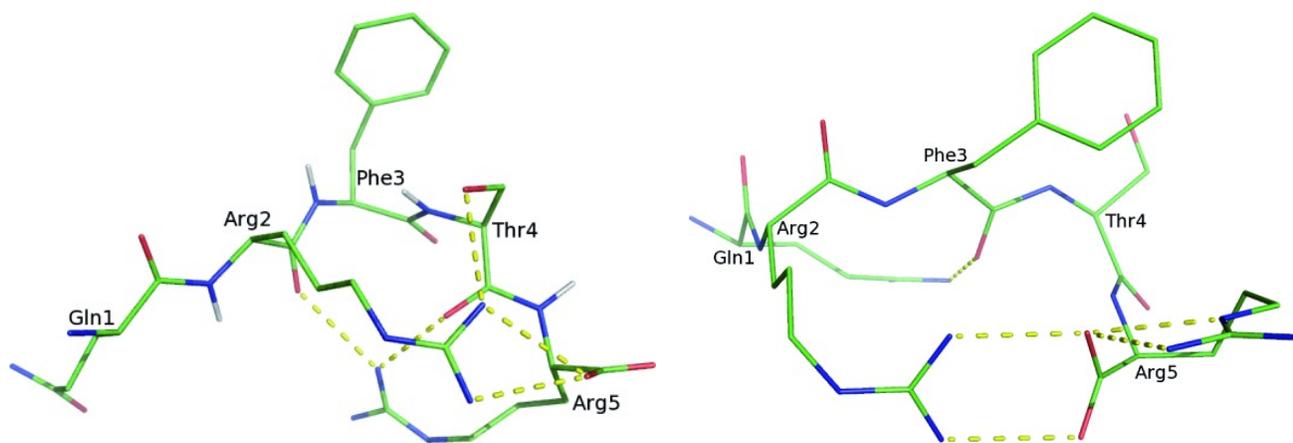


Figure 18 : (a) Représentation de la structure 3D de l'opiorphine bioactive pour l'inhibition de APN. (b): Représentation de la structure 3D de l'opiorphine bioactive pour l'inhibition de la NEP. Des liaisons hydrogène intramoléculeaires sont indiquées par des tirets. Les atomes d'hydrogène des chaînes latérales ont été omises pour plus de clarté. D'après (Pinto et al., 2012)

Pour cela, une étude structure activité a été menée pour déterminer les groupes fonctionnels du peptide impliqués dans l'activité inhibitrice vis-à-vis des deux ectopeptidases. Il a été découvert

que les trois acides aminés de la partie N-terminale sont essentiels à l'activité anti-APN, que les trois acides aminés de la partie C-terminale sont essentiels à l'activité anti-NEP et que la phénylalanine centrale est un résidu fondamental essentiel aux deux activités (Figure 18 ; Pinto et al., 2012).

VII. Les tiques

1. Généralités

Les tiques sont des acariens hématophages qui passent une partie de leur cycle fixés sur leur hôte vertébré pour se nourrir de leur sang. D'autre part, la morsure de la tique n'engendre pas de réactions nociceptives chez son hôte au cours de son long repas sanguin, laissant présager la sécrétion, via la salive, de substances anti-douleur puissantes lors du gorgement. Cet Acarien représente donc un modèle de choix pour la mise en évidence d'autres analogues membres de la super-famille de l'opiorphine et de la sialorphine. Les tiques sont des hématophages obligatoires ectoparasites de nombreux hôtes comme les mammifères, oiseaux et reptiles. Actuellement, 31 genres, et environ 900 espèces de tiques, ont été identifiés partout dans le monde (Camicas et al., 1998). Les tiques sont nuisibles pour leurs hôtes à la fois directement et indirectement : directement, ils sont responsables des plaies de la peau, la perte de sang, ainsi que les toxicoses de tiques (Peter et al., 2005). Simultanément, leurs morsures pourraient également être les sites d'infections microbiennes secondaires. Indirectement, les tiques sont des vecteurs compétents de plusieurs agents pathogènes, responsables des taux élevés de morbidité et de mortalité chez les humains et animaux partout dans le monde. Ils sont effectivement des vecteurs les plus importants dans le monde entier après les moustiques, pour les humains, et ceux qui transmettent la plus large variété d'agents pathogènes y compris les virus, les bactéries et les parasites (de la Fuente et al., 2008).

Récemment, en raison de l'intensification des mouvements humains et animaux et les changements socio-économiques et environnementaux, la répartition géographique de plusieurs espèces de tiques s'est élargie. La liste potentielle des agents pathogènes transmis par les tiques (PAD) est en constante évolution, et l'émergence ou la réémergence des maladies transmises par les tiques (MTT) est devenue de plus en plus un problème (Dantas-Torres et al., 2012). Dans ce contexte, il est essentiel d'identifier clairement les agents pathogènes associés aux tiques, ainsi que de comprendre les interactions complexes entre les tiques et les agents pathogènes qu'ils transmettent, dans le but d'élaborer des stratégies de contrôle efficaces.

En raison du succès limité et des inconvénients (résistance, danger de l'environnement, augmentation des coûts) de contrôler les maladies transmises par les tiques via les acaricides, de nouvelles approches sont effectivement un besoin urgent (Willadsen, 2004). La première étape qui limite le développement de vaccins anti-tiques est l'identification de nouvelles cibles antigéniques (Mulenga et al., 2000). Pour identifier les composants de tiques responsables de la transmission d'agents pathogènes et l'inclure dans les vaccins, le dépistage devrait idéalement se concentrer sur les gènes qui sont hautement exprimé dans la salive de tiques, et plus précisément sur les gènes dont l'expression est induite dans la glande salivaire (SG). Par conséquent, la recherche sur les interactions moléculaires entre les tiques, les hôtes, et les pathogènes ainsi que l'identification de cibles antigéniques appropriés est un important débat pour la mise en œuvre de stratégies de contrôle des MTT.

Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) a un cycle de développement triphasique, c'est l'espèce de tiques la plus répandue en Europe. Elle est fréquemment associée à des morsures chez les humains. Elle peut transmettre le virus de l'encéphalite à tiques, les bactéries comme *Babesia spp.*, *Borrelia burgdorferis. l.*, *Rickettsia spp.*, *Anaplasma sp.*, et dans une moindre mesure *Bartonella spp* (Parola & Raoult, 2001).

2. Taxonomie et morphologie

Les tiques *Ixodida* sont des arthropodes qui appartiennent à la classe des arachnides et à la sous-classe des *Acarida*. Les *Ixodida* sont composées de quatre familles, *Ixodidae* et *Amblyommidae* (les tiques dures), *Argasidae* (les tiques molles) et les *Nuttalielidae* (*Nuttalielidae Namaqua*), selon la classification établie par Camicas (*Figure 19*).

Les tiques dures (plus que 700 espèces) se distinguent des molles (environ 200 espèces) par la présence d'un scutum ou un bouclier dur. La famille des *Nuttalielidae* ne contient qu'une seule espèce, une tique qui se trouve en Afrique du sud avec une morphologie qui est entre les tiques dures et molles. Les *Argasidae* peuvent être trouvées partout dans le monde, se gorgent rapidement par rapport aux tiques dures, préfèrent surtout les oiseaux, et sont rarement parasites des animaux terrestres ou des humains. Par contre c'est le cas pour les tiques dures comme *I. ricinus*. La description morphologique générale des trois grandes familles de tiques est schématisée sur la *Figure 20*. Comme tous les *Ixodidae*, *I. ricinus* a un scutum sclérifié sans yeux, et se caractérise par la position apicale de ses pièces buccales : l'hypostome et la forme de voûte de sa fissure anale.

3. Distribution géographique

I ricinus, souvent appelé tiques de graines de Ricin ou tiques de moutons, est l'espèce la plus répandue en Europe. En France la distribution, régie par les exigences de température et surtout d'humidité de l'espèce, couvre l'ensemble du territoire, à l'exclusion des zones d'altitude (au-dessus de 1300-1500 m, peut-être 1700 m dans les Pyrénées), et des biotopes secs méditerranéens, où cependant peuvent se rencontrer de petites populations en sites frais. Elle est aussi largement distribuée de l'Europe Nord-Ouest à l'Asie centrale (Iran) et de la Scandinavie à l'Afrique du Nord. Elle est présente dans les habitats méditerranéens relativement secs en Afrique du Nord et dans la péninsule ibérique, dans les pâturages de moutons humides de l'Irlande, Ecosse, Pays de Galles et Angleterre, et dans les biotopes forestiers, notamment en Scandinavie et en Russie occidentale. La Répartition géographique des tiques *I. ricinus* a remarquablement diminuée ces dix dernières années. (Figure 21 EFSA., 2010).

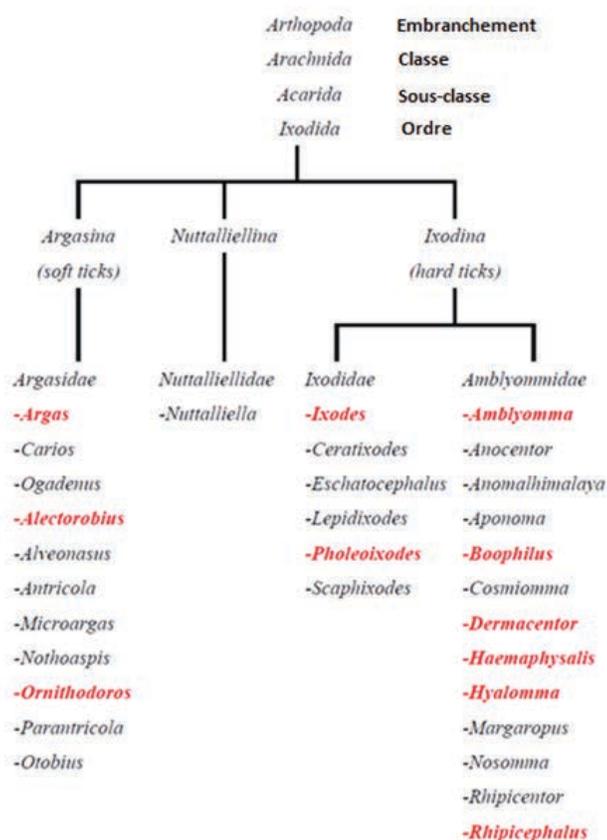


Figure 19 : Classification des tiques (de Camicas J, et al., 1998). Les genres indiqués en rouge correspondent aux espèces impliquées dans la transmission de pathogènes.

4. Cycle biologique

Les tiques sont des arthropodes hématophages stricts car elles se nourrissent exclusivement de sang. Ce sont des ectoparasites qui ont une alternance de phases parasitaires sur hôtes, souvent de courte durée, de quelques minutes pour les *Argasina*, à moins d'une semaine pour les *Ixodina* (à l'exception des grosses espèces comme les *Amblyomma* dont la phase parasitaire de la femelle peut atteindre deux semaines), et de phases libres au sol, de durée toujours beaucoup plus longue, de l'ordre de semaine ou mois. Des œufs pondus par les femelles, éclosent des larves qui, après gorgement, se métamorphosent pour donner des nymphes, puis pour donner des adultes, mâles ou femelles ; les tiques ont donc trois stades de développement.

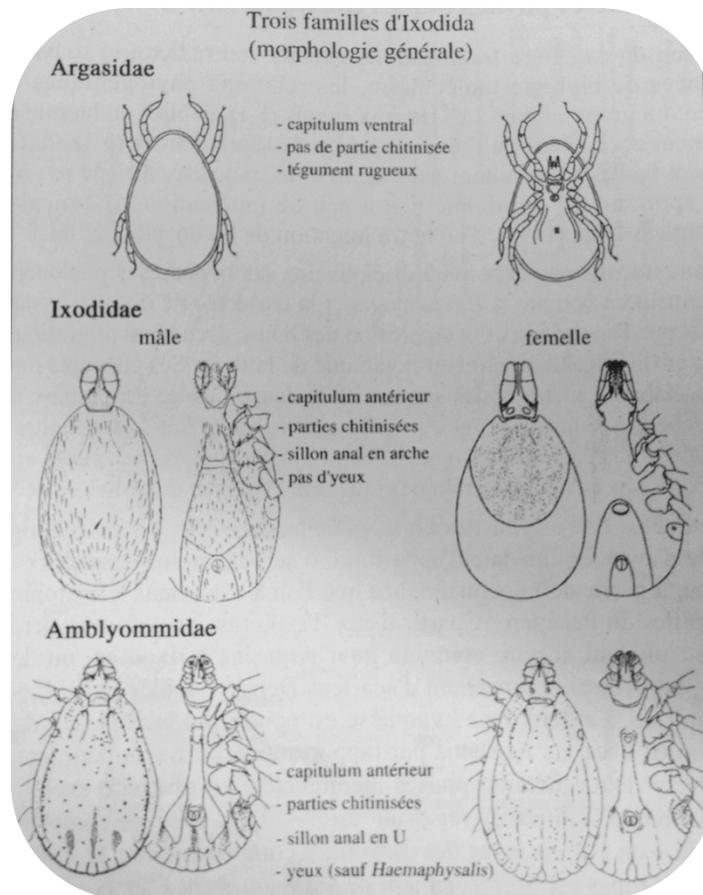


Figure 20 : Schéma de la morphologie générale distinctive du stade adulte des trois familles de tiques (Pérez-Eid, 2007).

4.1. Types de cycles : nombre et nature des hôtes

Différents types de cycles régissent le développement des diverses espèces de tiques, ces cycles se différenciant à la fois par le nombre d'hôtes et par leur nature. En considérant le

nombre des hôtes, c'est-à-dire le nombre de phases parasitaires, on distingue chez les tiques quatre types de cycles :

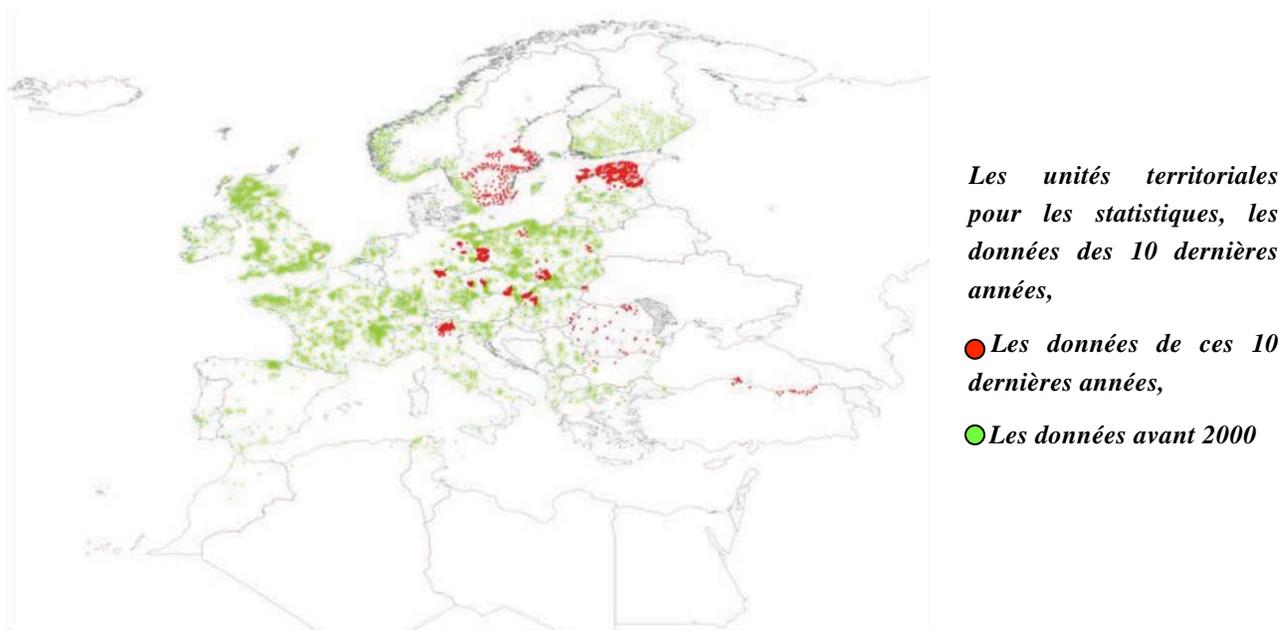


Figure 21 : Répartition géographique des tiques *I. ricinus* (de European Food Safety Agency Journal 2010, EFSA).

Les cycles polyphasiques : ce sont des cycles comportant de multiples phases parasitaires ; ils concernent les *Argasina* dont toutes les espèces effectuent de multiples repas.

Les cycles triphasiques : ce sont des cycles comportant trois phases parasitaires, une pour chacun des trois stades : larvaire, nymphal, adulte, essentiellement femelle. C'est la règle quasi générale, plus de 80% des espèces d'*Ixodina* dans le monde ont ce type de cycle ;

Les cycles diphasiques : ce sont des cycles comportant deux phases parasitaires, larve et nymphe effectuent chacune leur repas sur le même animal (le site de piqûre de la nymphe est proche mais non identique à celui de la larve contractant ainsi les deux repas en une seule phase parasitaire; l'adulte effectue sa phase parasitaire sur un autre animal. Quelques espèces de *Hyalomma* et de *Rhicephalus* seulement ont ce type de cycle contracté ;

Les cycles monophasiques : ce sont des cycles comportant une unique phase parasitaire résultant de la succession des trois repas sur le même animal. C'est le cas de cinq espèces de *Boophilus*, des deux *Anocentor*, des trois *Margaropus* et de *Hyalomma detritum scupense*.

Toutes les espèces d'*Ixodina* endémiques de la faune de France métropolitaine sont

triphases, à l'exception de deux d'entre-elles qui sont diphasiques. Il s'agit de *Rhipicephalus bursa*, espèce méditerranéenne bien implantée dans le sud de la France et en Corse. Parmi les espèces occasionnelles, *Boophilus annulatus* est monophasique ainsi que *Hyalomma detrium scupense*, tandis que *Hyalomma detrium detrium* est diphasique. Les Argasina de France, comme ceux du monde entier, sont polyphasiques.

D'un point de vue de la nature des hôtes, on classe les tiques en trois catégories :

Les tiques trixènes (*xenos* en grec signifie hôte), ou tritropes (terme remplacé par celui de télotropes car c'est surtout le dernier stade, l'adulte, qui présente un tropisme d'hôte), dans lesquels le tropisme d'hôte est différent pour chacune des trois phases parasitaires. Ce type de cycle présenterait l'avantage de l'acceptation d'une large gamme de groupes animaux et donc du maximum de chances de réalisation du cycle. Les espèces régies par ce type de cycle appartiennent aux genres les plus anciens : tous les *Ixodidae*, et certaines *Amblyomma* et *Heamaphysalis* ;

Les tiques dixènes ou ditropes dont le tropisme ne s'exerce que vis-à-vis de deux groupes d'hôtes. Aux stades larvaire et nymphal, ces tiques, vivent dans les abris de leurs hôtes, mammifères (surtout myomorphes), oiseaux reptiles etc, et sont donc endophiles à ces stades ; au stade adulte, elles se tournent vers les grands mammifères, lesquels vivent dans des biotopes ouverts et de grandes dimensions. Le ditropisme ne s'observe que chez certains genres d'Amblyommidés, d'évolution plus récente, notamment *Dermacentor*, *Rhipicephalus* et *Hyalomma*. C'est le reflet de l'apparition en parallèle de leurs deux types d'hôtes mammifères favoris, les Myomorphes et les ongulés.

Les tiques monoxènes, ou monotropes dont le tropisme ne s'exerce que vers un unique groupe d'hôtes. C'est le mode évolutif le moins exposé au hasard, puisqu'il n'y a recherche d'hôtes, avec tous les aléas que cela comporte, qu'à une seule reprise. Les tiques sont alors totalement endophiles et parasitent des hôtes dont les abris sont de taille restreinte ; si elles sont exophiles, elles vivent aux dépens d'animaux présents en forte densité (cas de *Boophilus*). (Pérez-Eid, 2007)

4.2. Exemple de *Ixodes ricinus*

4.2.1 Généralités

I. ricinus a un cycle qui comprend trois stades évolutifs: la larve, la nymphe et l'adulte, avec une taille qui varie de 2 à 30 mm (Figure 22). Comme tous les arachnides, la larve se distingue

facilement, outre la petite taille, elle ne possède que 3 paires de pattes alors que les nymphes et adultes en possèdent 4 paires.



Figure 22 : Cycle De vie d'*I. ricinus*. De gauche à droite: larve, nymphe, adulte femelle, adulte mâle (Stanek et al., 2012)

Sur le terrain, le cycle de vie prend environ 1,5 à 2 ans et la durée de ce cycle varie en fonction des conditions environnementales et de la disponibilité des hôtes. Pour compléter son cycle, *I. ricinus* a besoin de trois hôtes. Le repas sanguin se produit une fois dans chaque stade évolutif sauf chez le mâle adulte, et prend de deux à dix jours (Figure 23). Les humains peuvent être des hôtes de chacun des stades. (Krober & Guerin, 2007).

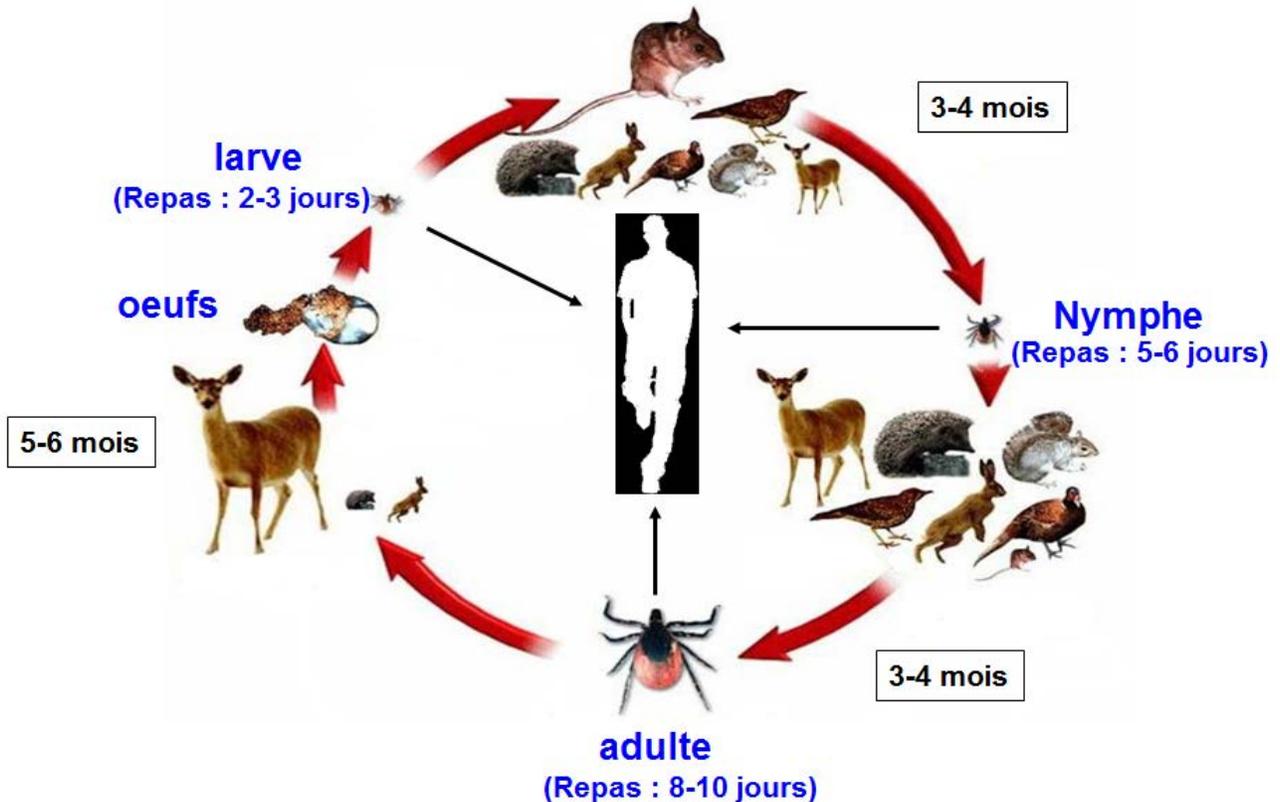


Figure 23 : cycle biologique *I. ricinus*: la taille des animaux est en fonction des préférences trophiques de chaque stade évolutif

Les larves émergent en 5-6 mois à partir d'œufs pondus par la femelle adulte gorgée. Elles se nourrissent habituellement sur de petits animaux comme les rongeurs et/ou les oiseaux. Après le gorgement qui dure 2-3 jours, elles se détachent de leurs hôtes et 3-4 mois plus tard, les larves muent en nymphes sur le terrain (Figure 23). Les nymphes se nourrissent habituellement dans l'année qui suit la mue, de plus grands animaux tels que les oiseaux ou les écureuils. Après 5 ou 6 jours de repas sanguin, elles se détachent de leurs hôtes et 3-4 mois plus tard, muent en adultes, soit mâles ou femelles. Les femelles adultes s'accrochent à des hôtes de grande taille comme le cerf ou le bétail. Les mâles adultes ne se gorgent pas de sang, mais ils peuvent rester sur l'hôte pendant une longue période pour attendre une femelle adulte. L'accouplement peut se produire sur le sol mais aussi sur l'hôte et il est nécessaire pour que la femelle finisse son repas. Les femelles prennent du volume après un repas qui dure 8-10 jours, leur poids augmente de 100 fois ou plus (Figure 24). Après deux semaines, une femelle adulte pond jusqu'à 3000 œufs sur le sol.



Figure 24 : Femelle d'*I. ricinus* non gorgée et gorgée

4.2.2. Pathogènes transmis par *Ixodes ricinus*

L'incidence des maladies transmises par les tiques a augmenté ces dernières années, et les plus importantes, sont transmises par *I. ricinus*. En outre, avec le développement de la biologie moléculaire, il est maintenant possible d'identifier de nombreux agents, qui peuvent être transmis aux humains et aux animaux par les tiques. Une liste des agents pathogènes reconnus comme transmis par *I. ricinus*, est présentée dans le Tableau 4. Cette liste sera sans doute prolongée dans le futur vu que le comportement ubiquiste de *I. ricinus* lui assure d'être à la fois abondante et en contact avec un grand nombre de germes pathogènes. Il fait d'elle un excellent vecteur de plusieurs germes affectant les hommes et les animaux. Elle est impliquée dans deux maladies humaines, répandues et graves, ainsi que dans une maladie animale à fort impact économique :

- L'encéphalite à tiques : due à un virus du genre *Flavivirus*, virose neurologique grave, parfois mortelle avec une incidence. Cette encéphalite, connue en Sibérie depuis les

années 1930, et progressivement découverte en Europe après la seconde guerre mondiale, n'a été décelée en France qu'en 1971 (Hannoun et al., 1971) avec le premier cas observé en Alsace.

- La borréliose de Lyme : due à des spirochètes du genre *Borrelia* dont principalement trois espèces sont pathogènes pour l'homme et les animaux : *B. afzelii*, *B. burgdorferi s. stricto*, *B. garinii*. C'est la maladie à vecteurs la plus fréquente chez l'homme en France, comme en Europe, et même dans l'hémisphère nord.
- La babésiose bovine : due au protozoaire *Babesia divergens*, bien connue des vétérinaires et des éleveurs de bovins, largement distribuée sur le territoire français dans toutes les zones d'élevage bovin (L'Hostis & Seegers, 2002).

Pathogènes	Maladies	Principal réservoir
<u>Babesia genus</u>		
<i>B. divergens</i>	babésiose des bovins*	bovins
<i>Babesia</i> sp. EU1	babésiose des humains*	chevreuil
<i>B. microti</i>	babésiose des humains*	rongeurs
<u>Borrelia genus</u>		
<i>B. afzelii</i>	Lyme *	rongeurs
<i>B. bavariensis</i>	Lyme *	rongeurs
<i>B. bissettii</i>	inconnue	rongeurs
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Lyme *	rongeurs, oiseaux
<i>B. finlandensis</i>	Non-pathogénique	lièvres
<i>B. garinii</i>	Lyme *	rongeurs, oiseaux
<i>B. lusitaniae</i>	inconnue	rongeurs, lézards
<i>B. spielmanii</i>	Lyme *	rongeurs
<i>B. valaisiana</i>	inconnue	oiseux, lézards
<u>Bartonella genus</u>		
<i>B. henselae</i>	griffes du chat *	Chats
<i>B. birtlesii</i>	inconnue	rongeurs
<u>Flaviviridae, Flavivirus</u>		
Virus de méningo-encéphalite à tiques	encéphalite à tiques *	rongeurs
virus de Louping	Louping	moutons
<u>Rickettsia genus</u>		
<i>R. helvetica</i>	fièvre non-éruptive *	cerfs
<i>R. monacensis</i>	Fièvre boutonneuse méditerranéenne *	Inconnu
<u>Other genus</u>		
<i>A. phagocytophilum</i>	Human granulocytic anaplasmosis*	Moutons, chiens, bovins

Tableau 4 : Liste des pathogènes connus transmis par *I. ricinus*, leur principal réservoir vertébré, et les maladies à tiques (*zoonoses). (Jahfari et al., 2012 ; Severo et al., 2012 ; Reis et al., 2011 ; Cotte et al., 2008)

4.3. Exemple d'*Amblyomma variegatum*

4.3.1. Généralités

A. variegatum a un cycle qui comprend trois stades évolutifs: la larve, la nymphe et l'adulte, séparés par les métamorphoses larvaires puis nymphales. Elle a une taille qui varie de 5 à 30 mm. Comme tous les arachnides, la larve se distingue facilement, outre la petite taille, elle ne possède que 3 paires de pattes alors que les nymphes et adultes en possèdent 4 paires. (Figure 25)



Figure 25 : adulte mâle d' *Amblyomma variegatum* (Lee et al., 2015)

La tique *A. variegatum* est aujourd'hui présente dans les Antilles, dans plus de trente pays d'Afrique ainsi qu'aux Comores, Madagascar et les Mascareignes. C'est une tique à trois hôtes (cycle trixène) : chacun des stades successifs infeste un animal sur lequel elle effectue un unique repas sanguin (Figure 26). La durée du repas d' *A. variegatum* varie de 7 à 15 jours selon les stades. Sur un plan épidémiologique, le risque de transmission d'agents pathogènes entre les hôtes est augmenté. Après gorgement, la tique se détache de son hôte et tombe au sol pour se métamorphoser ou pondre (Petney et al., 1987 ; Chartier et al., 2000). Elle est dite exophile, son habitat étant représenté par des milieux ouverts et herbacés (Rosa et al., 2012).

La tique *A. variegatum* se nourrit sur un très large spectre d'hôtes: bovins, caprins, ovins, porcs, chevaux, chiens. Néanmoins, de nombreuses études ont confirmé le caractère télotrope d'*A. variegatum* (Figure 26). La taille des animaux est en fonction des préférences trophiques de chaque stade évolutif: les tiques adultes s'accrochent préférentiellement sur les grands herbivores, en particulier les bovins, larves et nymphes sont ubiquistes avec une préférence pour

les herbivores (Petney et al., 1987). La majorité des tiques se fixe de façon provisoire sur les parties du corps des bovins auxquelles elles ont facilement accès pendant qu'elles sont dissimulées dans la végétation, c'est-à-dire les pieds, ou, plus exactement, les espaces interdigités. La fixation a lieu généralement dans les zones du corps à peau fine (Stachurski, 2000). Les adultes forment des amas de grande taille sur les zones infestées, d'où les lésions graves occasionnées sur les hôtes. Ils se localisent sur les parties déclives du corps : de la mamelle au poitrail, avec une prédominance nette pour la région inguinale et axillaire. En ce qui concerne les larves, elles sont localisées au niveau des oreilles chez les bovins et caprins. Les nymphes ont surtout une localisation podale chez ces deux mêmes hôtes (Chartier et al., 2000).

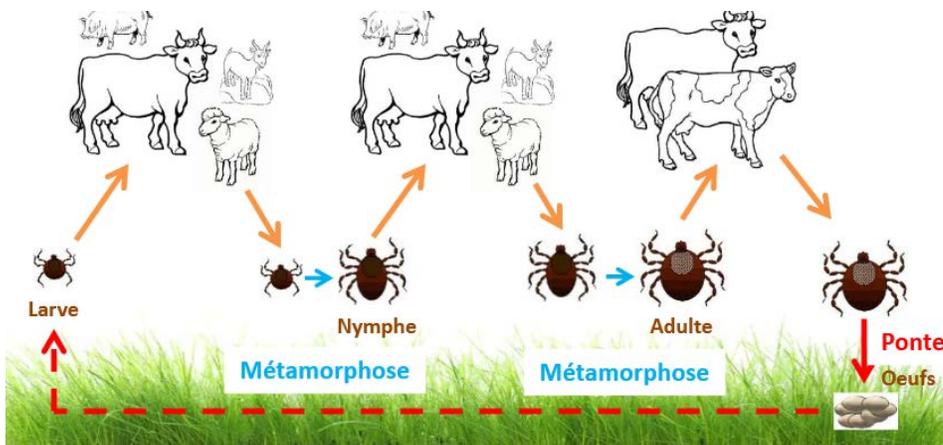


Figure 26 : Cycle biologique de la tique *Amblyomma variegatum* (d'après Chartier et al., 2000)

4.3.2. Pathogènes transmis par *Amblyomma variegatum*

A part l'altération de la croissance (perte de 50 g de poids vif par femelle gorgée) et de la survenue de blessures parfois étendues de la mamelle, cette tique peut entraîner une forte diminution de la production laitière et une augmentation de la mortalité des veaux insuffisamment alimentés (Stachurski, 2000). *A. variegatum* est l'une des espèces causant le plus de pertes aux ruminants d'Afrique tropicale vu que c'est un vecteur de pathogènes (Chartier et al., 2000 ; Stachurski & Lancelot, 2006). Les principales maladies transmises sont :

- La cowdriose : due à *Ehrlichia ruminantium* (Dumler et al., 2001) appartenant à l'ordre des *Rickettsiales*, famille des *Anaplasmatacae*. C'est une maladie tropicale mortelle des ruminants domestiques et sauvages (Peter et al., 2002), présente à Madagascar mais le nombre de foyers est inconnu (Organisation mondiale de la santé animale OIE, 2005-

2012). On la retrouve aussi dans toute l'Afrique subsaharienne ainsi que dans d'autres îles de l'océan indien (Réunion, Comores et Mayotte) et dans certaines îles de la Caraïbe (OIE, 2005-2012).

- La dermatophilose : due à *Dermatophilus congolensis*, un actinomycète. C'est une maladie infectieuse et transmissible, elle n'est pas transmise par *A.variegatum*, mais la fixation de la tique est liée à l'apparition des signes cliniques (Barre et al., 1995) .Les relations entre *A. variegatum* et la dermatophilose ont été étudiées par Martinez (Martinez et al., 1993) qui ont montré l'existence de substances immunosuppressives dans la salive de la tique réduisant la réponse immunitaire contre la bactérie.

Objectifs de la thèse

Face à l'importance physiologique des fonctions régulées par la sialorphine et l'opiorphine, la connaissance de leur(s) mécanisme(s) d'action et des relations structure-fonction enzymes /inhibiteurs revêt une importance cruciale, tant sur le plan physiologique que sur le plan physiopathologique. De plus, la relative simplicité de ces molécules et l'essor des techniques de production par synthèse chimique offre un potentiel novateur pour le développement de tels agents dans un but pharmacologique ou thérapeutique du traitement des douleurs sévères et chroniques. Cependant, nos connaissances sont limitées puisque la Sialorphine et l'opiorphine demeurent des peptides orphelins, voire singuliers. A ce jour, aucun analogue ou homologue fonctionnel n'a été caractérisé dans d'autres espèces animales.

Les tiques, des acariens hématophages, se nourrissent du sang de leurs hôtes vertébrés. Pour cela, après la morsure, elles restent fixées dans l'épiderme pendant plusieurs jours sans que cela n'induisse de réaction de douleur de la part de l'hôte. Ce processus laisse penser que des molécules anti-nociceptives sont produites dans la salive de l'acarien et qu'elles inhibent la perception des stimulations qui conduisent à la douleur. L'hypothèse de l'existence d'un système homologue à celui de l'opiorphine ou de la sialorphine chez la tique est donc à envisager, avec l'idée que les molécules peptidiques impliquées pouvaient présenter des potentialités encore plus intéressantes. Nous avons donc décidé de rechercher, par voie biochimique, ces éventuels peptides dans les glandes salivaires de la tique européenne, *Ixodes ricinus*, et de baptiser les peptides recherchés du nom de tickorphines.

Mon projet de thèse a été réalisé en collaboration avec Sarah Bonnet (USC INRA Bartonella-tiques, VECTOTIQ group, Maison Alfort) et avec Catherine Rougeot (Unité de biochimie Structurale et Cellulaire URA2185-CNRS) et il comportait deux volets distincts (Figure 27) :

- 1• Recherche, identification et caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'homologues de la sialorphine et de l'opiorphine dans différentes espèces animales.

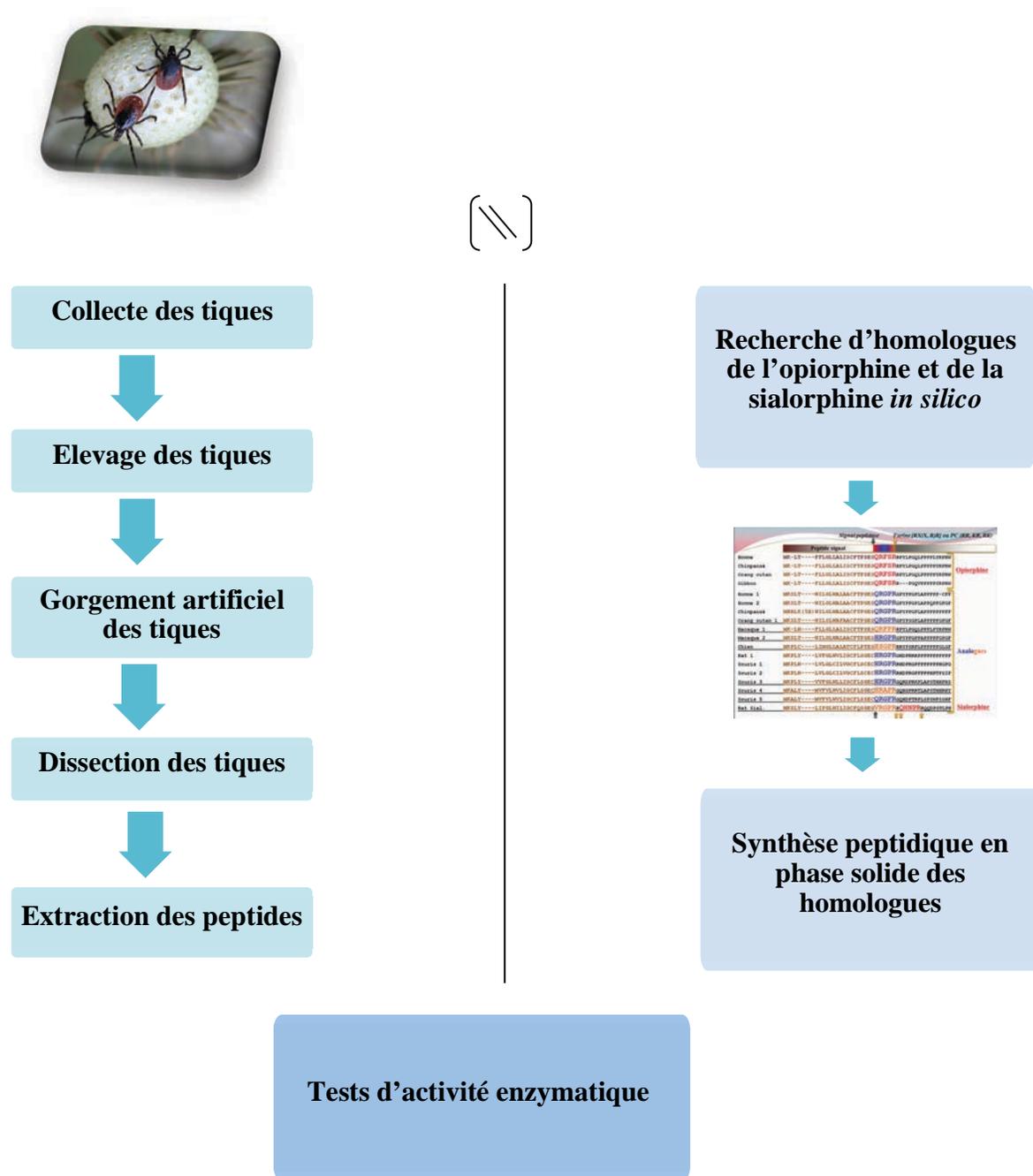


Figure 27 : Représentation schématique des objectifs des objectifs de la thèse

- i) Recherche et identification de peptides homologues par analyse bio-informatique dans les banques de données de séquences (approche *in silico*) ;
 - ii) Evaluation de leur potentiel inhibiteur *in vitro vis-à-vis* de la NEP et de l'APN humaine.
- 2• Caractérisation moléculaire et rôle fonctionnel d'homologues de la sialorphine et de l'opiorphine dans la salive de la tique *Ixodes ricinus*, un acarien hématophage.

Cette partie du projet visait à:

- i)* Isoler et caractériser, au niveau moléculaire, les peptides extraits de glandes salivaires ayant la capacité d'inhiber l'activité des deux ectopeptidases humaines (APN et NEP) impliquées dans l'inactivation physiologique des enképhalines (approche biochimique) ;
- ii)* Identifier, à l'aide de ces nouveaux «marqueurs phylogénétiques», de nouveaux peptides «opiorphine-like» dans d'autres espèces.

Matériels et Méthodes

1. Collecte des tiques *Ixodes ricinus*

La collecte d'*Ixodes ricinus* a été réalisée dans la forêt de Melun-Sénart. Elle se fait grâce à un leurre et elle joue sur la réponse des tiques en recherche d'hôtes à une incitation mécanique, stimulant le passage de l'hôte. Elle se pratique avec un pièce de tissu qui peut être utilisée montée sur un manche à la manière d'un drapeau, l'opérateur balayant la végétation latéralement, ou attaché à un bâton, à la manière d'un harnais, tiré à l'aide d'une ficelle par l'opérateur qui marche à l'avant du dispositif (Figure 28). Pour des raisons pratiques, le tissu est choisi de couleur claire, pour un meilleur repérage des tiques, et de texture telle que les tiques soient un temps retenues dans les fibres, pour donner à l'opérateur le temps d'intervenir (flanelle, éponge, molleton, etc.). Les limites de la technique sont liées d'une part aux conditions météorologiques, puisque son emploi est impossible par temps de pluie, de forte rosée ou de vent trop violent, d'autre part au type de végétation car son utilisation est délicate lorsque les formations végétales sont denses ou dominées par des épineux.

Suite à trois collectes auxquelles j'ai participé, effectuées généralement pendant le printemps, nous avons pu récolter à chaque fois une vingtaine de femelles non gorgées.



Figure 28 : Technique de collecte des tiques exophiles à l'affût sur la végétation

2. Elevage

Les tiques *Ixodes ricinus* proviennent d'un élevage réalisé dans le groupe Vectotiq de l'USC INRA Bartonella-tiques, dirigé par Sarah Bonnet à l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort, ENVA. Les tiques ont été élevées dans un laboratoire P2, dans des cloches où les conditions d'humidité (90%) et de température (environ 21 °C) sont contrôlées, et également nourries par un gorgement sanguin artificiel.

3. Repas sanguin artificiel et dissection

Les tiques sont maintenues sous atmosphère humide, à 21 °C, dans une chambre d'élevage constituée par un flacon de culture cellulaire de 75 cm² (Figure 29). Les tiques se gorgent de sang (e.g. lapin) grâce à un montage fixé sur la chambre de culture constitué d'un morceau de peau animale (e.g. lapin) sur laquelle est déposé le sang, maintenu à une température d'environ 37°C par un flux d'eau préchauffée.

Nous avons disséqué les tiques, sous loupe binoculaire, pour prélever les glandes salivaires (GS). Ces glandes salivaires d'*Ixodes ricinus* (femelles non gorgées) ont été récoltées et conservées à -80°C dans de l'acide acétique 10 % et ont été utilisées dans 3 séries d'expériences indépendantes (15, 25, 35 GS) et environ 10 GS de femelles gorgées ont été prélevées et utilisées sans congélation des extraits.

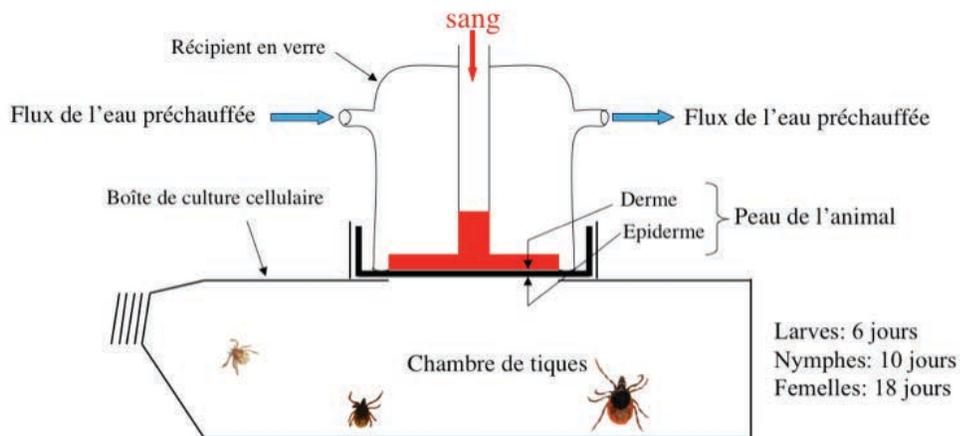


Figure 29 : Dispositif expérimental utilisé pour l'élevage des tiques *Ixodes ricinus* (Bonnet et al., 2007).

4. Extraction des peptides

Les glandes salivaires d'*I. ricinus* adultes sont broyées à l'aide d'un potter et d'un mortier en verre, puis homogénéisées dans 500 µl d'acide acétique 10 %. Le broyat est porté à ébullition afin d'inactiver les protéases. Après transfert du broyat dans de la glace, puis centrifugation (BeckmanAllegra X-22-R, 13000 x g, 15 min, 4 °C), le surnageant est récupéré. A partir du culot repris dans 500 µl d'acide acétique 10 %, le cycle broyage-centrifugation est répété deux fois. Les 3 tubes de surnageant sont ensuite lyophilisés.

5. Fractionnement de l'extrait par HPLC en phase inverse (RP-HPLC)

L'ensemble du lyophilisat est repris dans 1 mL H₂O-TFA 0.1%, puis déposé sur une colonne Sep-Pak C18 (Alltech). L'éluat (fraction non fixée) est conservé, puis les éluations suivantes sont réalisées : i) lavage (1 mL H₂O TFA 0.1%) ; ii) passage de 1 mL de 60 % d'acétonitrile (ACN) ; iii) passage de 1 mL de 100 % ACN. Ces 4 différents éluats sont lyophilisés, puis repris dans 150 µL H₂O et entreposés à -20°C. Après cette pré-purification sur Sep-Pak C18, un fractionnement par RP-HPLC des éluats 60% et 100 % ACN a été réalisé en utilisant les conditions suivantes : colonne analytique C 18 (Lichrospher, modulo-cart QS, 5 µm, ODS2, 250 x4.6 mm, Interchim) ; solvants : H₂O-TFA 0.1 % (solvant A) et ACN-TFA 0.07 % (solvant B) ; gradient : 0 à 60 % ACN (1 %/min) ; débit : 0,75 ml/min ; détection : 220 et 280 nm ; fraction : 0,75 ml (collecteur Advantec SF-2120). Les différentes fractions sont finalement lyophilisées, puis conservées à -20 °C pour tester ultérieurement l'activité enzymatique

6. Electrophorèse capillaire microfluidique

Le profil de migration de la salive brute d'*Amblyomma variegatum* a été visualisé à l'aide d'électrophorèse capillaire microfluidique (Experion, Bio-Rad), sur la plateforme de PCR en temps réel (IBPS, FR3631, UPMC). Cette méthode a permis le calcul de la concentration de l'échantillon : pour chaque bande détectée, le logiciel calcule la concentration relative ou absolue ainsi que le pourcentage de pureté.

7. Recherche d'homologues de l'opiorphine et de la sialorphine *in silico*

Les séquences des précurseurs de l'opiorphine et de la sialorphine ont été utilisées pour effectuer des recherches de similarités dans la banque de séquences non redondantes (nr) sur le site du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) à l'aide du logiciel BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool proteins).

8. Synthèse peptidique en phase solide des analogues de l'opiorphine et de la sialorphine

Toutes les synthèses ont été effectuées au sein de la plateforme Synthèse peptidique et PCR en temps réel (IBPS, FR 3631 UPMC-CNRS). Les homologues de la sialorphine et de l'opiorphine chez les Vertébrés ont été produits par synthèse peptidique en phase solide, afin de réaliser des tests d'activités. La chimie utilisée a été la chimie Fmoc (9-fluorénylméthylloxycarbonyl). La

purification des peptides synthétiques a été réalisée par HPLC en phase inverse sur une colonne semi préparative Phenomenex Luna® C₁₈ (10 µm, 250 Å~ 10 mm) et a été éluée avec gradient linéaire de 0-60 % ACN (0,07 % TFA) dans H₂O-TFA 0,1 % (1 % ACN/min) avec un débit de 5 mL/min. L'homogénéité et l'identité des peptides synthétiques ont été ensuite évaluées par HPLC analytique (colonne C₁₈ Uptisphere® 5ODB, 5 µm, 250 x12 4,6 mm, Interchim), en utilisant le même gradient et un débit de 0,75 mL/min, ainsi que par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Voyager DE-PRO, AppliedBiosystems).

9. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'analyse du contenu en masse des peptides des différentes fractions post-Sep-Pak, ainsi que de quelques fractions post-HPLC (élution 60 % ACN), a été réalisée afin de détecter des peptides et d'identifier potentiellement des ions apparentés à l'opiorphine/sialorphine. Les fractions lyophilisées ont été remises en solution dans 150 µL d'eau milliQ et ont été homogénéisées par vortex. 1 µL de chaque fraction HPLC a été mélangé avec 1 µL de matrice HCCA (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique). La matrice acide a permis la cristallisation de l'échantillon et l'apport de protons. 1 µl de ce mélange a été ensuite déposé sur une plaque MALDI. Les spectres MS ont été obtenus en mode réflecteur positif, en utilisant le calibrant externe 4700 (Applied Biosystems). La séquence des peptides a été analysée par spectrométrie de masse en tandem en réalisant la fragmentation des ions précurseurs d'intérêt. Les analyses ont été réalisées à la plateforme « Spectrométrie de Masse et Protéomique » (IBPS, FR 3631 UPMC-CNRS), à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF-TOF 4700 Proteomic Analyzer (AppliedBiosystems).

10. Tests enzymatiques

10.1. Substrats utilisés

La fluorescence des produits issus de la réaction avec l'APN ou la NEP repose sur des mécanismes quelque peu différents. Les structures et formules ont été gracieusement fournies par Catherine Rougeot, Institut Pasteur, Paris. Dans le cas de l'APN, le substrat utilisé a été le L-Ala AMC dont l'hydrolyse libère la fluorescence (excitation à 380 nm, émission à 460 nm ; Figure 30). Dans le cas de l'Ap-B, le substrat utilisé a été le L-Arg AMC dont l'hydrolyse libère la fluorescence (excitation à 380 nm, émission à 460 nm).

Le substrat de la NEP utilisé a été, quant à lui, le Abz-D-Arg-Gly-Leu-EDDnp (Figure 31) et ses propriétés de fluorescence reposent sur le système du FRET, basé sur le transfert d'énergie

dépendant de la distance entre un donneur de fluorescence, ici l'Abz (ortho-amino-aminobenzol) ou Mca = methoxycoumarin-4-yl acetyl) et un accepteur, ici le DnpOH (2,4-dinitrophenyl) ou l'EDDnp (2,4-dinitrophenyl ethylenediamine).

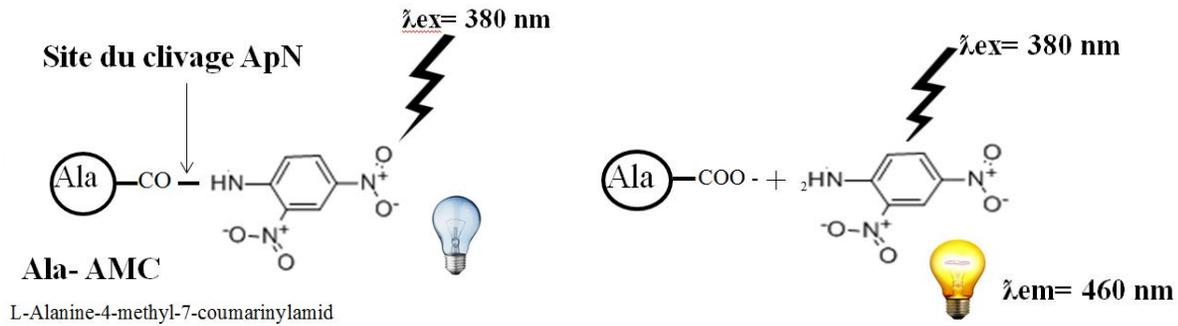


Figure 30 : Schéma du principe des tests d'activité enzymatique avec l'APN et son substrat L-Ala AMC.

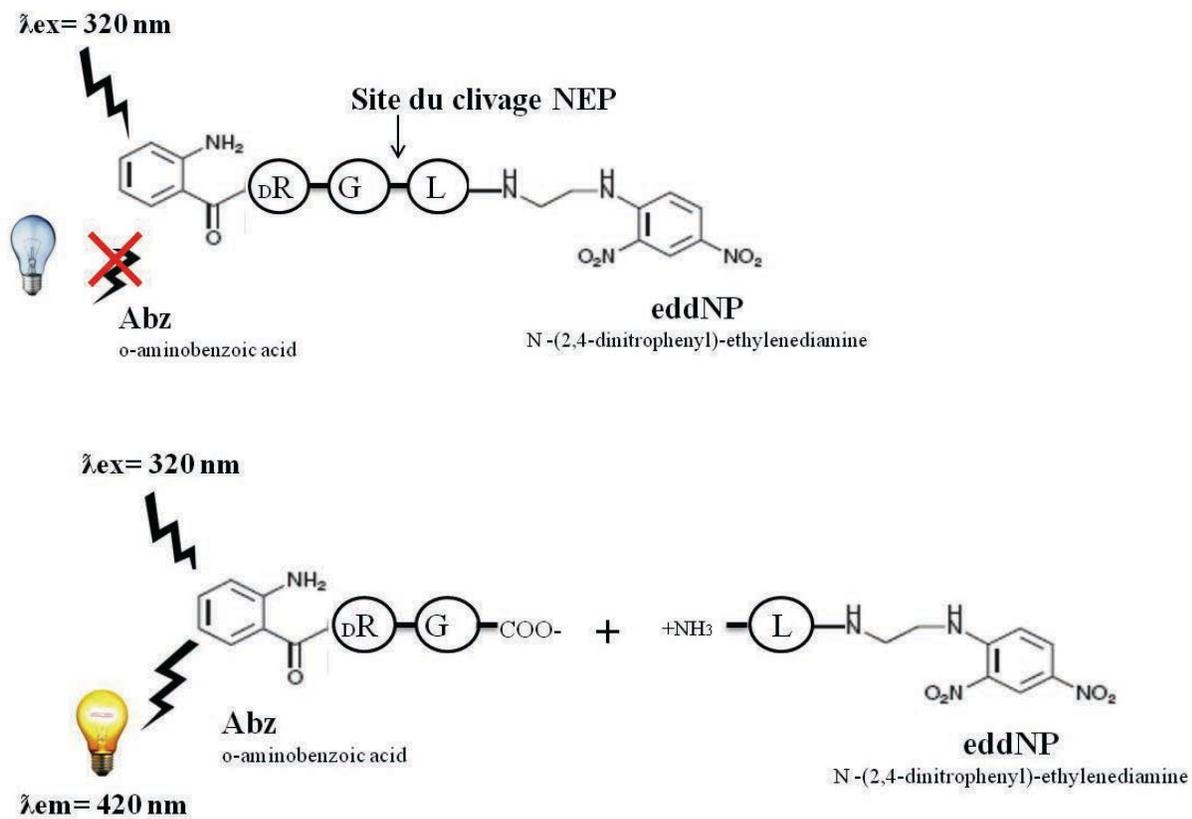


Figure 31 : Schéma du principe des tests d'activité enzymatique avec la NEP et son substrat l'Abz-D-Arg-Gly-Leu-EDDnp.

Dans le substrat, la partie AbZ ne peut fluorescer après excitation à 320 nm, car elle est «

quenchée » par la partie eddNP. En revanche l'hydrolyse de la liaison peptidique sur le versant amino terminal de la leucine libère le fluorophore et le « quencher », ce qui permet au produit, l'Abz-dR-G, de fluorescer à 420 nm après excitation à 320 nm.

10.2. Tests d'activité enzymatique

En ce qui concerne les glandes salivaires de tiques : chaque fraction HPLC lyophilisée a été reconstituée avec 150 µL d'eau distillée et l'activité enzymatique a été ensuite mesurée. De même, pour les peptides synthétiques homologues de l'opiorphine et de la sialorphine.

Les tests d'activité ont été réalisés, sur plaques 96 puits, avec un substrat fluorogénique (200 µM final). L'hydrolyse du substrat a conduit à la libération d'un produit fluorescent pour lequel l'intensité a été mesurée avec un spectrofluorimètre à une longueur d'onde donnée. La réaction a été faite pendant 10 min à 28 °C, dans un volume total de 100 µL dans lequel ont été ajoutés : 70 µL de solution d'enzyme (3,5 ng pour la concentration de l'APN humaine, R&D systems ; 2,5 ng pour la concentration de NEP recombinante humaine ; R&D systems) ; 20 µL d'une solution de peptides à différentes concentrations ; juste avant de lancer la cinétique, 10 µL d'une solution de L-Ala AMC (Bachem), substrat de l'APN (20 µM final), ou de Abz-D-Arg-Gly-Leu-EDDnp (Plate-forme de synthèse peptidique, IBPS FR 3631 UPMC-CNRS) ; substrat de la NEP (10 µM final). Les tampons réactionnels utilisés sont du Tris-HCl 0,1 M, pH 7 pour l'APN, qui contient en plus 150 mM NaCl, et 0,05% de Brij 35 pour la NEP. Ayant à disposition au sein du laboratoire l'Ap-B, une autre aminopeptidase de la même famille M1, nous avons voulu la tester comme témoin. Les tests d'activité ont été réalisés dans les mêmes conditions que l'APN, 3,5 ng pour la concentration et avec le L-Arg AMC (Bachem) comme substrat de l'Ap-B (20 µM final).

Des témoins d'inhibition ont été utilisés : le tampon de l'enzyme comme ligne de base ; l'enzyme en présence du substrat sans inhibiteur pour le témoin négatif ; l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques compétitifs des enzymes, l'amastatine 1 µM final pour l'APN, le phosphoramidon 1 µM final pour la NEP, pour le témoin positif. Pour déterminer les paramètres cinétiques, la réaction a été effectuée en présence de concentrations variables de peptide potentiellement inhibiteur, allant de 0 à 100 µM. Tous les extraits peptidiques ont été testés vis-à-vis de la NEP et de l'APN.

10.3. Détermination des paramètres cinétiques

Afin de tester l'activité inhibitrice des homologues de l'opiorphine et de la sialorphine, nous

déterminons les paramètres cinétiques. Nous prenons l'exemple de l'activité de l'APN humaine, qui est déterminée par la mesure de sa capacité à cliver le substrat fluorogénique H-Ala-AMC (7-Amido-4-methylcoumarin ; Figure 32).

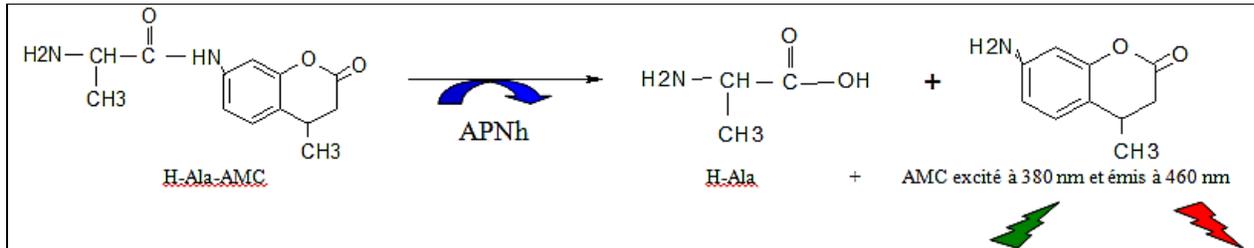


Figure 32 : Clivage du substrat H-Ala-AMC (7-Amido-4-methylcoumarin) par l'APN

Lors de la réaction enzymatique, le clivage entre le substrat H-Ala et le groupe AMC provoque la libération de l'AMC qui est mesurée par un spectrofluoromètre monochromateur (TECAN) ou un spectrofluoromètre Fluo Star Galaxy (BMG, LABTECH), en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 380 nm et d'émission à 460 nm.

La fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'AMC produite et donc proportionnelle à l'activité de l'APN. La vitesse d'apparition du produit AMC (en RFU) est déterminée en cinétique grâce à des mesures successives toutes les deux minutes pendant une heure. L'activité de l'APN est ensuite déterminée à partir de la pente de la droite obtenue lors de la représentation [RFU] = f (Temps). Elle est calculée (par le logiciel MAGELLAN) sur cinq points dans l'intervalle de temps compris entre 10 et 20 min par exemple, période située en phase stationnaire. L'activité est exprimée en RFU par minute (unités relatives de fluorescence).

Résultats

5. Ixodes ricinus

1. Identification d'homologues fonctionnels de l'opiorphine/sialorphine chez la tique *Ixodes ricinus*

La difficulté majeure, rencontrée lors de la réalisation de cette partie du projet, a été la collecte du matériel biologique. Les premiers tests ont été réalisés sur du matériel conservé à -80 °C depuis de nombreux mois et ils n'ont pas révélés d'activités inhibitrices de l'APN ou de la NEP. Ensuite, 2 collectes ont été réalisées qui ont permis de récupérer respectivement 15, puis 60 tiques. Nous avons donc travaillé sur deux lots différents de glandes salivaires.

2. Analyse par RP-HPLC du contenu peptidique d'extraits de glandes salivaires d'*Ixodes ricinus*

Les peptides ont donc été extraits d'un homogénat brut de 15 glandes salivaires. Cet extrait a été pré-purifié sur une colonne Sep-Pak C18. L'éluât, obtenu avec 60 % ACN, a ensuite été analysé par HPLC analytique en phase inverse (Figure 33). Des pics à 220 nm (longueur d'onde d'absorption de la liaison peptidique) situés dans la zone entre 19 min et 30 min (soit 21 % - 33 % ACN), zone d'éluion de l'opiorphine et de la sialorphine (peptides de contrôle utilisés comme références) sont détectables. Cependant, la faible intensité de ces pics en regard des 10 µg d'opiorphine et de sialorphine injectés comme témoins (Figure 34) souligne que la quantité de peptides contenue dans l'extrait est très faible, et ceci probablement en raison du peu de glandes salivaires disponibles.

Deux autres pics d'intensité plus importante sont visibles à environ 56 et 62 minutes, une zone d'éluion très éloignée de celle des peptides attendus. (Figure 33)

Les différentes fractions HPLC ont été conservées à 4 °C, lyophilisées et reprises dans 150 µL d'eau milliQ, pour analyser ultérieurement leur activité inhibitrice potentielle vis-à-vis de la NEP et de L'APN.

3. Analyse par spectrométrie de masse du contenu peptidique d'extraits de glandes salivaires d'*Ixodes ricinus*

Afin d'avoir une indication sur le contenu en masse de l'extrait total pré-purifié sur Sep-Pak C18 et des fractions éluées à 60 et 100 % ACN, nous avons réalisé une analyse

préliminaire par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur la plate-forme « Spectrométrie de Masse et Protéomique » de l'IBPS à l'UPMC (Figure 35).

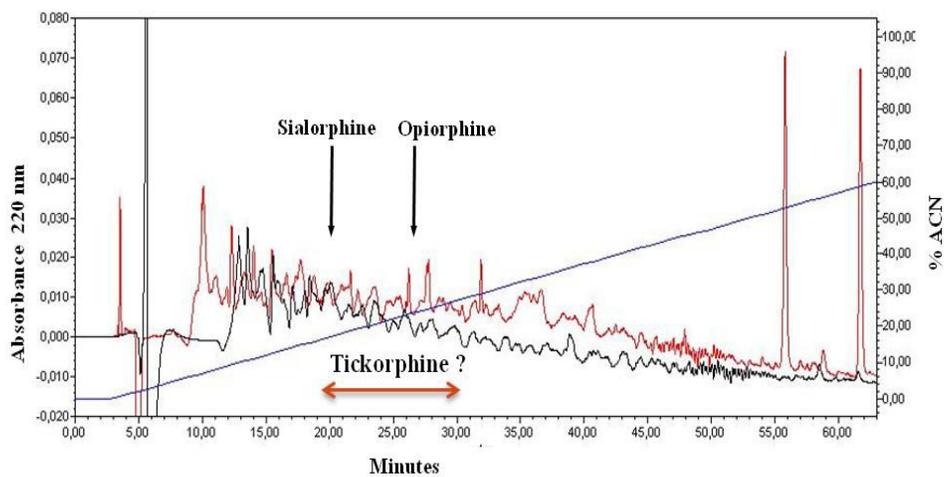


Figure 33 : Chromatogramme RP-HPLC d'un extrait de glande salivaire d'*I. ricinus* pré-purifié sur Sep-Pak C18. Débit de 0,75 ml/min et fractions de 0,75 mL. L'absorbance est mesurée à 220 nm (rouge), la courbe en noir correspond à une injection d'H₂O, le trait bleu représente le gradient d'ACN. Les flèches indiquent les temps d'éluion des témoins peptidiques sialorphine et opiorphine.

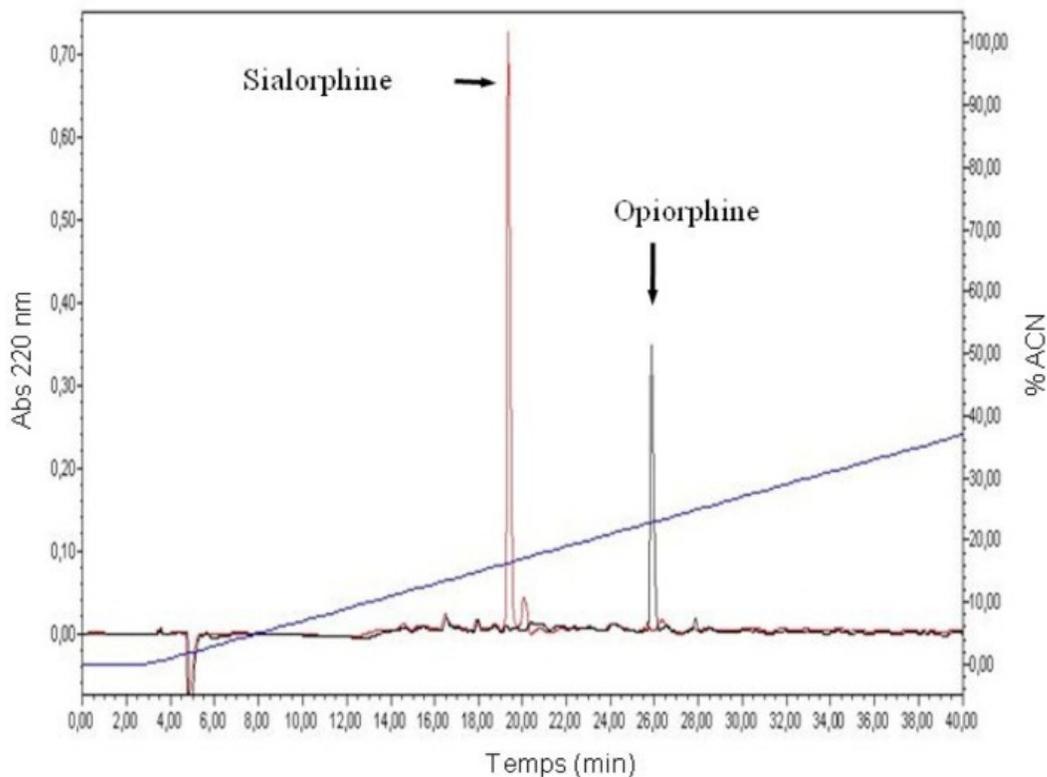


Figure 34 : Chromatogramme correspondant à l'éluion, avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 60 %, de la sialorphine et de l'opiorphine (10 µg).

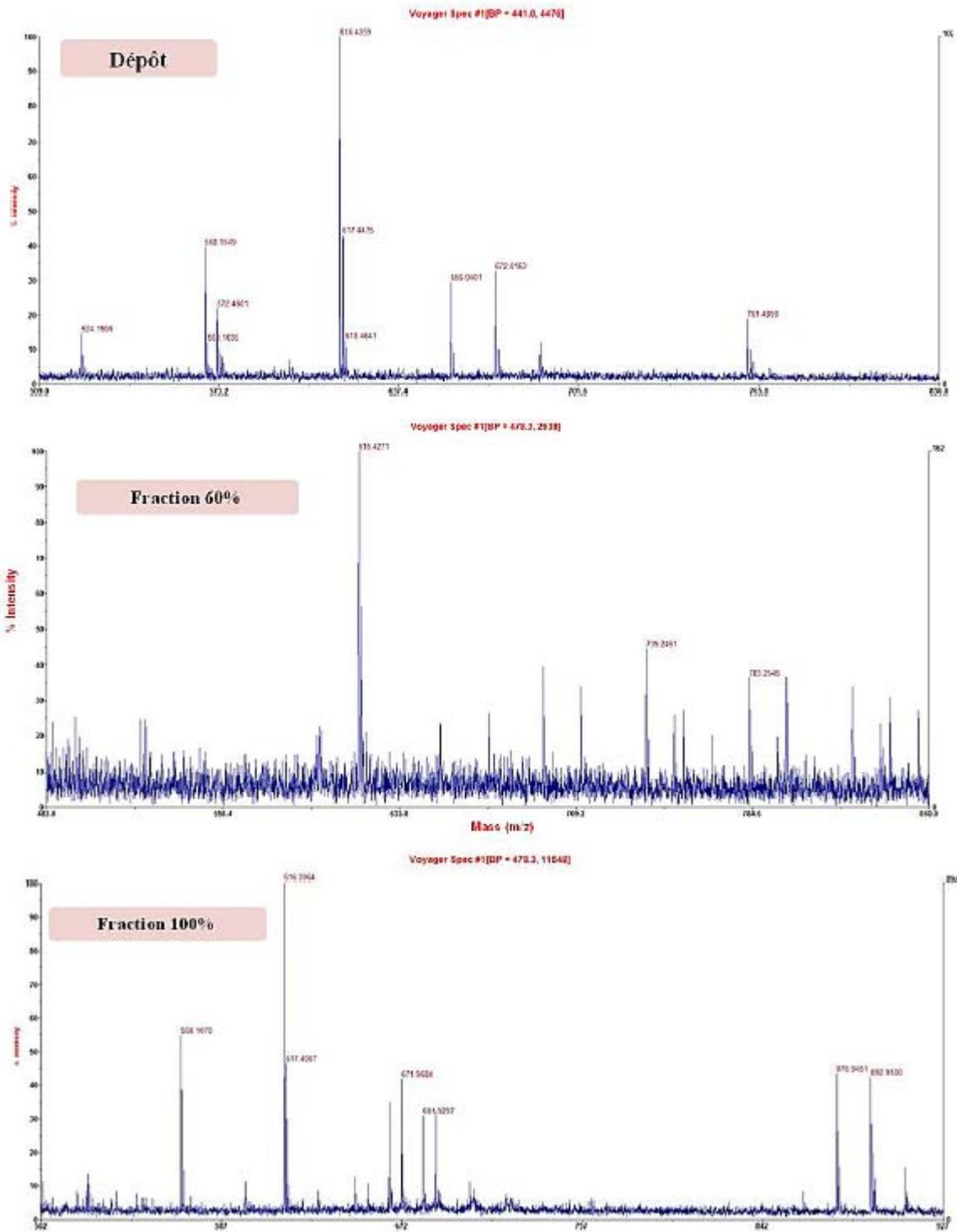


Figure 35 : Spectre MALDI-TOF montrant la distribution isotopique de l'extrait pré-purifié de glandes salivaires d'*I. ricinus* et des fractions 60 % et 100 % ACN.

Un certain nombre d'espèces moléculaires sont nettement visibles dans les fractions d'élution (Figure 35), dont une est commune aux 3 échantillons testés ($[M+H]^+ = 616,427$). Ces espèces moléculaires correspondent à des tailles pouvant aller de 5 à 7 résidus d'acides aminés et pourraient donc être des peptides de la tique s'apparentant à l'opiorphine ($M/Z=676,3$) et la sialorphine ($M/Z=651,3$). Cependant plusieurs tentatives de fragmentation des différents ions en MS/MS ne nous ont pas permis d'obtenir d'information de séquence, ni d'apporter de conclusion quant à la présence d'analogues dans nos extraits. Ceci étant probablement dû à une quantité insuffisante de matériel.

4. Tests des activités inhibitrices de l'APN et la NEP par l'extrait de glandes salivaires d'*I. ricinus*

Des premiers tests avaient été réalisés avec la NEP recombinant humaine, de manière à se familiariser avec le protocole et l'utilisation des matériels. Par la suite, l'activité de l'enzyme, conservée cependant à -80°C , a chuté de 79 % et l'inhibition par l'opiorphine et la sialorphine ($100\ \mu\text{M}$) était fortement diminuée (32 % et 0% respectivement). Une inhibition de cette activité résiduelle (41 %) a cependant été observée avec $10\ \mu\text{l}$ des fractions résultant de l'élution 60% ACN et 100% ACN. En attendant de disposer d'un autre lot de NEP et de plus de matériel biologique, nous avons testé l'activité de l'APN.

L'activité de l'APN a été testée en présence de 5 ou $15\ \mu\text{l}$ des 4 fractions (non fixée, NF ; Lavage ; 60 % ACN et 100 % ACN) résultant du passage de notre extrait brut de glandes salivaires sur la Sep-Pak. Une inhibition de 73 et 24 % en présence respectivement d'opiorphine à 100 et $10\ \mu\text{M}$ est mesurée à titre de contrôle. A notre surprise, au lieu d'observer une inhibition de l'activité de l'enzyme, une augmentation a été mise en évidence et non des moindres, plus de 100 % avec l'éluât 60% ACN (Figure 36). Cette observation a été obtenue avec 5, 10 et $15\ \mu\text{l}$ de nos extraits post-Sep-Pak. La valeur passe à +150% en présence de $15\ \mu\text{l}$ d'extrait. Les tests d'activité réalisés avec les fractions résultant de la Sep-pak n'ont donc pas montré d'inhibition de l'activité de l'Ap-N, une augmentation non négligeable de l'activité a plutôt été observée.

De même le contenu des différentes fractions issues du passage de l'extrait 60 % ACN sur HPLC n'inhibe pas l'enzyme et l'augmenterait plutôt. Une augmentation de 130 et 133% est même observée pour les fractions 47 et 57 (Figure 37).

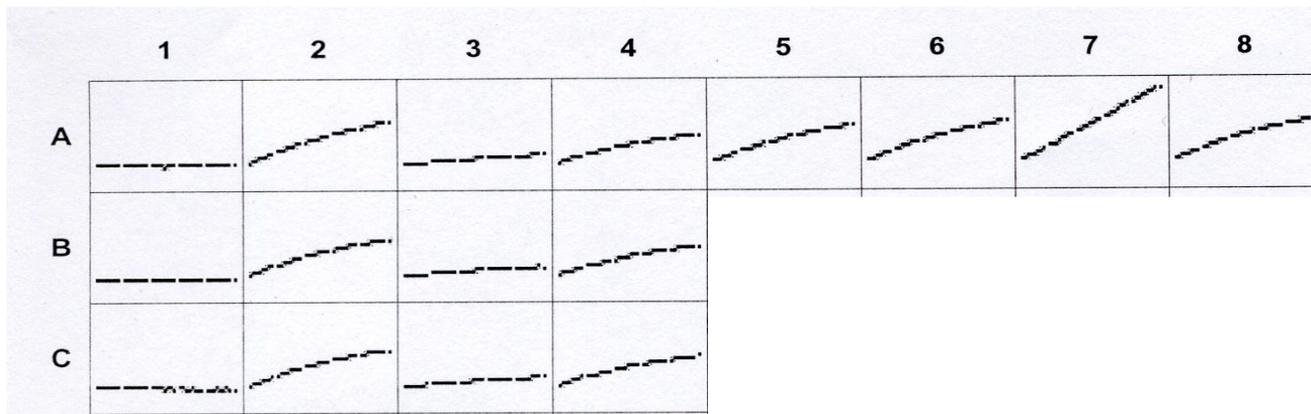


Figure 36 : Schéma de plaque de la cinétique de fluorescence sur 15 min vis-à-vis de l'APN. 1-Substrat seul (Ala-AMC) ; 2- Enzyme + substrat ; 3- Enzyme + substrat + opiorphine 100 μM ; 4- Enzyme + substrat + opiorphine 10 μM ; 5- Enzyme + substrat + non fixé (5 $\mu\text{L}/150 \mu\text{L}$) ; 6- Enzyme + substrat + lavage (5 $\mu\text{L}/150 \mu\text{L}$) ; 7- Enzyme + substrat + élution 60% ACN (5 $\mu\text{L}/150 \mu\text{L}$) ; 8- Enzyme + substrat + élution 100% ACN (5 $\mu\text{L}/150 \mu\text{L}$). Les tests sont réalisés en triplicates (A, B, C) ou en un seul point (A) pour les fractions post-Sep-Pak.

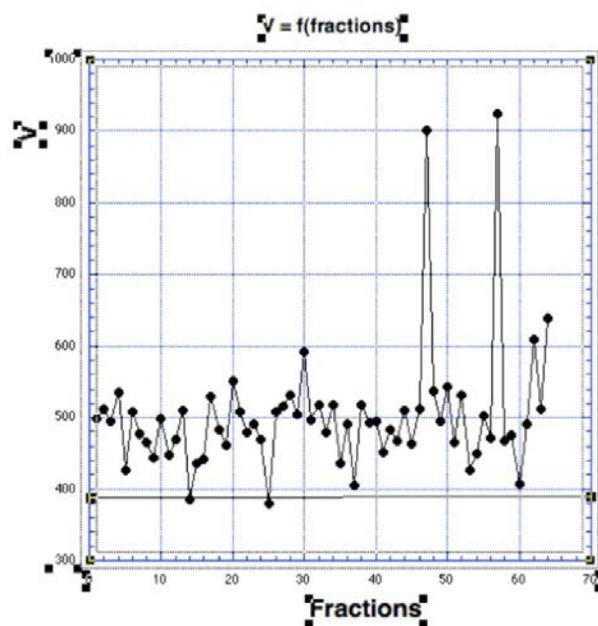


Figure 37: Effet inhibiteur des différentes fractions sur l'activité de l'APN. L'enzyme est incubée en présence de substrat et de 5 μL de chaque fraction issues du passage de l'extrait 60 % ACN sur HPLC. La droite noire représente l'activité de base de l'enzyme avec le substrat seul.

L'analyse du contenu des fractions 47 et 57 post-HPLC par spectrométrie de masse n'a pas donné de résultat, probablement parce que la quantité de matériel était très faible.

5. *Amblyomma variegatum*

Nous avons pu réaliser une analyse préliminaire du contenu en peptides et protéines de la salive d'*Amblyomma variegatum* (tique dure *Ixodina* ; Don gracieux du Dr Philippe Holzmuller, UMR 15 CIRAD-INRA, Montpellier). L'échantillon de salive a été obtenu au département

Système Biologiques de l'UMR 15 en utilisant des tiques femelles semi-gorgées. Ces dernières ont été soigneusement détachées de la peau des veaux à la main. La taille des tiques était d'environ 4,5 mm. Avant la collecte de salive, tout tissu de l'hôte dans les pièces buccales de tiques a été retiré à l'aide d'un scalpel et une pince chirurgicale. Ensuite, les tiques ont été rincées avec de l'eau distillée stérile et amenées à saliver suite à une injection dorsale de 2 ou 5 ml de pilocarpine-2% PBS (Ciprandi et al., 2006 ; Clarke et al., 1971). La salive accumulée dans les pièces buccales a été recueillie en utilisant une pointe de pipette, entre temps les tiques ont été maintenues à 37°C dans une chambre humide pendant environ 3 h. La salive a été stockée à -80°C.

Nous avons donc refait des tests, cette fois non avec les glandes salivaires mais avec de la salive brute. Une détermination de la concentration en protéines de la salive en DO (méthode BCA) a indiqué une concentration de 0,8 µg/µL. Une électrophorèse dans un gel 8% polyacrylamide-SDS en conditions dénaturantes (Figure 38) a été réalisée avec 10 µl de salive brute d'*A. variegatum* (8 µg), 15 µl d'Ap-B purifiée (1 µg) et de la BSA (500 ng et 1µg). La migration s'effectue pendant 1 heure 30 mn. Dans le cas de la salive, 2 bandes à 103 et 115 kDa sont majoritairement observées et contiennent les protéines majoritaires détectées dans la salive. Par référence avec la BSA et l'Ap-B, ces protéines pourraient représenter plus de 25 % des protéines totales de la salive d'*A. variegatum*. Un signal important est observé dans le front de migration qui pourrait correspondre à un ensemble de peptides matures ou produits de dégradation. Le reste des protéines serait en faible quantité (pas d'autre espèce majoritaire) et de masse moléculaire variable.

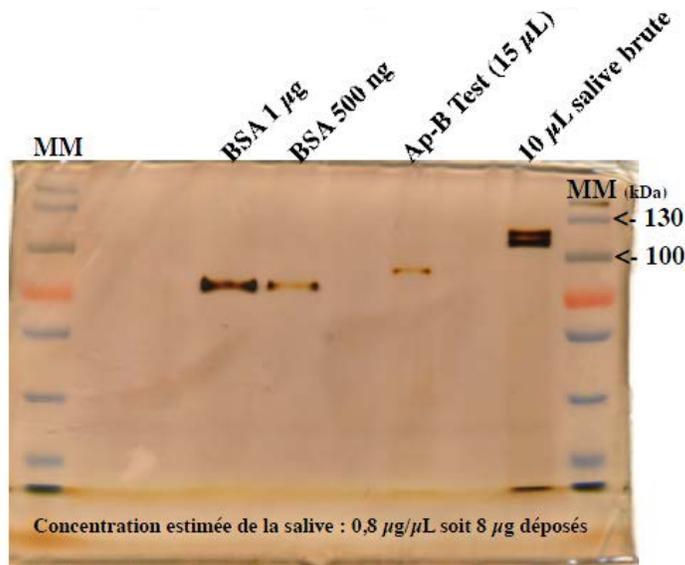
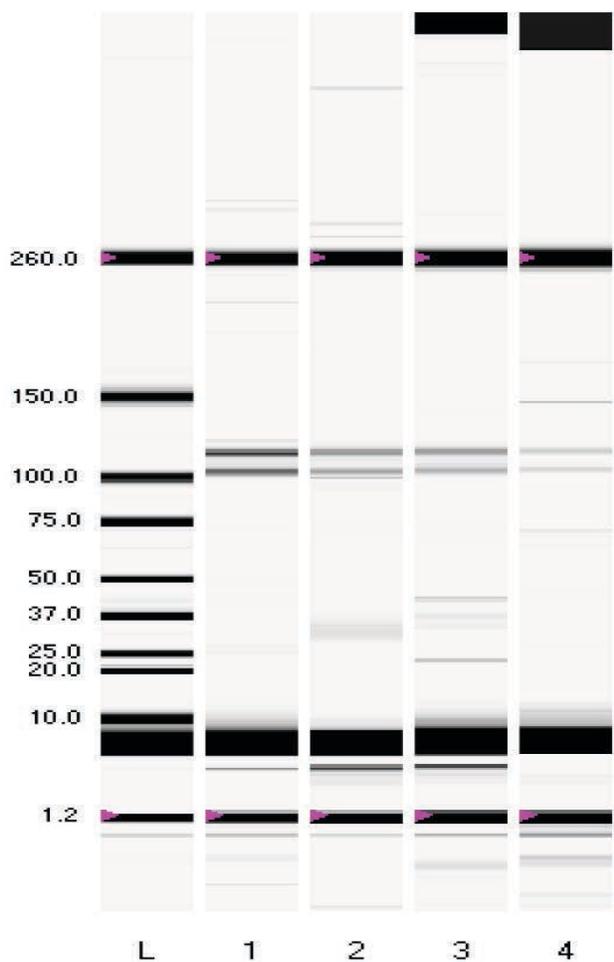


Figure 38 : SDS-PAGE en conditions dénaturantes de la salive d'*Amblyomma variegatum*.

Nous avons également réalisé une électrophorèse capillaire microfluidique (Experion, Biorad ; Figure 39). Ce système permet le calcul de la concentration en protéines des échantillons, pour chaque bande détectée, le logiciel calcule la concentration relative ou absolue ainsi que le pourcentage de pureté.



*Figure 39 : Profil d'électrophorèse capillaire microfluidique de la salive brute (Experion, Bio-Rad). Puits L, marqueurs de masse moléculaire ; Puits 1, 1 μ L de la salive brute d'*Amblyomma variegatum* ; puits 2, 3, 4 : salive brute d'*Amblyomma variegatum*, dilution 1/2, 1/4, 1/8. Le signal présent dans tous les puits sous la bande du marqueur de 10 kDa est un artefact lié à l'appareil (« pic système »).*

Le profil général de l'électrophorèse capillaire confirme celui du SDS-Page (Figure 38). Deux bandes à 103 et 115 kDa sont majoritairement observées et un signal important est toujours observé dans le front de migration. En revanche, la concentration moyenne en protéines calculée par le système (53,5 ng/ μ L ; salive brute, 45,5 ng/ μ L ; dilution 1/2, 22,1 ng/ μ L ; dilution 1/4, 14 ng/ μ L ; dilution 1/8, 8,5 ng/ μ L) est très différente, d'un facteur 16, de celle obtenue par la méthode BCA (800 ng/ μ L). Une électrophorèse capillaire réalisée avec une gamme de BSA purifiée de 500, 100 et 25 ng (méthode BCA) a permis d'obtenir des

concentrations respectives de 128, 23 et 8 ng/ μ L (données non présentées). Une différence d'un facteur 4 est cette fois observée. Notre conclusion serait que le système Experion est mieux adapté à l'analyse des protéines purifiées plutôt qu'à l'analyse des mélanges complexes et que les valeurs obtenues par la méthode BCA restent plus proches de la réalité (0,8 μ g/ μ L).

Des analyses en spectrométrie de masse de la salive brute d'*A. variegatum* (1 μ L) ont été réalisées sur la plateforme de Spectrométrie de masse et protéomique de l'IBPS. L'analyse en basse masse (110 - 4000 Da) met en évidence quelques espèces moléculaires pouvant correspondre à des peptides de petites tailles. Cependant, comme dans le cas de *I. ricinus*, plusieurs tentatives de fragmentation des différents ions ne nous ont pas permis d'obtenir d'information de séquence. Ceci étant probablement toujours dû à une quantité insuffisante de matériel.

6. Recherche d'homologues de l'opiorphine et de la sialorphine *in silico*

Les résultats de nos premières recherches d'homologues montrent que les précurseurs de l'opiorphine (5 résidus d'acides aminés) et de la sialorphine (5 résidus) appartiennent clairement à deux familles de protéines différentes (Figure 40). Les séquences « opiorphines » ne permettent pas d'identifier de similitude de séquences avec les séquences « sialorphine » et aucune séquence issue d'un génome de rongeur n'est détectée, l'inverse est également vérifié. Les gènes codants les protéines sont issus de familles très différentes. En revanche, l'utilisation des 60 premiers résidus de la région NH₂-terminale de chaque précurseur permet d'obtenir un ensemble de séquences similaires qui appartiennent au taxon des Mammifères, dont des séquences de rongeurs.

Ce résultat s'explique par le fait que cette séquence plus courte, donne plus de poids au peptide signal qui est très conservé entre les deux familles de protéines. D'autre part, le nombre de séquences identifiées reste faible et ne concerne que des protéines sécrétées isolées de glandes salivaires. Ce peptide signal pourrait donc être spécifique d'une voie de sécrétion propre à ces glandes. A l'exception de certains primates et du rat, aucun autre génome de Mammifère ne semble contenir des séquences homologues aux protéines recherchées, bien que plusieurs autres génomes soient en cours d'analyse (ex. bœuf, cheval, cochon). Ceci peut être directement lié à l'état de l'avancée de l'annotation de ces différents génomes, il est donc difficile de tirer des conclusions à ce niveau.

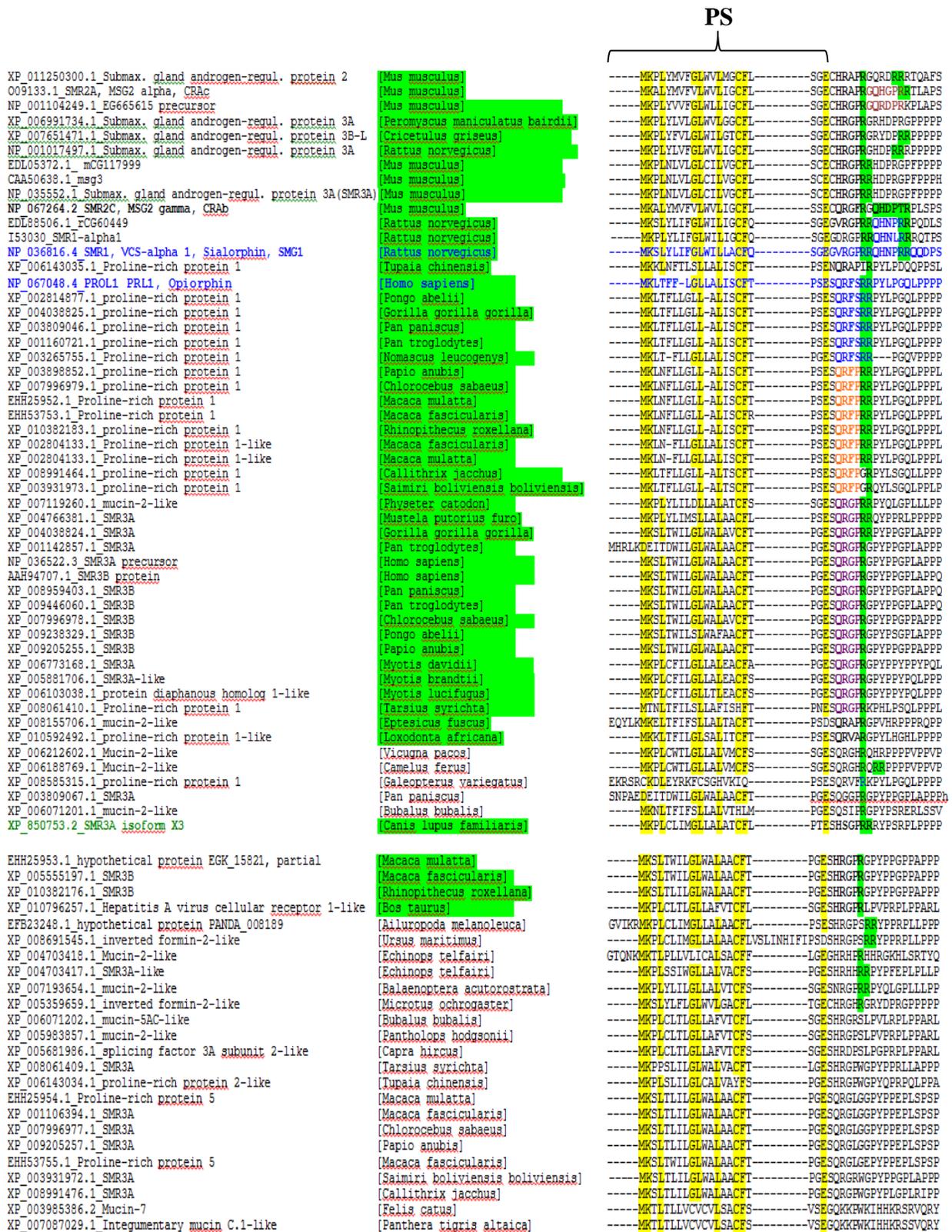


Figure 40 : Alignement des régions NH₂-terminales de l'opiorphine et de la sialorphine et de protéines similaires. Le peptide signal indiqué par une accolade (PS), les acides aminés conservés au sein de cette séquence sont surlignés en jaune. Les séquences de l'opiorphine et de la sialorphine sont en bleu. Les peptides synthétisés ultérieurement pour étudier leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de la NEP et de l'APN sont en gras et leurs noms sont surlignés en vert. Les sites putatifs de maturation par les endopeptidases de type prohormoneconvertase/furine sont surlignés en vert [RXXX ou RX(K ou R)]. Les

noms et numéros d'accès dans les banques de données des différentes séquences sont indiqués. La quasi-totalité de ces séquences ont été identifiées par similarité de séquences et leurs fonctions sont en général inconnues, leur nom dérivent donc des noms des protéines les mieux caractérisées, PROL1 est le gène qui code le précurseur de l'opiorphine humaine, SMR1, celui codant pour celui de la sialorphine de rat. Ces noms reflètent également le nombre d'isoformes détectées dans une ou plusieurs espèces : PROL5 ; ISO1 à 5 ; SMR2, 2A, 3A, 3B, CRA, -L (pour -Like).

En revanche, de nombreux autres génomes d'organismes susceptibles d'exprimer des peptides ayant des propriétés anti-douleur (amphibiens, arthropodes, oiseaux, poissons) sont aujourd'hui relativement bien connus et aucune séquence n'a pu être identifiée.

L'examen de l'alignement multiple de séquences (Figure 40) montre qu'il existe dans certaines des séquences des homologues positionnels de l'opiorphine. Ces pentapeptides peuvent être produits après clivage du peptide signal par la signal peptidase et hydrolyse d'un site potentiel de type furine [*RXXXR* ou *RX(K ou R)R*] ou de type dibasique (RR ; prohormone convertase). Ces peptides présentent également jusqu'à 60 % d'acides aminés différents par rapport aux séquences de l'opiorphine et de la sialorphine. Ce qui semble remarquable est qu'à l'exception des résidus arginine du site « furine », tous les autres acides aminés peuvent être différents.

Il est annoté également la présence d'homologues positionnels potentiels dans la séquence du précurseur de la sialorphine (VRGPR). En revanche, seules les séquences de souris, SMR-L et SMR2A offrent la possibilité de produire des pentapeptides et des hexapeptides, respectivement : QRDPR et QHGPR, GQRDPR et GQHGPR.

Afin d'obtenir des informations sur les homologues positionnels de l'opiorphine et la sialorphine chez les arthropodes, des alignements multiples de séquences ont été effectués (Figure 41). De manière à simplifier la lecture de l'alignement, six séquences d'arthropodes ont été retenues. Aucune d'entre elles ne semble contenir des homologues de l'opiorphine ni de la sialorphine. Par contre le peptide signal des glandes salivaires des arthropodes est conservé, les acides aminés méthionine, glycine et leucine sont retrouvées dans les six gènes. Les cystéines et les phénylalanines sont retrouvées dans les cinq premiers gènes, alors que le glutamate n'existe que dans un.

Homme_Opio MK-LTFFL-----GLLALISCFT-PSESQRFSRRPYLPGQLPPPPLYRPRWVPPSPPPPYDSRLN
 Rat_SIALO2 MKSLYLIF-----GLWILLACFQ-SGEGVRGPRRQHNPRQQDPSTLPHYLGLQDPNGGQIGVT
 | 12002008 | g MFK L K F F I L F A L A G L ----- C F G D T S P S E T G A S S D G E A G S E P A G S E T V D Q T S E G K D G S G D I Q K S
 | 241839568 | MFK L K F F I L F A L A V L ----- C F G K N M S F C L V S K S K Y K H K G N S E S P R A T P S Q E P K N R D K P S G V F A F
 | 67083645 | g MFK L K F F I L F A L A G L ----- C F G D S S D S E T G E A S P S G S G D S D S D K M E E S T N V S G K - N G E E K E T E E
 | 67083757 | g M F T L K F F I L F L L A G L ----- C F G D T S A G E T A S G N G Q G E G E G E S S G A A G N A E V G D T S A G Q D N T G E K
 | 56159933 | g M F K R S F F L V L V L A G L ----- C F G E T S E D G V S S G G S S G S G T E D K K V E T Q S P E G E D S S D G Q S D S G T N
 | 242002066 | M R S L T L F L ----- G L F A V L A S G T V A S T T K G S V P L Q T S T F D K I V P K F K V T L V K F D V T Y P Y G E K H D E

Figure 41 : Aligement des régions NH₂-terminales de l'opiorphine et de la sialorphine et de protéines similaires d'arthropodes. Les résidus conservés du peptide signal sont indiqués en jaune. Les séquences de l'opiorphine (bleu) et de la sialorphine (vert) sont indiquées (Homme_opio, Rat_SIALO2). Les sites putatifs de maturation par les endopeptidases de type prohormoneconvertase/furine sont surlignés en rouge [RXXR ou RX(K ou R)R]. Les noms et numéros d'accèsion dans les banques de données des différentes séquences sont indiqués. Les numéros des différentes séquences d'arthropodes sont surlignés en rose. 12002008 : protéine 16 KD des glandes salivaires d'*Ixodes scapularis* ; 241839568 : protéine putative 16 KD des glandes salivaires d'*Ixodes scapularis* ; 67083645 : protéine putative sécrétée riche en Cysteine d'*Ixodes scapularis* ; 67083757 : protéine salivaire putative sécrétée d'*Ixodes scapularis* ; 56159933 : peptide putatif sécrété des glandes salivaires d'*Ixodes scapularis* ; 242002066 : protéine putative sécrétée d'*Ixodes scapularis*.

7. Analyse des propriétés inhibitrices des homologues « opiorphine/sialorphine »

Les différents peptides homologues identifiés ci-dessus ont été synthétisés pour analyser leur potentiel inhibiteur vis-à-vis des enképhalises APN et NEP (Tableau 5). Les peptides qui possèdent un résidu glutamine en NH₂-terminal ont également été synthétisés sous leur forme pyroglutamate. Une forme étendue du peptide HSGPR, HSGPRR, a également été synthétisée pour tester les propriétés d'un hexapeptide et l'undécapeptide VRGPRRQHNPR qui contient les séquences de la sialorphine et de l'homologue positionnel de l'opiorphine a également été étudié.

Gene	Peptide	séquence
<i>PROL1_Homo_sapiens</i>	Opiorphine	QRFSR
	O like	QRSFR
<i>PROL1_Pongo_abelii</i>	O1	QRFPR
	O2	pyroQ-RFPR
	O3	pyroQ-RGPR
<i>SMR3A_Homo_sapiens</i>	O4	QRGPR
	O5'	VRFPR
<i>SMR1_Rattus_norvegicus</i>	O5	VRGPR
<i>MSG3_Mus_musculus</i>	O6	HRGPR
<i>Canis_lupus_familiaris</i>	O7	HSGPRR
<i>Canis_lupus_familiaris</i>	O8	HSGPR

SMR2A_Mus_musculus	O9	HRAPR
SMR2_Mus_musculus	O10	QRGFR
	O10 like 1	VRFGR
	O10 like 2	VRGFR
	O10 like 3	QRFGR
SMR1_Rattus_norvegicus	O5+R+S	VRGPRRQHNPR
SMR1_Rattus_norvegicus	Sialorphine	QHNPR
SMR-L_Mus_musculus	S1	GQRDPR
SMR-L_Mus_musculus	S2	QRDPR
	S'2	pyroQ-RDPR
SMR2A_Mus_musculus	S3	GQHGPR
SMR2A_Mus_musculus	S4	QHGPR
SMR2_Mus_musculus	S5	GQHDPTR
SMR2_Mus_musculus	S6	QHDPTR
Equus_caballus_Opio	pep 1	QRGLR
Loxodonta_africana_Opio	pep2	QRVAR
Callithrix_jacchus_PROL	pep3	QRFPGR
Myotis_brandtii	pep4	QRAPR
Nomascus_leucogenys_Opio3	pep5	QGGPR
Rattus_norvegicus_SIALO4	pep6	QHNLNLR
Tupaia_chinensis_OPIO	pep7	QRAPIR

Tableau 5 : Liste des peptides homologues de l'opiorphine et la sialorphine. Le nom du gène, l'espèce, la nomenclature et la séquence de chaque peptide sont indiqués respectivement.

Les résultats des tests d'inhibition réalisés avec ces différents peptides vis-à-vis de l'APN et de la NEP sont schématisés sur les figures 42 et 43. Ils sont reportés sous forme d'histogrammes pour une lecture plus aisée. Nous avons commencé par effectuer le criblage des peptides en utilisant une concentration finale de 10 et 100 μM de peptide vis-à-vis de l'APN et de la NEP. Les résultats bruts montraient que la concentration de 10 μM était adaptée pour l'APN, mais pas pour la NEP (aucune inhibition observée), la concentration de 100 μM a donc été conservée. Des tests d'inhibition par l'opiorphine et le peptide O10 vis-à-vis de l'Ap-B ont été réalisés, il s'est avéré que l'activité de cette dernière n'était pas inhibée pas ces peptides.

Il est important de constater que la totalité des peptides testés sont des inhibiteurs de l'APN, aussi efficaces que l'opiorphine. Nous pouvons, en effet, observer un pourcentage d'inhibition élevé avec O4 (QRGPR) et O5 (VRGPR) vis-à-vis de l'APN (70% et 90% respectivement). La pyro-glutamylation NH₂-terminale des peptides diminue le pouvoir inhibiteur des peptides (O2 et O3).

En revanche, la quasi-totalité de ces peptides n'inhibe pas la NEP à 100 µM (Figure 43 ; Tableau 6). Seul le O10 (QRGPR) montre une inhibition de l'activité enzymatique de l'ordre de 30 %. Il est à noter, qu'entre nos mains, le pourcentage d'inhibition obtenu avec l'opiorphine et la NEP est légèrement inférieur à 50 %, donc le O10 inhibe mieux la NEP que l'opiorphine.

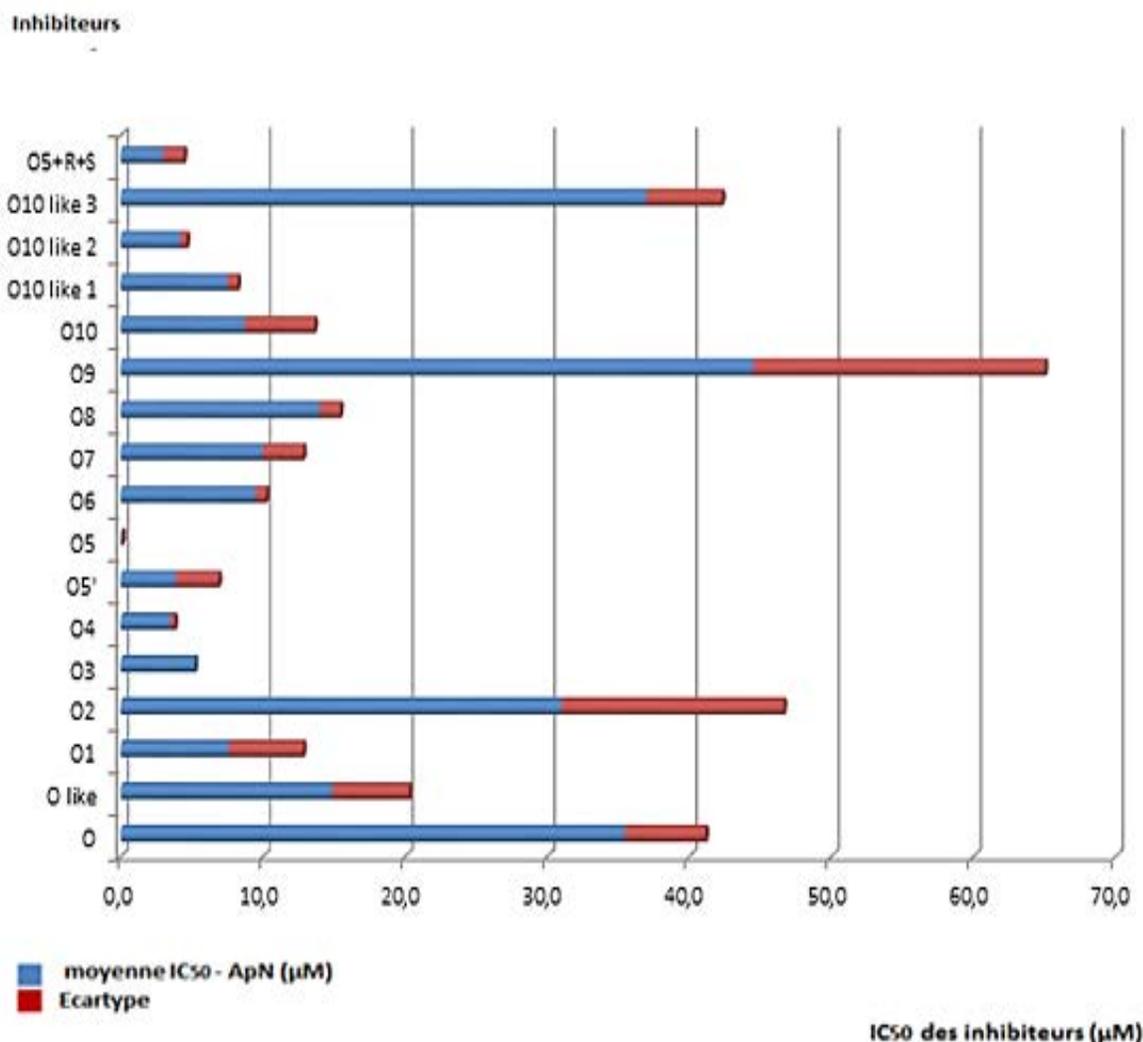


Figure 42 : Histogrammes représentant l'IC₅₀ des peptides synthétiques de type opiorphine vis-à-vis de l'APN. La moyenne des IC₅₀ a été calculée suite aux tests enzymatiques effectués en triplet (IC₅₀ des inhibiteurs en bleu, l'écart type en rouge). La nomenclature des peptides est indiquée dans le Tableau 5. L'opiorphine (O; QRFSR) et la sialorphine (S; QHNPR) sont utilisés comme contrôles positifs.

Inhibiteurs

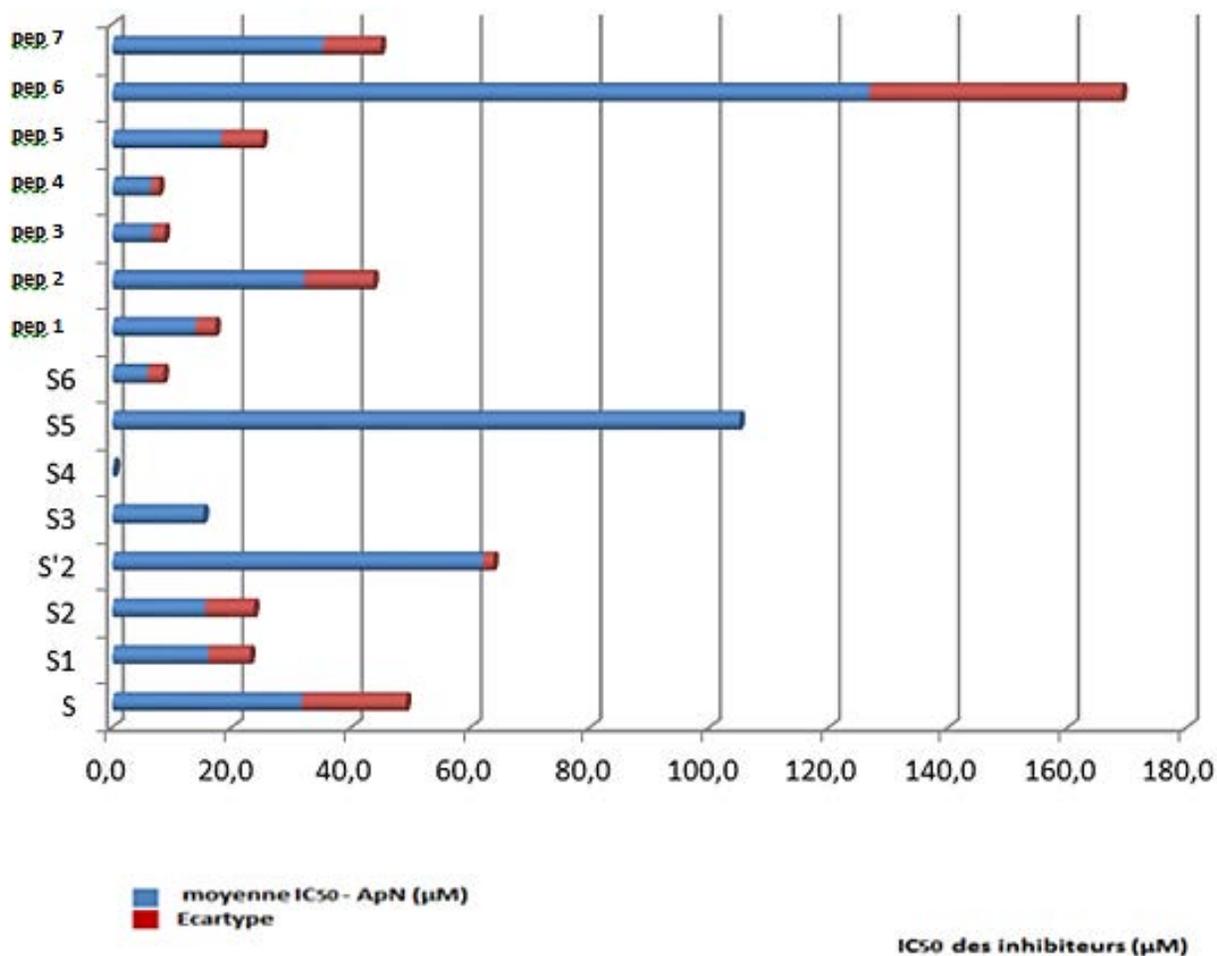


Figure 42 bis : Histogrammes représentant l'IC₅₀ des peptides synthétiques de type sialorphine vis-à-vis de l'APN. La moyenne des IC₅₀ a été calculée suite aux tests enzymatiques effectués en triplet (IC₅₀ des inhibiteurs en bleu, l'écart type en rouge). La nomenclature des peptides est indiquée dans le Tableau 5. L'opiorphine (O; QRFSR) et la sialorphine (S; QHNPR) sont utilisés comme contrôles positifs.

Les IC₅₀ des différents peptides vis-à-vis de l'APN ont été calculés (Figure 42 ; Tableau 6). Concernant la NEP, les pourcentages d'inhibition par les peptides synthétiques sont très faibles donc seul le O10 (QRGFR) est un double inhibiteur potentiel (Figure 43).

En ce qui concerne l'APN, le calcul des différentes IC₅₀ confirme les résultats sur les pourcentages d'inhibition. Par rapport à la valeur obtenue avec l'opiorphine (30 μM) ou la sialorphine (44 μM), la totalité des peptides synthétiques testés, à l'exception des peptides O9, S5 et pep 6, sont de meilleurs inhibiteurs de l'activité APN. Le pouvoir inhibiteur de ces peptides est de 3 à 60 fois (O5, VRGPR) supérieur à celui de l'opiorphine.

En ce qui concerne la NEP, l'IC₅₀ du O10 (QRGFR) est deux fois supérieure à celui de l'opiorphine (Figure 44). Les autres peptides ont une IC₅₀ qui dépasse les 200 μM.

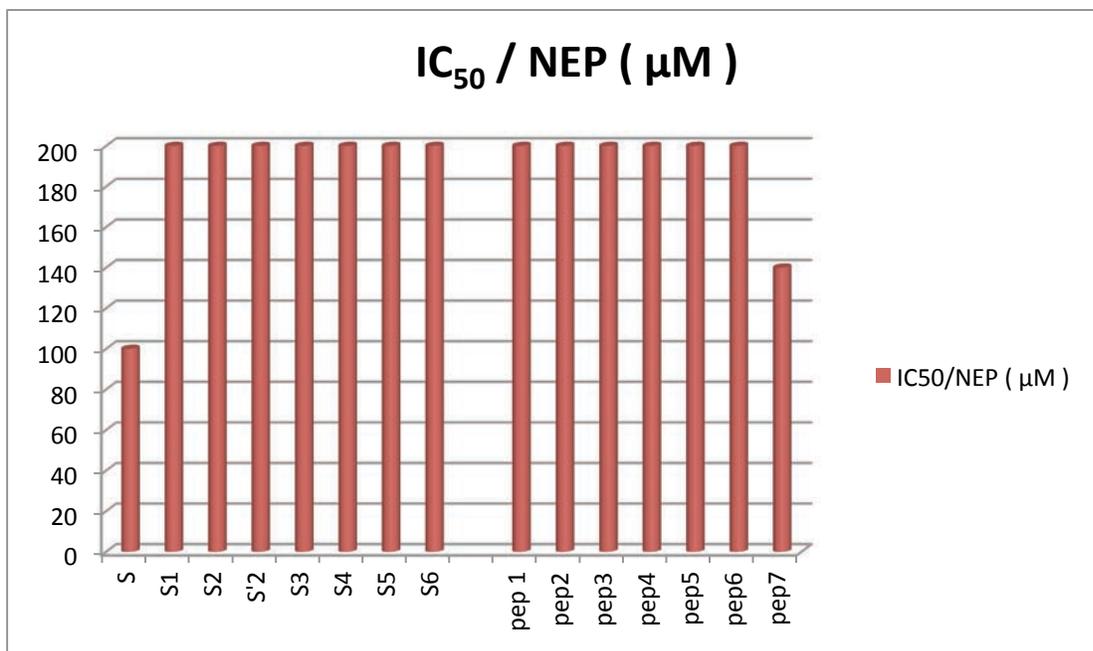
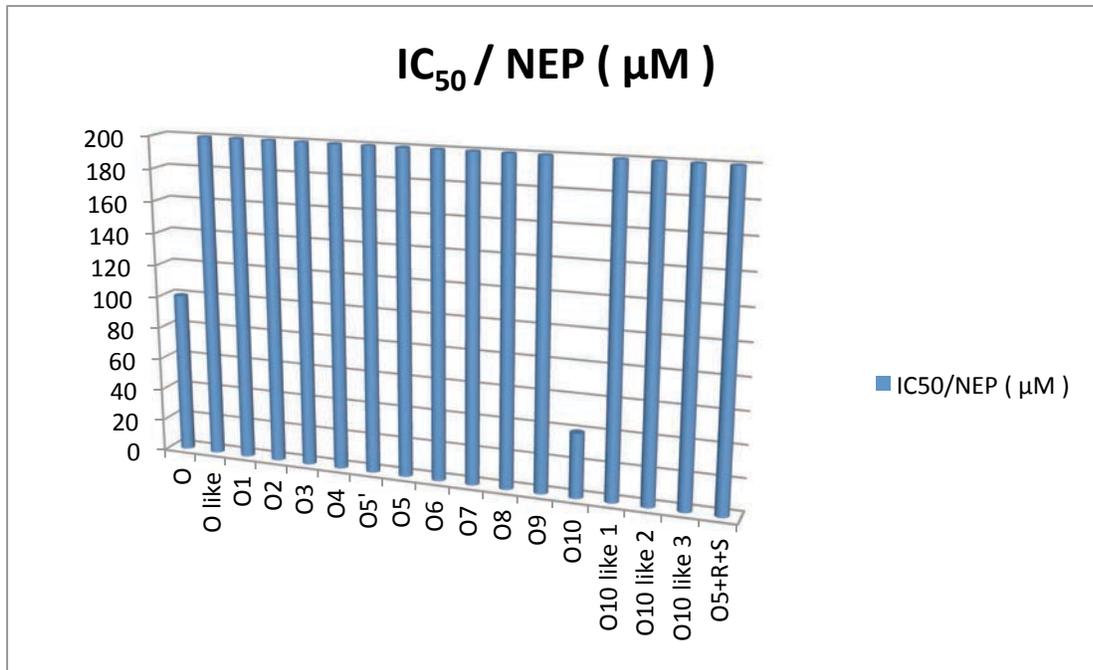


Figure 43 : Histogrammes représentant l'IC₅₀ des peptides synthétiques vis-à-vis de la NEP. La nomenclature des peptides est mentionnée dans le Tableau 5. L'Opiorphine (O; QRFSR) et la sialorphine (S; QHNPR) sont utilisés comme contrôles positifs.

Contrairement aux opiorphine et sialorphine, la quasi totalité de ces peptides ne peut donc être considérée comme un double inhibiteur des activités APN et NEP. Toutefois, le O10, QRGFR, présente un pouvoir inhibiteur plus important sur la NEP d'un facteur 2 et sur l'APN d'un facteur 4 à 5, par rapport aux molécules de référence.

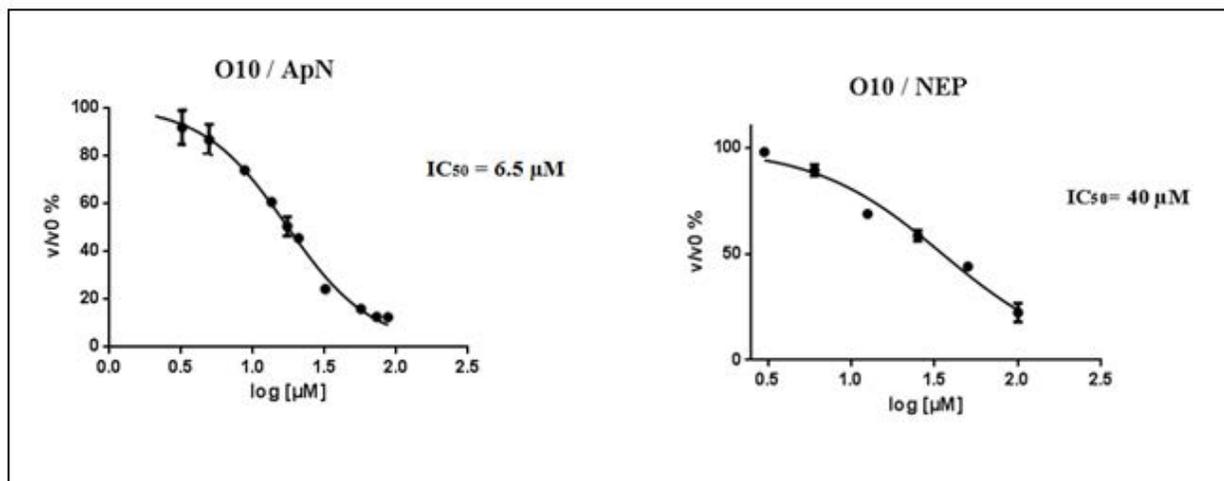


Figure 44 : exemple de l'activité du peptide O10 (QRGFR) en fonction du pourcentage V/V0. V, vitesse de l'enzyme en présence de l'inhibiteur ; V₀, vitesse de l'enzyme sans inhibiteur. En abscisse, le log des différentes concentrations d'inhibiteur de 0 à 100 µM. Les mesures ont été réalisées en triplet et les valeurs d'IC₅₀ sont les moyennes ± l'écart type de deux séries de tests. Les valeurs ont été transformées en pourcentage et normalisées par rapport aux contrôles.

gène	peptide	séquence	MM (g/mol)	IC ₅₀ - APN (µM)	±	IC ₅₀ - NEP (µM)
PROL1_Homo_sapiens	Opio	QRFSR	692	30		100
	O like	QRSFR	692	10,35	0,25	> 200
PROL1_Pongo_abelii	O1	QRFPR	702	3,85	1,65	> 200
	O2	pyroQ-RFPR	684	46	0	> 200
	O3	pyroQ-RGPR	594	5,2		
SMR3A_Homo_sapiens	O4	QRGPR	612	3,51	0,19	> 200
	O5'	VRFPFR	673	3,9	2,1	> 200
SMR1_Rattus_norvegicus	O5	VRGPR	583	0,09	0,01	> 200
MSG3_Mus_musculus	O6	HRGPR	621	9,5	0,5	> 200
Canis_lupus_familiaris	O7	HSGPRR	708	10	2	> 200
Canis_lupus_familiaris	O8	HSGPR	552	14	1	> 200
SMR2A_Mus_musculus	O9	HRAPR	635	44,5	14,5	> 200
SMR2_Mus_musculus	O10	QRGFR	662	6,55	0,55	40
	O10 like 1	VRFGFR	634	7,5	0,5	> 200
	O10 like 2	VRGFR	634	4,2	0,3	> 200
	O10 like 3	QRFGFR	662	37	3,05	> 200
SMR1_Rattus_norvegicus	O5+R+S	RGPRRQHNP	1372	3	1	> 200
SMR1_Rattus_norvegicus	Sialo	QHNPR	650	44	0	100
SMR-L_Mus_musculus	S1	GQRDPR	727	16	4,04	> 200
SMR-L_Mus_musculus	S2	QRDPR	670	10,825	0,17	> 200
	S'2	pyroQ-RDPR	652	62	1	> 200
SMR2A_Mus_musculus	S3	QHGPR	650			> 200
SMR2A_Mus_musculus	S4	QHGPR	593	0,3	0	> 200
SMR2_Mus_musculus	S5	GQHDPTR	809	105	0	> 200
SMR2_Mus_musculus	S6	QHDPTR	752	3	0	> 200
Equus_caballus_Opio	pep 1	QRGLR	628	13,93	1,87	> 200
Loxodonta_africana_Opio	pep2	QRVAR	628	32,13	6,65	> 200
Callithrix_jacchus_PROL	pep3	QRFPGFR	759	6,56	1,23	> 200
Myotis_brandtii	pep4	QRAPR	626	6,43	0,78	> 200
Nomascus_leucogenys_Opio3	pep5	QGGPR	513	18,2	3,971	> 200
Rattus_norvegicus_SIALO4	pep6	QHNLIR	666	136,83	27,66	> 200
Tupaia_chinensis_OPIO	pep7	QRAPIR	739	39,25	6,75	140

Tableau 6 : IC₅₀ des peptides synthétiques vis-à-vis de l'ApN et la NEP

Cependant, ce travail met en évidence l'existence potentielle d'une nouvelle famille d'inhibiteurs au moins de l'activité APN, il reste à démontrer que ces peptides sont bien exprimés *in vivo*.

Conclusion - Discussion

Chez les Mammifères, les enképhalines sont des neuromédiateurs peptidiques des voies opioïdiques. Elles jouent un rôle clé dans le contrôle des réponses adaptatives de l'organisme à un stress physique ou émotionnel, notamment dans le contrôle des voies de transmission de la douleur. Après sécrétion par des neurones spécifiques, les enképhalines sont très rapidement dégradées par 2 métallo-ectopeptidases membranaires, la NEP et l'APN. Ces ecto-enképhalines interrompent l'action analgésique de ces peptides afin d'éviter des dommages à l'organisme et jouent donc un rôle crucial dans la modulation dynamique de la transmission douloureuse.

Une approche de physio-pharmaco-chimie post-génomique a permis d'identifier deux pentapeptides inhibiteurs physiologiques des activités ecto-enképhalines : la sialorphine (QHNPR ; Rougeot et al., 2003), synthétisée majoritairement par les glandes sous-maxillaires et prostatique de rat mâle adulte ; l'opiorphine (QRFSR ; Wisner et al., 2006), un homologue fonctionnel sécrété notamment dans la salive humaine. Ces deux peptides diffèrent par leur séquence, leur charge nette et leur hydrophobie, ils sont cependant issus de la maturation sélective de la région NH₂-terminale de protéines des familles PROL1 (Proline-rich protein1) et SMR1 (Sub-mandibular rat protein 1). Certaines protéines de cette famille étaient jusqu'alors connues pour inhiber la nucléation des sels de calcium et la formation de cristaux d'hydroxyapatite de la dent. *In vitro*, la sialorphine et l'opiorphine sont des doubles inhibiteurs compétitifs des activités NEP et APN. *In vivo*, ils sont capables d'induire une analgésie équivalente à celle de la morphine, mais avec des effets secondaires bien moindres.

Le potentiel thérapeutique de telles molécules est évident, cependant leur mécanisme d'action reste mal connu car les études structure/fonction réalisées sur ces peptides sont peu nombreuses. La première étude des relations structure-activité de l'opiorphine a révélé que le résidu Phe en position 3 (substitué par Asn dans la sialorphine) était crucial pour l'activité inhibitrice du peptide envers la NEP et l'APN (Rosa et al., 2012).

Des données supplémentaires sont donc nécessaires au développement d'inhibiteurs plus puissants que l'opiorphine et la sialorphine. Ces peptides pouvant être considérés comme « orphelins », nous avons recherché des homologues dans les banques de données. Cette recherche de séquences nous a permis d'identifier, chez les Mammifères, des analogues positionnels de l'opiorphine, et de la sialorphine. Des tests ont montré que tous étaient capables d'inhiber l'APN, certains avec une efficacité 30 fois supérieure à celle de l'opiorphine, mais un seul inhibiteur de

la NEP a pu être vraiment identifié. Nos résultats mettent cependant en évidence l'existence d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de l'APN et un nouveau double inhibiteur qui rejoindra l'opiorphine et la sialorphine. Il reste à prouver leur existence *in vivo*. Il est remarquable de constater qu'une population de pentapeptides qui possèdent jusqu'à 60 % de polymorphisme en structure primaire puisse avoir un pouvoir inhibiteur comparable.

Dans notre cas, les résultats obtenus avec les peptides synthétiques, montrent que ces relations structure/activité semblent plus complexes, puisque les peptides QRFPR (O1), VRFPR (O5'), VRFGR (O10-like1), QRFGR (O10-like 3) et QRFPGR (pep 3) ne provoquent pas d'inhibition de l'activité NEP, bien que Phe3 soit présente. Par contre dans le cas du peptide QRFPR (O5'), la substitution de Gly en Phe, en position 3 ne serait pas responsable de la perte de l'activité NEP puisque QRGPR (O5) ne l'inhibe pas non plus, alors qu'il est le meilleur inhibiteur de l'APN de tous les homologues synthétisés. Dans le cas du peptide QRFGR (O10-like 3), l'inversion de Gly en Phe, en position 3 serait responsable de la perte de l'activité NEP. Ceci peut être confirmé par le peptide QRGFR (O10), qui conserve un potentiel inhibiteur pour la NEP en dépit d'une double substitution par rapport à la séquence opiorphine (Phe3 -> Gly ; Ser4 -> Phe). Nous avons synthétisés un hexa-peptide QRFPGR (pep 3) et un pentapeptide VRFGR (O10-like1) mais ils ne provoquent pas d'inhibition de l'activité NEP, bien que Phe3 soit présente. L'activité inhibitrice de l'opiorphine et de l'O10 ont été testées vis-à-vis de l'Ap-B, aucun d'entre eux n'inhibe cette aminopeptidase qui appartient également à la famille M1, tout comme l'Ap-N. Cette observation reste logique dans la mesure où l'Ap-B semble appartenir (avec la LTA4H) à une sous-famille au sein de la famille M1, avec une structure 3D en 3 domaines, versus 4 domaines pour les aminopeptidases comme l'APN et les ERAP 1 et 2. De plus, les spécificités de substrats de ces enzymes sont différentes. Il existerait donc bien une spécificité de l'opiorphine et de la sialorphine pour l'APN. Toutefois, le potentiel inhibiteur de ces pentapeptides n'a pas été testé sur d'autres aminopeptidases de cette famille (LTA4H, Ap-A, ERAP1 et 2, etc.).

Afin de mieux comprendre comment ces peptides interagissent avec le substrat, il serait préférable de cristalliser ces enzymes avec les peptides doubles inhibiteurs.

Les résultats des analyses de séquences mettent en évidence une conservation parfaite de l'opiorphine chez les Hominoïdes (Homme, Chimpanzé, Gorille, Orang-outan, Gibbon), cette

identité parfaite disparaît (< 80 %) chez les autres Primates et Mammifères. La sialorphine n'existe que chez le rat et demeure indétectable dans toutes les autres espèces, même chez la souris. Les processus évolutifs qui ont permis l'apparition de tels peptides semblent donc très complexes (évolution convergente ?).

Dans notre cas, les résultats obtenus avec les homologues synthétiques de la sialorphine, montrent que ces relations structure/activité semblent encore plus complexes, puisque les peptides QHGPR (S4), et QHNLR (pep 6) ne provoquent pas d'inhibition de l'activité NEP, rien que par la substitution d'un seul résidu d'acide aminé. Dans le cas du peptide QHGPR (S4), la substitution d'Asn en Gly, en position 3 serait responsable de la perte de l'activité NEP, par contre il inhibe l'APN 146 fois mieux que la sialorphine. Dans le cas du peptide QHNLR (pep 6), la substitution de Pro en Leu, en position 4 serait responsable de la perte de l'activité NEP et d'une moins bonne activité inhibitrice de l'APN. L'hexapeptide QRAPIR (pep 7) conserve un potentiel inhibiteur pour la NEP en s'approchant de celui de la sialorphine, en dépit d'une double substitution et d'une insertion par rapport à la séquence de cette dernière (His2-> Arg ; Asn3 -> Ala et Ile entre Pro et Arg). C'est le seul homologue de la sialorphine double inhibiteur APN et NEP.

Le nombre d'espèces dans lesquelles ces deux peptides ont été identifiés dans nos analyses est faible et l'ensemble des séquences ne peut être trouvé qu'en ajoutant du poids au peptide signal de la séquence précurseur, en ne conservant que les 60 premiers acides aminés. Cette séquence signal semble être associée à un processus de sécrétion spécifique aux glandes salivaires. Nous avons récemment utilisé cette séquence seule pour effectuer des recherches dans les banques de données. L'analyse taxonomique des homologues putatifs montre, qu'en plus des Mammifères, de nombreuses séquences d'Arthropodes sont détectées, dont celles de membres de l'ordre des *Ixodida* (tiques). Certaines de ces séquences ont été caractérisées à partir de glandes salivaires d'*Ixodes scapularis* (tique du cerf en Amérique du nord), seul génome de tique séquencé à ce jour. Nous pensons donc avoir identifié une séquence signal présente chez les Arthropodes et qui pourrait être spécifique d'un mécanisme de sécrétion dans les glandes salivaires. Cependant, dans les séquences analysées, nous n'avons pas trouvé de séquences similaires à l'opiorphine ou la sialorphine, ce qui pourrait être lié à un polymorphisme encore plus important de ces tickorphines. Des recherches *in silico* et des expériences complémentaires doivent être menées pour confirmer ces résultats encore préliminaires.

Une seconde partie de mon travail de thèse consistait à rechercher des peptides antinociceptifs dans les glandes salivaires d'*Ixodes ricinus*, une tique de la famille des *Ixodidae* appartenant au sous-ordre des *Ixodina* ou tiques dures. Cet Acarien semble constituer un modèle de choix pour la mise en évidence d'analogues de l'opiorphine/sialorphine, car il ne déclenche aucun mécanisme conduisant à la sensation de douleur lors de son repas sanguin chez l'hôte vertébré. Beaucoup de facteurs anticoagulants et immunosuppresseurs ont été caractérisés dans la salive des tiques mais, à l'heure actuelle, aucune substance anti-nociceptive.

En collaboration avec Sarah Bonnet (USC INRA Bartonella-tiques, VECTOTIQ group, Maison Alfort), nous avons collecté des tiques, puis disséqués des glandes salivaires d'*Ixodes ricinus*. Le protocole de prélèvement des glandes salivaires d'*I. ricinus* sous loupe binoculaire a été rapidement acquis, demême que celui d'extraction des peptides à partir des glandes salivaires. Nous avons ainsi obtenu quelques milligrammes d'extraitsbruts lyophilisés à partir de femelles adultes.

Nous avons ensuite mis en œuvre un fractionnement bioguidé en réalisant principalement des tests d'inhibition de l'activité APN, mais également sur la NEP, avec un extrait peptidique de glandes salivaires. Le chromatogramme HPLC de l'extrait pré-purifié sur Sep-Pak C18 n'a malheureusement pas révélé de matériel en quantité suffisante dans la zone d'élution de l'opiorphine et de la sialorphine, nos peptides de référence.

Quoi qu'il en soit, certaines fractions, obtenues après passage sur HPLC analytique, ont montré une faible activité d'inhibition de la NEP, ce qui pourrait être lié, entre autres, à un manque de matériel biologique. Cette hypothèse est consolidée par l'analyse de l'extrait pré-purifié par spectrométrie de masse MALDI-TOF qui a révélé des pics potentiellement intéressants, qui par la suite ne sont pas analysables par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF.

D'autres fractions n'ont révélé aucune activité inhibitrice vis-à-vis des enképhalinases, ou n'ont mis en évidence une activation inattendue de l'APN.

Il nous semble aujourd'hui évident qu'une quantité plus importante de matériel est nécessaire pour poursuivre ce projet. En effet, les étapes de purification ont probablement entraîné une perte de matériel, de même que le passage sur HPLC qui ajoute un facteur de dilution important. Une autre hypothèse serait que les molécules anti-nociceptives potentielles

que nous recherchons soient de nature non peptidique et donc exclues de nos échantillons par les techniques d'extraction et de purification utilisées. Parmi les autres perspectives, nous espérons beaucoup de l'annotation complète du génome d'*Ixodes scapularis* qui a été séquencé, mais pour lequel il reste encore beaucoup à faire et surtout de la détermination et de l'analyse du transcriptome d'*Ixodes ricinus* qui vient de s'achever dans le laboratoire de Sarah Bonnet. Ceci pourrait grandement nous aider dans la recherche des Tickorphines sur le plan des analyses de séquences, mais également sur celui des analyses en spectrométrie de masse. Nous pourrions ensuite analyser, si cela est possible, plus finement les relations évolutives entre ces peptides de tique et l'opiorphine et la sialorphine des Mammifères.

Le projet futur ne serait donc pas très différent du projet actuel, il viserait à :

- Isoler par voie biochimique (chromatographie HPLC, fractionnement bioguidé, substrats fluorescents, FRET) et caractériser au niveau moléculaire (séquençage d'Edman) les peptides extraits de glandes salivaires ou de salive de *I. ricinus* ayant la capacité d'inhiber l'activité des deux ectopeptidases humaines (NEP et APN) impliquées dans l'inactivation physiologique des enképhalines chez l'homme.
- Evaluer leur potentiel inhibiteur *in vitro* vis-à-vis de la NEP et de l'APN. Une synthèse peptidique en phase solide serait réalisée afin de produire une grande quantité et de s'assurer que c'est une propriété intrinsèque du peptide. Les paramètres cinétiques seraient déterminés (IC50 et Ki), ainsi que la structure secondaire et tertiaire.
- Evaluer leur effet analgésique *in vivo* (tests de douleur mécanique et/ou thermique après injection intra-cérébro-ventriculaire ou intraveineuse chez la souris).
- Identifier les gènes codant les précurseurs de ces séquences peptidiques afin de vérifier leur parenté évolutive avec l'opiorphine et la sialorphine des Mammifères.
- Identifier, à l'aide de ce marqueur phylogénétique et par analyses bio-informatiques, de nouveaux peptides « opiorphine-like » chez d'autres Vertébrés et Invertébrés. Ces nouveaux peptides seraient alors soumis au même crible d'analyses *in vitro* et *in vivo* que les Tickorphines.

Cette approche devrait :

- i) valider l'opiorphine comme membre générique d'une nouvelle famille de médiateurs peptidiques impliqués dans le contrôle de grandes fonctions physiologiques chez les

Vertébrés ;

- ii) augmenter le panel de peptides apparentés à l'opiorphine ;
- iii) permettre d'étudier les relations structure-fonction d'une famille naturelle de peptides homologues dont l'activité et l'efficacité ont vraisemblablement été affutées au cours de l'évolution.

Autres travaux

I. Produits naturels et activité de l'Ap-B

Comme vu précédemment, l'Ap-B appartient à la famille M1 des Zn^{2+} -aminopeptidases, enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison peptidique du côté carbonyle de l'acide aminé présent en N-terminal du peptide. Cette fonction est essentielle pour des mécanismes tels que la maturation ou la dégradation d'un peptide ou d'une protéine et dépend de la localisation subcellulaire de l'enzyme. De plus, certaines de ces aminopeptidases indépendamment de leur activité aminopeptidase sont des récepteurs membranaires. C'est le cas de l'APN qui est un récepteur du *coronavirus* HCoV-229E (Chen et al., 2012) et même de l'agent du paludisme, *Plasmodium falciparum* (Atkinson et al., 2015). Ces enzymes sont particulièrement étudiées car elles jouent des fonctions physiologiques importantes chez les mammifères. La recherche se concentre donc sur la conception d'inhibiteurs spécifiques de celles-ci puisque certaines de ces aminopeptidases sont clairement identifiées comme des acteurs principaux impliqués dans des pathologies. C'est le cas notamment de l'Ap-A dans l'hypertension (Yang et al., 2013), de la LTA4H dans l'inflammation (Rinaldo-Matthis & Haeggström, 2010) et de l'APN dans le cancer (Sanz et al., 2015). Quant à l'Ap-B, elle intervient dans la maturation protéolytique donnant le miniglucagon, un peptide nécessaire pour maintenir l'homéostasie du glucose, dans la production de la cholécystokinine-8, un neuropeptide pléiotropique et dans la dégradation cytoplasmique d'un épitope du cytomégalovirus humain (Fontès et al., 2005, Beinfeld et al., 2009 ; Urban et al., 2012). Ses propriétés catalytiques, son expression ubiquitaire et ses différentes localisations subcellulaires offrent à l'Ap-B la possibilité de maturer ou de dégrader de nombreux substrats peptidiques dans des cellules de mammifères, mais il est clair, qu'aujourd'hui encore, beaucoup de ses fonctions physiologiques restent à découvrir.

Dans le cadre de la recherche de ses fonctions biologiques, la proximité phylogénétique de l'Ap-B avec la LTA4H nous encourage à tester certaines molécules reportées inhiber cette dernière. Cette enzyme est, rappelons-le, impliquée dans la production du LTB₄, un médiateur lipidique de l'inflammation et, de ce fait, capable de stimuler la prolifération des cellules cancéreuses (Tong et al., 2002). Ainsi, nous avons testé le resvératrol sur l'activité Ap-B, un polyphénol issu du vin rouge reporté diminuer la prolifération et la croissance du cancer du pancréas en inhibant la LTA4H (Oi et al., 2010).

Nous avons également étudié l'effet sur l'activité Ap-B de différentes molécules naturelles issues de végétaux qui s'apparentent plus ou moins au resvératrol par leur caractère polyphénolique, telles que la curcumine ou la mangiférine. La curcumine est un composant issu du curcuma, lui-même isolé à partir du rhizome de la plante *Curcuma longa*. Elle est utilisée depuis plus de 4000 ans dans la médecine traditionnelle chinoise et dans la médecine Ayurvédique indienne. Cette molécule a de nombreuses cibles cellulaires et joue de multiples rôles dans la protection cellulaire. Elle présente de nombreuses activités, principalement anti-inflammatoires, anti-cancéreuses, anti-oxydantes et anti-diabétique (Heger et al., 2013 ; Ghosh et al., 2015). La mangiférine, quant à elle, est une xanthone qui provient de nombreuses espèces de plantes et principalement du manguier *Mangifera indica*. C'est également un pharmacophore avec énormément d'activités biologiques, nous pouvons citer des effets protecteurs vis-à-vis des maladies associées au stress oxydatif, antiseptique et contre le diabète de type 2 (Sellés et al., 2015). Ces molécules s'avèrent donc des candidats intéressants à tester sur l'activité Ap-B d'autant que cette enzyme peut avoir une implication dans le diabète de type 2 par son rôle dans la production du miniglucagon au niveau des cellules alpha du pancréas.

I. Matériels et Méthodes

1. Provenance des agents chimiques

Curcumine, mangiférine, trans-resvératrol et acide chlorogénique sont fournis par Sigma-Aldrich. Les acides sinapique et férulique sont fournis par Fluka. Les substrats Arg-AMC (7-amino-4-méthylcoumarine) et AMC proviennent de PeptaNova. L'acide salicylique provient d'Alfa Aesar.

2. Synthèse et purification de peptides

Les substrats peptidiques Arg₀-Leu₅- et Leu₅-enképhaline ont été synthétisés sur la Plateforme de synthèses peptidique de l'IBPS (FR3631 UPMC-CNRS, Paris) en utilisant une chimie de type Fmoc et un synthétiseur automatique Applied Biosystems 433A. Les peptides ont été purifiés par HPLC semi-préparative (colonne reverse-phase C18, module PrepLC 25 mm, 250 mm x 100 mm ; Waters, France) sur une HPLC Waters 1252 (débit de 8 ml/min avec un gradient linéaire de 0 à 60% d'ACN (0,07% de TFA) dans 0,1% de TFA/H₂O (1% d'ACN/min). L'homogénéité et l'identité des peptides de synthèse ont été évalués par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Voyager DE-P60, Applied Biosystems ; Plateforme de Spectrométrie de masse et protéomique,

IBPS, FR3631 UPMC-CNRS, Paris) et RP-HPLC analytique sur une colonne C-18 (5 mm, 4,6 mm 9 250 mm ; Waters, France) en utilisant les conditions ci-dessus avec un débit de 0,75 ml/min.

3. Aminopeptidase B : expression et sécrétion dans le milieu de culture Sf9

L'expression et la purification de l'Ap-B recombinante (étiquette Histidine en COOH-terminal) exprimée dans un système de type Baculovirus est décrite dans Cadel et al., 2004. Brièvement, 200 mL du milieu de culture de cellules Sf9 infectées par un baculovirus recombinant exprimant l'Ap-B de rat ont été concentrés et équilibrés dans du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8 en utilisant une membrane Vivaflow (coupure 10 000 MWC, Sartorius SA). Ensuite, 40 mL des 120 mL du milieu résultant ont été ajustés à 50 mL avec une concentration finale de 0,5 M NaCl et 20 mM imidazole et appliqués sur une colonne de His-Trap 5 mL (GE Healthcare). L'expérience a été réalisée trois fois. Les fractions éluées ayant une activité Ap-B ont été réunies, concentrées et équilibrée dans un tampon 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl en utilisant une membrane Amicon (Millipore). Deux mL de cette préparation concentrée ont été appliqués sur une chromatographie d'exclusion (Hiload Superdex 200 16/60, GE Heathcare) équilibrée avec un tampon 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl. Les fractions actives résultantes correspondant à la protéine monomérique ont été rassemblées et concentrées à 500 µL (111 ng/µl).

4. Tests enzymatiques de l'Ap-B vis-à-vis de l'Arg-AMC et tests d'inhibition *in vitro* de l'Ap-B avec différentes molécules naturelles.

Les dosages ont été effectués dans un mélange réactionnel de 100 µL de tampon 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1% Tween 20. Pour la détermination des paramètres cinétiques, une gamme de 0 à 500 µM de concentration finale d'un substrat Arg-AMC (Peptanova, Japon) et 3, 9 ng d'enzyme purifiée ont été utilisés par essai. La mesure de l'activité enzymatique a été réalisée sur un spectrofluorimètre Fluostar Galaxy, à 28 °C, dans lequel les échantillons sont excités à 380 nm et émettent à 460 nm. L'émission de fluorescence est recueillie pendant 40 minutes. Une courbe standard a été réalisée avec une gamme de 0 à 2,5 µM d'AMC. Le logiciel GraphPad Prism (Ritme, France) permet le calcul de la vitesse enzymatique (pente/min) dans les conditions de Michaelis-Menten. Pour la détermination de l'effet inhibiteur de molécules naturelles, la mangiférine et la curcumine ont été solubilisées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à la

concentration de 10 mM, ou dans du Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, tampon avec 0,1% de Tween 20 pour les concentrations allant de 1 mM à 250 μ M initial. Le mélange réactionnel de 100 μ l est constitué de 20 μ l de curcumine ou mangiférine solubilisées à une concentration variant entre 0 et 1 mM, 70 μ L avec 3,44 ng d'enzyme et 10 μ l de d'Arg-MCA dans un tampon 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,0,1% Tween 20. La concentration finale de l'inhibiteur varie entre 0 et 200 μ M et la concentration du substrat Arg-AMC est de 20, 40, 80 ou 120 μ M. Une solution 10 mM, solubilisée dans l'éthanol 100 %, a été utilisée pour les autres inhibiteurs. Les tests ont été réalisés avec une concentration finale de 100, 200 et 400 μ M d'inhibiteur, toujours dans un tampon 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,1% tween 20. Tous les tests réactionnels ont été réalisés en triple exemplaire et l'erreur standard moyenne (SEM) a été calculée.

5. Analyse cinétique de l'inhibition de l'activité Ap-B

La détermination de l'IC₅₀, concentration d'inhibiteur pour laquelle 50% d'inhibition de l'activité enzymatique est obtenue, a été déterminée avec le logiciel GraphPad Prism (Ritme, France). La détermination de la valeur de Ki a été obtenue à l'aide de la représentation de Dixon en utilisant le logiciel Kaleidagraph (Ritme, France). La détermination du type d'inhibition de la curcumine et de la mangiférine et celle des paramètres cinétiques ont été effectuées avec la représentation de Hanes-Woolf, en utilisant le logiciel Kaleidagraph (Ritme, France).

6. Test de l'activité Ap-B sur le peptide Arg₀-Leu₅-enképhaline

Les essais enzymatiques ont été réalisées en utilisant 900 ng d'Ap-B purifiée, 10 μ g de substrat Arg₀-Leu₅-enképhaline (RLE) en absence ou en présence d'une concentration finale de curcumine égale à 50 μ M dans un volume total de 100 μ L dans du tampon 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4. La réaction est arrêtée après 13 h par addition d'acide trifluoroacétique (TFA), 0, 3 % final. Les échantillons ont été injectés sur une colonne C18 (5 μ m de diamètre; UP5WRP-25K Interchrom; Interchim, France) en combinaison avec une HPLC (Waters, USA). Les peptides sont élués avec un gradient d'acétonitrile (0,7 % de TFA) de 0 à 60 % dans l'eau (0,1 % de TFA) à un débit de 1 mL par minute (temps total, 40 min).

7. Analyse en spectrométrie de masse

L'éluât des pics 1 et 2, correspondant théoriquement et respectivement aux peptides Arg₀-Leu₅-

enképhaline et Leu₅-enképhaline (LE) a été récupéré, séché par centrifugation sous vide (Speed Vac), repris dans 10 μL et dilué au $1/10^{\text{ème}}$ H₂O-0,1 % acide trifluoroacétique (TFA). Pour chaque peptide, un mélange 1:1 avec de la matrice HCCA a été effectué et analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Voyager DE-P60, Applied Biosystems). Les masses monoisotopiques des peptides RLE (pic 1 ; 712, 3508 Da) et LE (pic 2 ; 556, 2657) ont été confirmées (Plateforme de Spectrométrie de masse et protéomique, IBPS, FR3631 UPMC-CNRS, Paris).

8. Analyse du positionnement du resvératrol dans le modèle de la structure 3D de l'Ap-B.

La molécule de resvératrol a été ancrée par superposition du modèle 3D de l'Ap-B (Pham et al., 2007) avec la structure cristallisée en présence de resvératrol de la LTA4H (pdb: 3FTS), à l'aide du logiciel DaliLite (Groupe de recherche Thornton, EMBL-EBI). Les images des structures ont été réalisées en utilisant le logiciel de visualisation Visual Molecular Dynamic (VMD ; Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois, USA).

III. Résultats

1. Détermination des paramètres cinétiques de l'Ap-B vis-à-vis du substrat Arg-AMC.

Avant de tester différents inhibiteurs et pour mettre au point les tests enzymatiques, les paramètres cinétiques de l'Ap-B ont été déterminés vis-à-vis du substrat Arg-AMC (Figure 45-A).

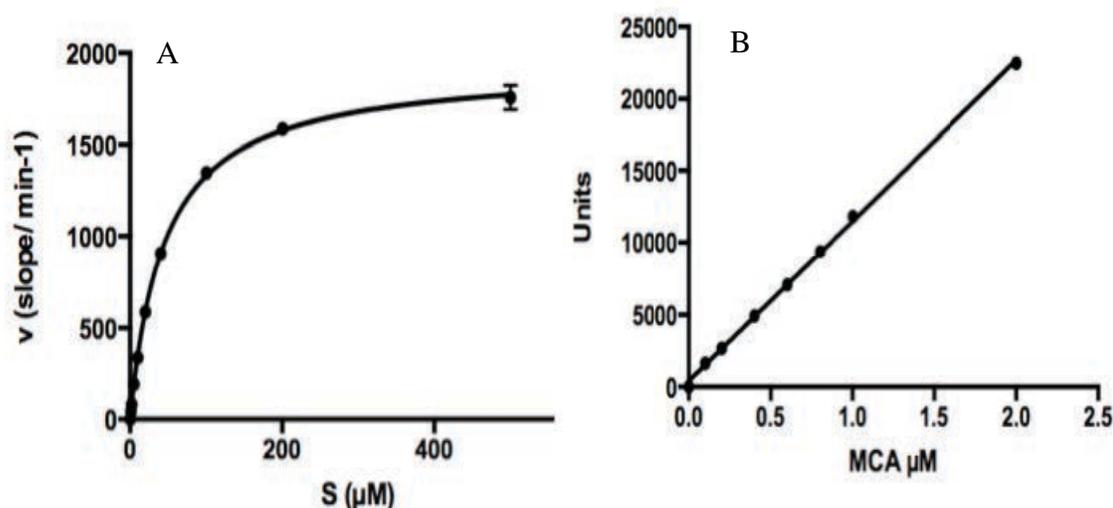
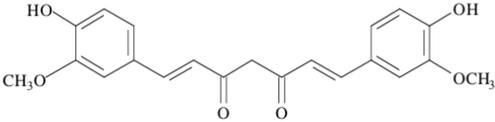
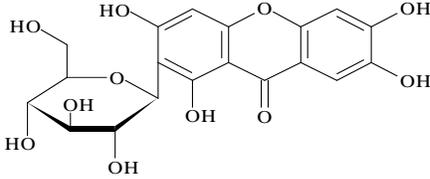
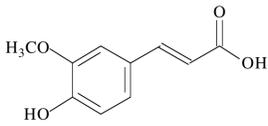
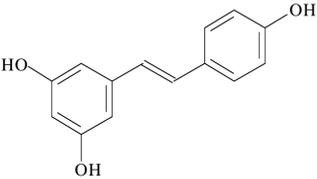
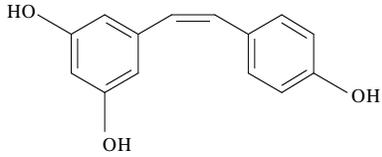
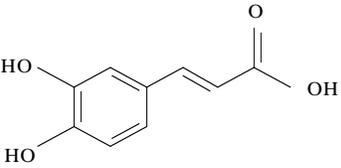


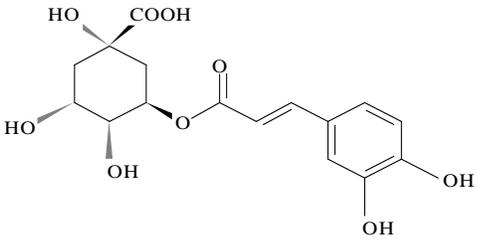
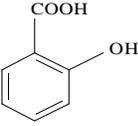
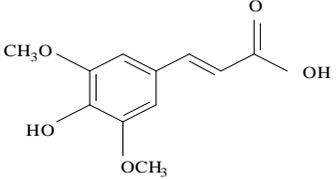
Figure 45 : Détermination des paramètres cinétiques de l'Ap-B vis-à-vis du substrat Arg-AMC. (A) Courbe de Michaelis $[(\text{pente}/\text{min}^{-1}) = f(\text{Arg-AMC en } \mu\text{M})]$. (B) Droite étalon montrant la correspondance entre la concentration du produit AMC en μM et les unités de fluorescence.

La constante de Michaelis (K_m) obtenue est de $45,2 \mu\text{M}$. La vitesse maximum (V_{max}) déterminée par GraphPad Prism est de $1933 \text{ pente}/\text{min}^{-1}$ (Figure 45-A), ce qui peut être converti en une V_{max} de $0,136 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$, grâce à une courbe étalon mettant en relation la concentration de produit obtenu après hydrolyse et le nombre d'unités de fluorescence (Figure 45-B). Sachant que nous avons $3,9 \text{ ng}$ d'enzyme dans le test enzymatique, nous en déduisons une constante catalytique (k_{cat}) de $4,28 \text{ sec}^{-1}$.

2. Effet de différentes molécules naturelles sur l'activité Ap-B

Les noms, formules et structures utilisés dans le cadre de ce travail ont été regroupés dans le Tableau 7, ci-après.

 <p style="text-align: center;">Curcumine (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione</p>	 <p style="text-align: center;">Mangiférine (1S)-1,5-Anhydro-1-(1,3,6,7-tetrahydroxy-9-oxo-9H-xanthen-2-yl)-D-glucitol</p>
 <p style="text-align: center;">Acide férulique acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)prop-2-énoïque</p>	 <p style="text-align: center;">Trans resvératrol 5-[(E)-2-(4-hydroxyphényl)-éthényl] benzène-1,3-diol</p>
 <p style="text-align: center;">Cis resvératrol 5-[(E)-2-(4-hydroxyphényl)-éthényl] benzène-1,3-diol</p>	 <p style="text-align: center;">Acide caféique acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque</p>

 <p style="text-align: center;">Acide chlorogénique</p> <p style="text-align: center;">Acide 3-[[3-(3,4-Dihydroxyphényl)-1-oxo-2-propényl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylique</p>	 <p style="text-align: center;">Acide salicylique</p> <p style="text-align: center;">Acide 2-hydroxybenzoïque</p>
 <p style="text-align: center;">Acide sinapique</p> <p style="text-align: center;">Acide 3-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)-prop-2-énoïque</p>	<p style="text-align: center;"><i>Tableau 7 : Noms, formules et structures des différentes molécules naturelles testées pour leurs effets sur l'activité de l'Ap-B (dessinées avec le logiciel MolDraw7).</i></p>

2.1 Tests effectués avec la curcumine

L'activité de l'Ap-B a été testée en présence d'une concentration finale de curcumine (Tableau 7) allant de 2,5 à 200 μM dans un tampon 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4, en présence de 0,1% Tween 20. Le Tween 20 est un détergent non anionique qui permet, sans inhiber l'activité de l'Ap-B, la solubilisation de la curcumine qui est insoluble dans l'eau. Les tests permettant de déterminer les IC_{50} ont été réalisés avec 4 concentrations différentes du substrat Arg-AMC : 20, 40, 80 et 120 μM (Figure 46). Nous constatons que les IC_{50} obtenus sont relativement proches et donnent une IC_{50} moyenne d'environ 44 μM . Le fait que l' IC_{50} ne varie pas en fonction de la concentration de substrat suggère que la curcumine est un inhibiteur non compétitif. Pour le vérifier, nous avons tracé les représentations linéaires de Dixon et d'Hanes-Woolf (Figure 47-A et B). La représentation de Dixon suggère en effet qu'il s'agit d'une inhibition non compétitive, puisque les 3 droites coupent l'axe des abscisses en un seul point. Cette représentation permet de déterminer le K_i de la curcumine qui est de 46,5 μM , relativement proche de l' IC_{50} , ce qui suggère également un caractère non compétitif. La représentation de Hanes-Woolf [$S/v=f(S)$; Figure 47-B) confirme également ce résultat, puisque les droites se rejoignent sur l'axe des abscisses en un seul point. Ce point permet de déterminer le K_m de l'enzyme vis-à-vis du substrat

qui est d'environ 45 μM , en accord avec ce qui a été précédemment obtenu avec la représentation de Michaelis (Figure 45).

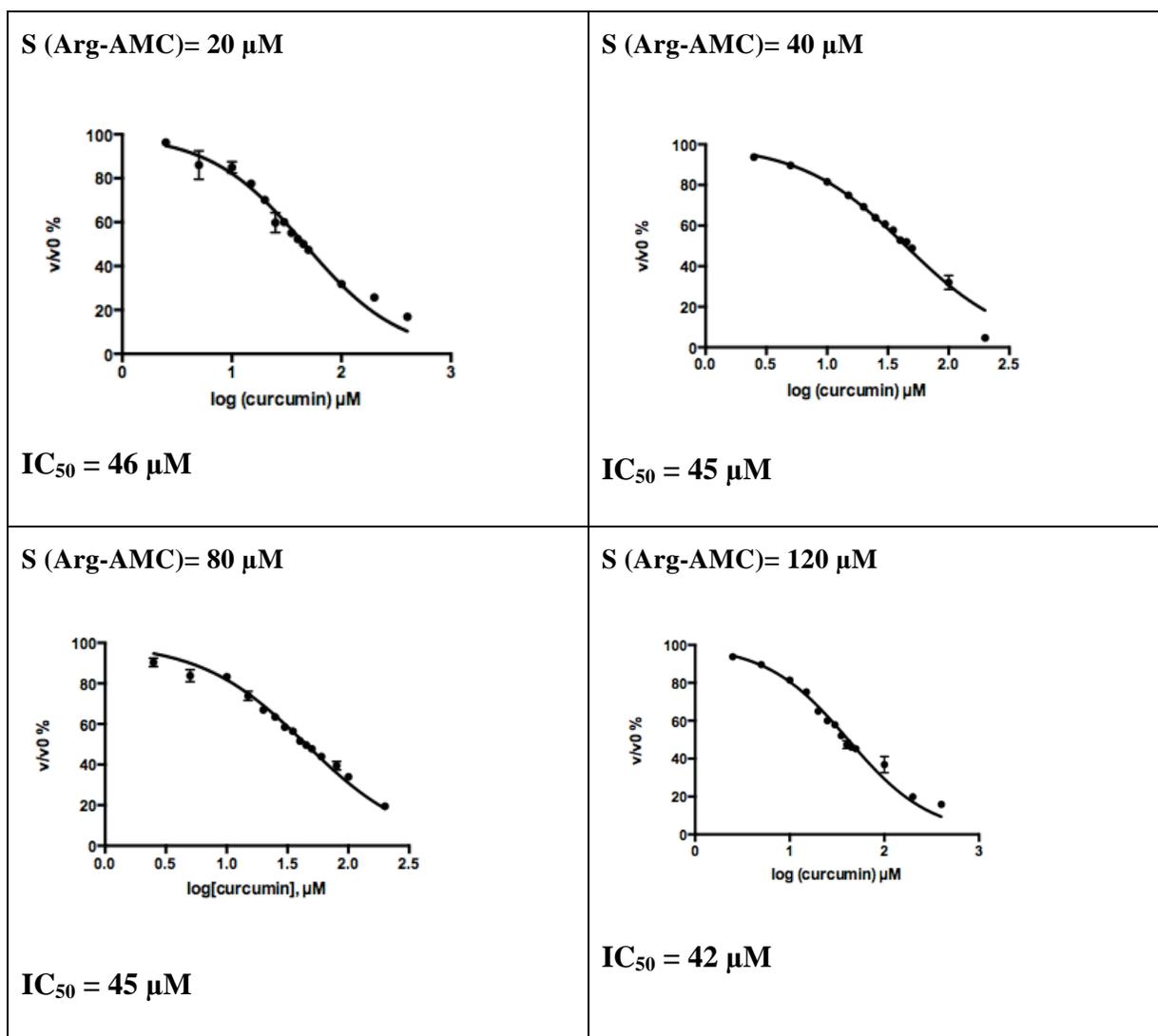


Figure 46 : Effet inhibiteur de la curcumine sur l'activité Ap-B. Les courbes représentent le rapport en % de la vitesse en présence d'inhibiteur (curcumine) rapportée à la vitesse sans inhibiteur, en fonction du log de la concentration d'inhibiteur en μM réalisées pour 4 concentrations différentes de substrat S. Cette courbe permet de déterminer la concentration d'inhibiteur donnant 50% d'inhibition.

D'autre part, un test enzymatique a été réalisé en présence ou non d'une concentration finale de curcumine de 50 μM et d'un substrat peptidique Arg₀-Leu₅-enképhaline (Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Ceci pour vérifier que l'effet de la curcumine observé avec un substrat chromogénique (Arg-AMC) reste vrai avec un substrat peptidique comportant, à la différence de l'Arg-AMC, une extrémité COOH-terminale. Nous constatons d'après le profil d'élution du substrat (pic 1 : Arg-

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) et du produit (pic 2 : Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) sur HPLC (Figure 48-A et B) que la curcumine inhibe bien l'activité Ap-B à une concentration de 50 μM . De plus, une analyse en spectrométrie de masse du contenu de ces pics montre bien qu'il s'agit du substrat (pic 1) de masse monoisotopique 712,35 Da et du produit (pic 2) de masse monoisotopique 556,26 Da (Figure 49).

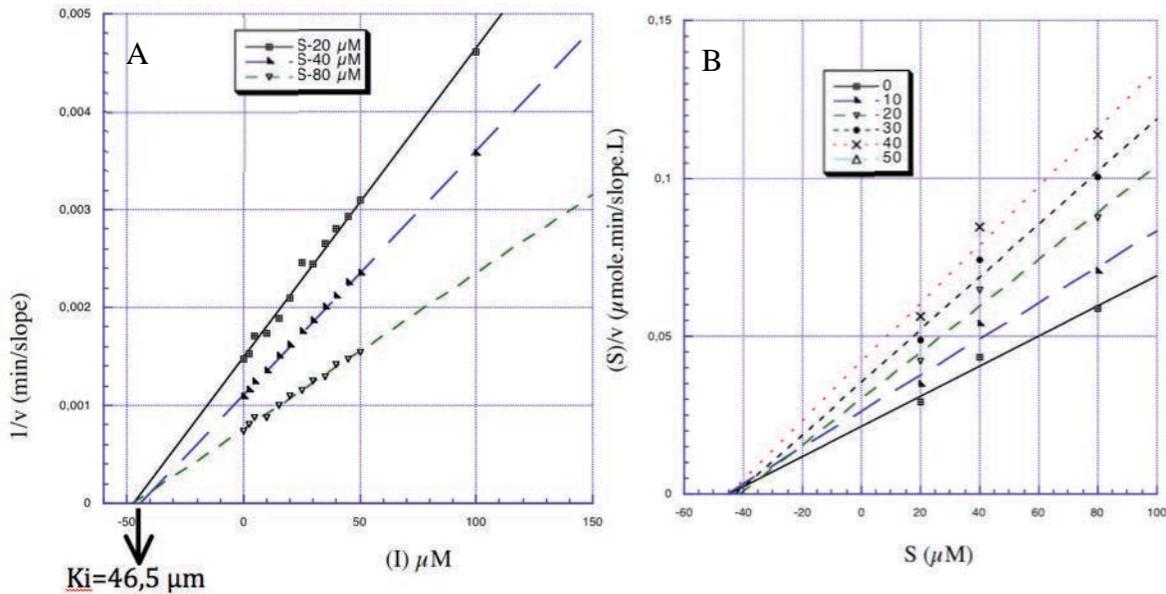


Figure 47 : Détermination du K_i de la curcumine vis-à-vis de l'activité Ap-B. (A) Les représentations de Dixon [$1/v=f(I)$] sont montrées pour différentes concentration de substrat S permettant de déterminer la valeur du K_i . (B) Représentation de Hanes-Woolf [$(S)/v=f(S)$] pour différentes concentration d'inhibiteur en μM .

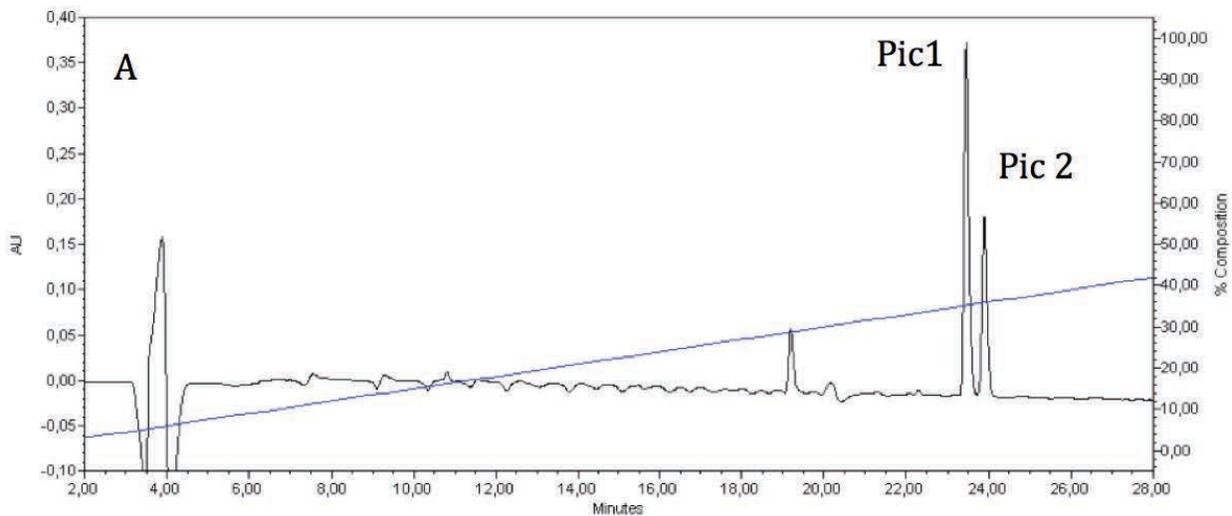


Figure 48-A : Profil HPLC montrant l'activité enzymatique de l'Ap-B vis-à-vis du peptide Arg₀-Leu₅-enképhaline. (A) Le gradient d'acétonitrile est indiqué en %. Le pic 1 correspond au substrat Arg₀-Leu₅-enképhaline et le pic 2 au produit Leu₅-enképhaline.

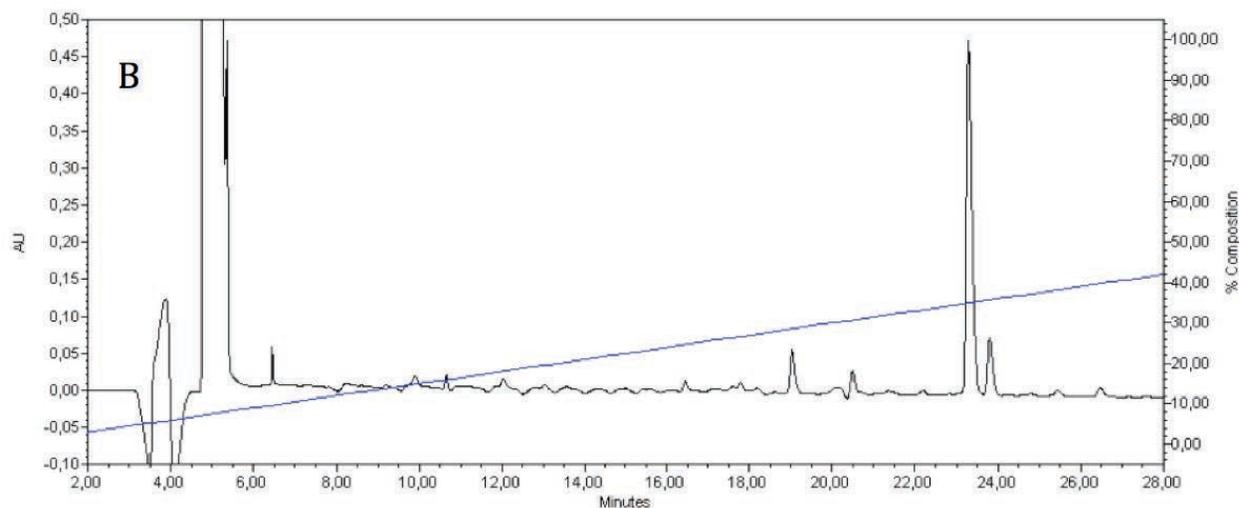


Figure 48-B : Profil HPLC montrant l'activité enzymatique de l'Ap-B vis-à-vis du Arg₀-Leu₅-enképhaline. (B) Profil HPLC montrant l'activité enzymatique de l'Ap-B vis-à-vis du Arg₀-Leu₅-enképhaline en présence de 50 μ M final de curcumine.

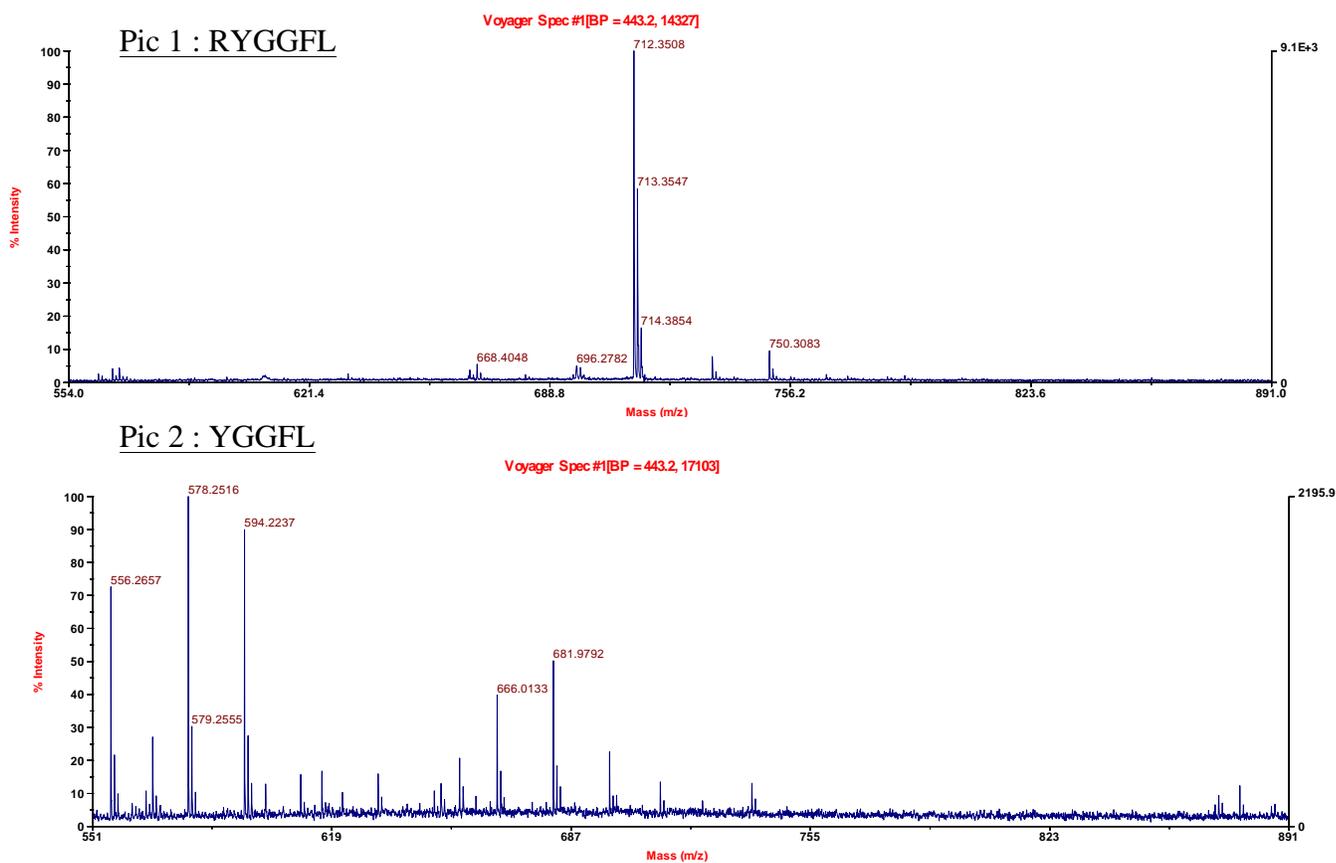


Figure 49 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du contenu des pics 1 et 2. La présence du peptide Arg₀-Leu₅-enképhaline a été confirmée dans le pic 1 (Masse monoisotopique de 712, 3508 Da). De même, la présence du peptide Leu₅-enképhaline a été confirmée dans la fraction du pic 2 par la détection du pic de masse monoisotopique 556, 2657 Da.

2.2 Test effectués avec la mangiférine

Les tests réalisés de la même façon que la curcumine, mais avec une autre molécule naturelle, la mangiférine (Tableau 7) suggèrent que cette dernière est également un inhibiteur non compétitif. En effet, les IC_{50} , hormis la valeur obtenue avec $S = 120 \mu M$ ($IC_{50} = 134 \mu M$), sont pratiquement identiques aux autres IC_{50} ($IC_{50} = 123 \mu M$) obtenues avec différentes concentrations de substrat (Figure 50). La représentation de Dixon confirme le caractère non compétitif et permet de calculer un K_i de $129 \mu M$ de l'enzyme vis-à-vis de l'inhibiteur (Figure 51-A). La représentation de Hanes-Woolf confirme le caractère non compétitif de cette inhibition et nous confirme la valeur du K_m de $45 \mu M$ environ (Figure 51-B).

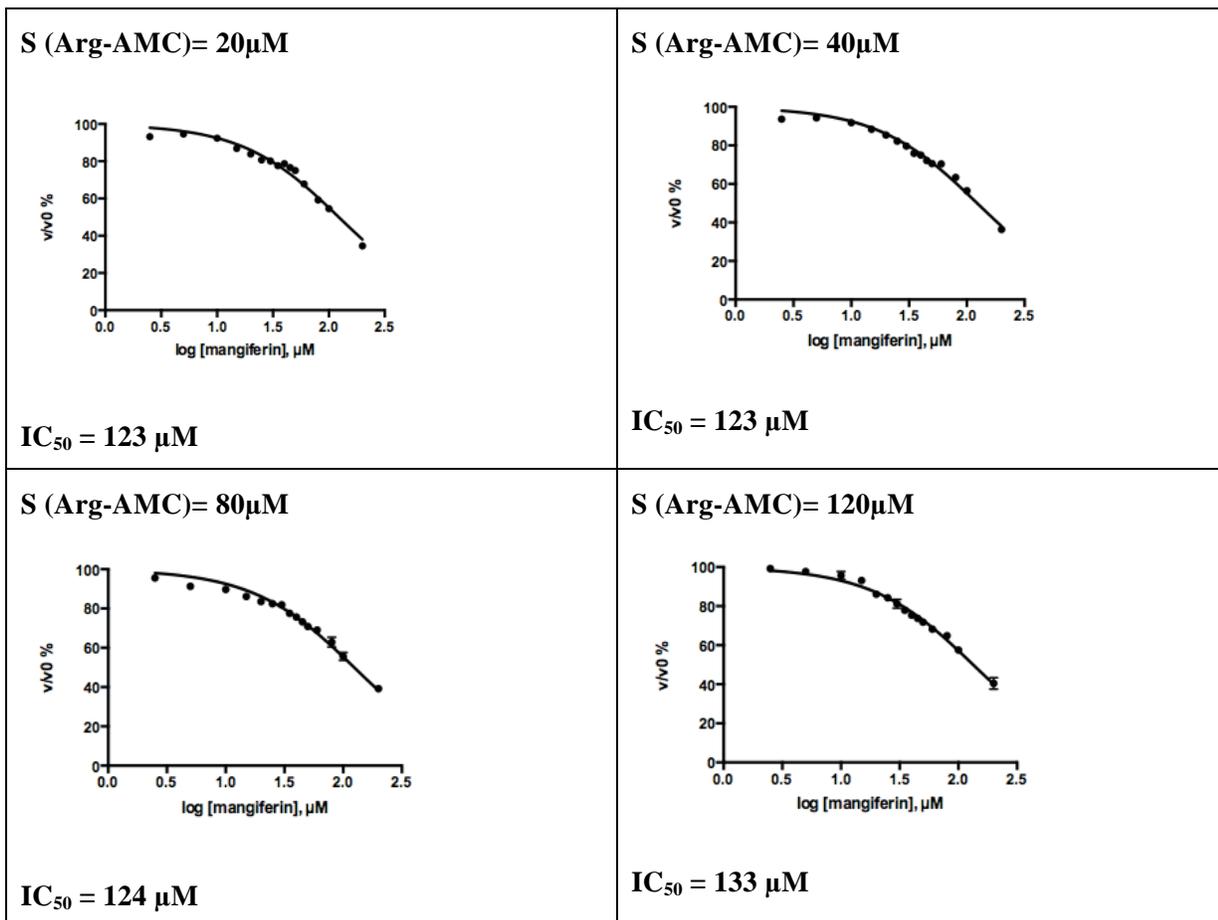


Figure 50 : Effet inhibiteur de la mangiférine sur l'activité Ap-B. Les courbes représentant le rapport en % de la vitesse en présence d'inhibiteur (mangiférine) rapportée à la vitesse sans inhibiteur, en fonction du log de la concentration d'inhibiteur (μM). Ces courbes dose-réponse ont été réalisées avec 4 concentrations différentes de substrat S.

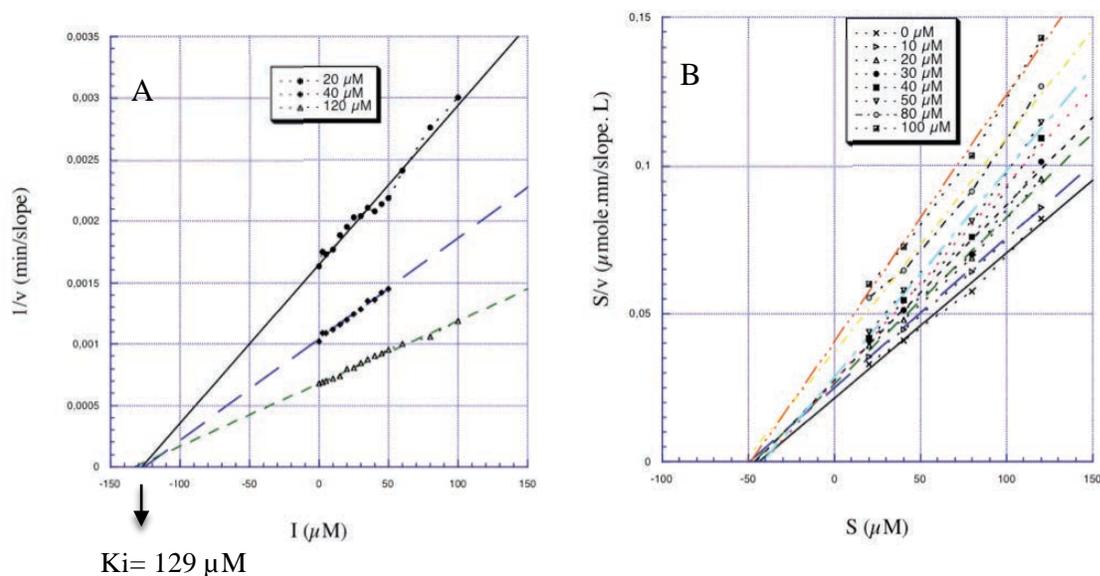


Figure 51 : Détermination du K_i de la mangiférine vis-à-vis de l'activité Ap-B. (A) Les représentations de Dixon [$1/v=f(I)$] sont montrées pour différentes concentration de substrat S permettant de déterminer la valeur du K_i . (B) Représentation de Hanes-Woolf [$(S)/v=f(S)$] pour différentes concentration d'inhibiteur en μM .

2.3 Autres molécules testées.

Le resvératrol sous sa forme Trans (Tableau 7) a été la première molécule testée, mais son effet inhibiteur est très modeste puisque l' IC_{50} est un peu supérieure à 400 μM , aussi nous n'avons pas déterminé sa valeur exacte. Nous avons également testé le resvératrol sous forme Cis, mais l' IC_{50} est également supérieure à 400 μM . Parmi les autres molécules testées qui n'inhibent pas à 200 μM , nous avons l'acide férulique qui correspond à une forme tronquée de la curcumine, ainsi que d'autres acides : les acides chlorogénique, salicilique, caféique et sinapique (Tableau 7 ; résultats non présentés).

IV. Conclusion - Discussion

A ce jour, les inhibiteurs les plus efficaces identifiés vis-à-vis de l'activité de l'Ap-B sont des analogues de dipeptides, les arphaménines A et B (Arg-Phe et Arg-Tyr, respectivement) produites par la bactérie *Chromobacterium violaceum* (Umezawa et al., 1983). Ces molécules inhibent l'activité Ap-B vis-à-vis de l'Arg- β -naphtylamide avec une IC_{50} d'environ 20 nM (Cadel et al., 2014). Ils sont reportés spécifiques de l'Ap-B, en dépit du fait qu'ils inhibent également la LTA_4H (et d'autres enzymes) mais avec une IC_{50} d'environ 1000 fois supérieure (vis-à-vis du Arg-paranitroanilide ; Orning et al., 1994). Des études avec différentes lignées cellulaires cancéreuses suggèrent que les arphaménines n'inhibent pas la croissance de ces cellules (Site Santa Cruz Biotechnology ; http://www.scbt.com/fr/display.php?search_catalog=arphamenine).

Cependant, des études *in vivo* sur des souris indiquent qu'elles augmentent la réponse immunitaire et donc pourraient avoir des effets anticancéreux (Umezawa et al, 1983).

Un de nos objectifs est de tester différentes molécules naturelles provenant de plantes sur l'activité Ap-B, molécules reportées avoir des effets biologiques importants. Nous avons testé en premier, le resvératrol, une phytoalexine polyphénolique présente dans certains vins rouges qui a des effets cardioprotecteurs et anti-vieillessement (Baur et Sinclair, 2006). Ce choix était dicté par le fait que la LTA4H, proche phylogénétiquement de l'Ap-B, est reportée être inhibée par le resvératrol, le résultat de cette inhibition provoquant une régression des tumeurs dans un modèle murin avec un cancer pancréatique de type humain transplanté par xénogreffe (Oi et al. , 2010). De plus, la LTA4H a été co-cristallisée avec le resvératrol sous forme trans (Fichier pdb : 3FTS ; Davies et al., 2009), ce qui permet de mieux comprendre son mode d'interaction. Cependant, bien que le resvératrol soit reporté être un bon inhibiteur de la LTA4H, les IC₅₀ déterminées sont plutôt modestes, puisqu'elles ont des valeurs de 366 et 212 µM pour les activités respectives peptidase et hydrolase d'époxyde de la LTA4H (Davies et al., 2009). Nos résultats obtenus concernant l'activité Ap-B vis-à-vis de l'Arg-AMC et en présence de resvératrol, aussi bien de configuration trans que cis, montrent une IC₅₀ supérieure à 400 µM. Ceci suggère que l'Ap-B est moins bien inhibée par le resvératrol que la LTA4H. L'analyse du trans-resvératrol dans la structure 3D de la LTA4H (pdb : 3FTS) permet d'émettre une hypothèse. En effet, une liaison hydrogène essentielle est établie entre le groupe hydroxyle du phénol appartenant à la tyrosine 267 de la LTA4H et le groupe hydroxyle du phénol appartenant au resvératrol (Figure 52-A ; 3,44 Å de distance ; Davies et al., 2009). Quant à l'Ap-B, la liaison hydrogène correspondante ne peut s'établir car la structure présente un résidu Phe en position 297 à la place de la tyrosine (Figure 52-B). Il est donc probable que le trans-resvératrol s'accommode différemment dans le site de l'Ap-B, en relation avec un effet moindre de l'inhibition.

Parmi les autres molécules issues de plantes, ayant une notoriété en tant que molécules préservant le capital santé, se trouve la curcumine. Cette molécule polyphénolique module une multitude de cibles cellulaires incluant les facteurs de transcription, les enzymes, les protéines du cycle cellulaire, les cytokines, les récepteurs etc... avec des effets activateurs ou inhibiteurs. Ceci engendre de nombreuses répercussions biologiques que cela soit anti-inflammatoires, anti-cancéreuses ou anti-diabétiques (Heger et al., 2013 ; Ghosh et al., 2015). En utilisant un substrat

de type Arg-AMC, nos résultats expérimentaux montrent que la curcumine inhibe de manière non compétitive l'Ap-B et que la constante d'inhibition K_i de l'Ap-B vis-à-vis de cette molécule est de 45 μM . Utilisé à 50 μM , l'effet de la curcumine s'observe également avec un substrat peptidique. Nous retrouvons un autre exemple dans la littérature, en effet il est reporté que la curcumine inhibe de manière non compétitive la phosphorylase kinase avec un K_i de 75 μM (Reddy et Aggrawal, 1994).

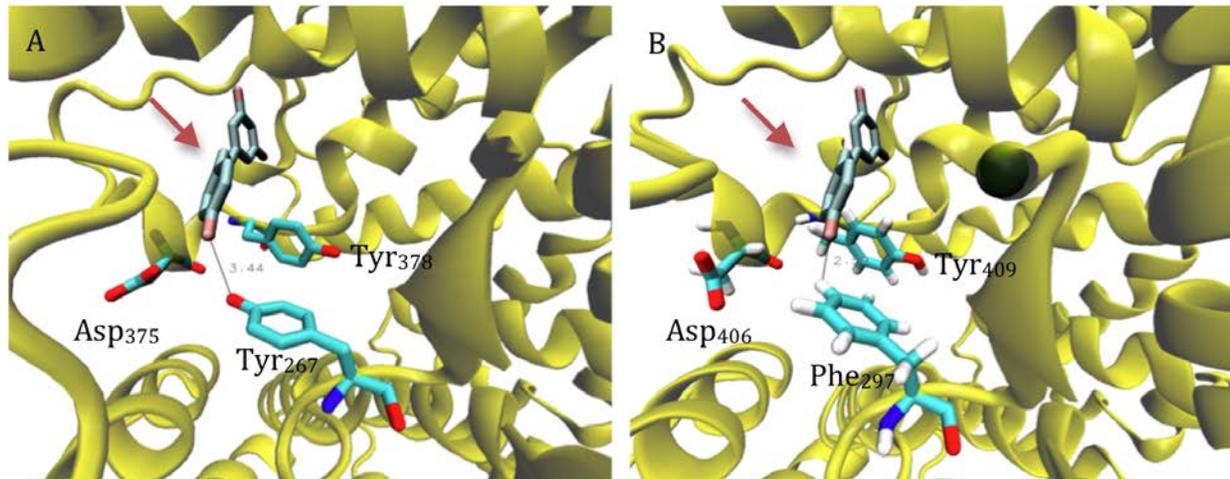


Figure 52 : Représentation schématique de la structure 3D partielle de la LTA4H co-cristallisée en présence de resvératrol et du modèle de la structure 3D de l'Ap-B en présence de resvératrol. (A) Représentation schématique du resvératrol (indiqué par une flèche) localisé dans une poche de la LTA4H. Une interaction hydrogène entre Tyr₂₆₇ et le groupe phénol du resvératrol est indiquée en pointillé (3,44 Å de distance). (B) La molécule de resvératrol a été ancrée dans l'Ap-B par superposition de la structure modélisée de l'Ap-B (Pham et al. 2007) et celle cristallisée de la LTA4 hydrolase (pdb : 3F7S) grâce au logiciel DaliLite (Thornton group, EMBL-EBI). Les images des structures ont été obtenues par utilisation du logiciel Visual Molecular dynamics (VMD).

La curcumine apparaît être un inhibiteur modeste de l'Ap-B, mais non négligeable si l'on se réfère aux doses potentiellement utilisables dans les essais thérapeutiques (Phase clinique I, 3600 à 8000 mg/jour ; Hsu et Cheng, 2007). Cependant, un facteur limitant de sa délivrance est sa faible solubilité dans l'eau, c'est pourquoi de nombreuses nanotechnologies sont développées pour administrer la curcumine associée à des liposomes ou des nanoparticules (Ghalandarlaki et al., 2014). Compte tenu de la ressemblance, due au caractère polyphénolique, entre la curcumine et le resvératrol, il est possible que la curcumine s'ancre en partie dans la même poche que le resvératrol au sein de l'Ap-B. La superposition avec le logiciel DaliLite des deux structures cristallines 3B7S et 3F7S de la LTA4H (RMSD = root mean square déviation, déviation de la racine de la moyenne des carrés égal à 0,2 Å), l'une avec un substrat dans le site actif, le tripeptide RSR (3B7S), et l'autre avec un inhibiteur, le resvératrol (3F7S), permet de vérifier si le

resvératrol occupe le même site que le substrat c'est-à-dire le site actif (Figure 53). L'observation de la superposition de ces deux structures montre que le resvératrol n'est pas ancré dans le site actif et valorise l'hypothèse d'un positionnement de la curcumine au même site que le resvératrol. Cette observation étaye le fait que la curcumine inhibe l'Ap-B de manière non compétitive. Dans ce sens, il serait donc intéressant de vérifier le mode d'inhibition de la LTA4H par le resvératrol. D'autre part, notons que pour l'Ap-B, la valeur de la constante de dissociation K_i est proche de la valeur du K_m (46,5 μM) de l'enzyme vis-à-vis du substrat Arg-AMC. Ne pourrait-on pas supposer que l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur soit dictée par l'affinité de l'enzyme pour le substrat, c'est à dire que le mécanisme de fixation du substrat permettrait l'accessibilité de l'inhibiteur à un autre site ?

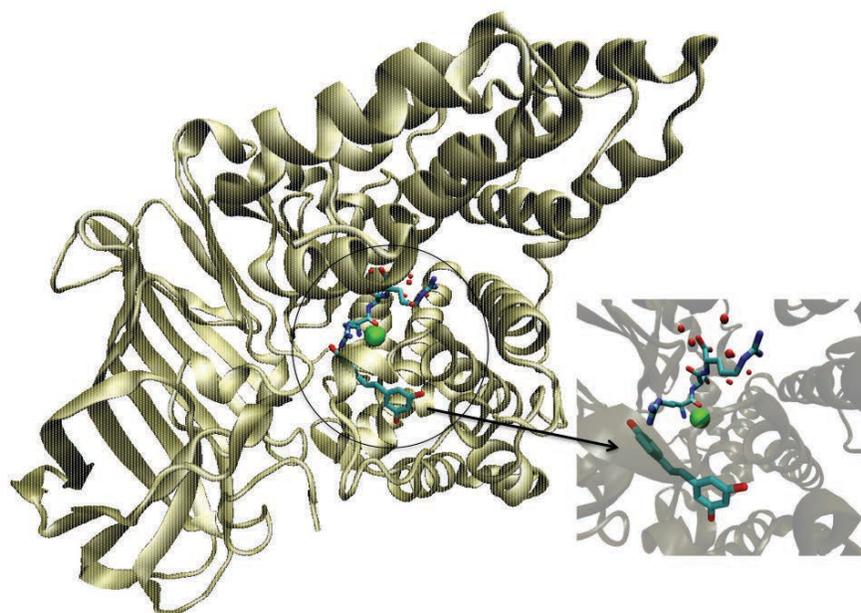


Figure 53 : Superposition des structures pdb 3F7S (en présence de resvératrol) et 3B7S (en présence du tripeptide RSR) de la LTA4H (réalisée avec le logiciel Dalilite ; groupe de recherche Thornton). Le substrat tripeptidique RSR est situé à proximité du cation Zn^{2+} catalytique (boule verte) dans le site actif. La molécule inhibitrice de resvératrol est indiquée par une flèche.

Comparée à la curcumine, l'Ap-B a une affinité moindre vis-à-vis de la mangiférine (environ 3 fois moins : $K_i = 129 \mu\text{M}$). Il s'agit d'une molécule dont la structure dérive de la xanthone avec des groupements phénol et un groupement glucose. Cette molécule est hydrophile, à la différence de la curcumine et plus encombrante. La fixation de mangiférine sur l'enzyme

s'avère également non compétitive. La mangiférine présente de nombreuses propriétés pharmacologiques et notamment en tant que drogue contre le diabète (Miura et al., 2001). L'activité de l'Ap-B, sécrétée par les cellules alpha du pancréas de rat, est impliquée dans la production de miniglucagon (Fontes et al., 2005), une molécule encore peu connue. Le miniglucagon (hypoglycémiant) régule finement les effets de son hormone mère, le glucagon (hyperglycémiant). Ainsi, l'Ap-B pourrait constituer une cible dans la lutte contre le diabète de type 2. Cependant, la mangiférine en tant que molécule inhibitrice ne semble pas être une molécule de choix du fait de la valeur obtenue du K_i . Il serait intéressant de tester la mangiférine (et aussi la curcumine) à des doses plus faibles sur l'activité Ap-B en présence du Arg-miniglucagon. Un test a montré une activation de l'enzyme vis-à-vis de ce dernier substrat (2,5 μ M final de curcumine), mais ce résultat demande à être confirmé.

En revanche, nous constatons que l'acide férulique, une forme tronquée de la curcumine (Tableau 7) n'inhibe pas l'Ap-B dans la gamme de concentration utilisée pour la curcumine. Il est probable que le groupement COO^- avec sa charge négative gêne cette fixation. Cette hypothèse est plausible du fait que la reconnaissance du substrat Arg- β -naphtylamide par l'enzyme est dictée par des interactions salines entre le groupement guanidinium de l'arginine du substrat et les Asp₄₀₆ et ₄₀₇ de l'enzyme, résidus à proximité du site de fixation de l'inhibiteur (résultats du laboratoire non publiés). Nous n'observons pas non plus d'inhibition avec les acides caféique, salicilique et sinapique.

Dans l'avenir, il sera donc intéressant d'explorer la voie des molécules naturelles dans la recherche de composés régulant l'activité ou même l'expression de l'Ap-B. Dans ce cadre, nous pourrions approfondir notre étude avec des molécules dérivées de la curcumine. Cette étude nous permettra de mieux comprendre leur mode d'interaction. Elle peut également nous aider dans la compréhension du mécanisme catalytique de l'Ap-B et de celui des autres aminopeptidases de la famille M1.

Bibliographie

-A-

- Addlagatta, A., Gay, L., and Matthews, B. W. (2006) Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* suggests a compartmentalized, gated active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13339-13344
- Ambrose, L. M., Gallagher, S. M., Unterwald, E. M., and Van Bockstaele, E. J. (2006) Dopamine-D1 and delta-opioid receptors co-exist in rat striatal neurons. *Neuroscience letters* 399, 191-196
- Arvidsson, U., Riedl, M., Chakrabarti, S., Vulchanova, L., Lee, J. H., Nakano, A. H., Lin, X., Loh, H. H., Law, P. Y., Wessendorf, M. W., and et al. (1995) The kappa-opioid receptor is primarily postsynaptic: combined immunohistochemical localization of the receptor and endogenous opioids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5062-5066
- Atkinson, S. C., Armistead, J. S., Mathias, D. K., Sandeu, M. M., Tao, D., Borhani-Dizaji, N., Tarimo, B. B., Morlais, I., Dinglasan, R. R., and Borg, N. A. (2015) The Anopheles-midgut APN1 structure reveals a new malaria transmission-blocking vaccine epitope. *Nature structural & molecular biology* 22, 532-539

-B-

- Barre, N., Garris, G., and Camus, E. (1995) Propagation of the tick *Amblyomma variegatum* in the Caribbean. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 14, 841-855
- Bathon, J. M., Proud, D., Mizutani, S., and Ward, P. E. (1992) Cultured human synovial fibroblasts rapidly metabolize kinins and neuropeptides. *The Journal of clinical investigation* 90, 981-991
- Baur, J. A., and Sinclair, D. A. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 493-506
- Beinfeld, M. C., Funkelstein, L., Foulon, T., Cadel, S., Kitagawa, K., Toneff, T., Reinheckel, T., Peters, C., and Hook, V. (2009) Cathepsin L plays a major role in cholecystokinin production in mouse brain cortex and in pituitary AtT-20 cells: protease gene knockout and inhibitor studies. *Peptides* 30, 1882-1891
- Bhagwat, S. V., Petrovic, N., Okamoto, Y., and Shapiro, L. H. (2003) The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood* 101, 1818-1826
- Birtley, J. R., Saridakis, E., Stratikos, E., and Mavridis, I. M. (2012) The crystal structure of human endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 reveals the atomic basis for distinct roles in antigen processing. *Biochemistry* 51, 286-295
- Bodnar, R. J. (2008) Endogenous opiates and behavior: 2007. *Peptides* 29, 2292-2375

-C-

- Cadel, S., Darmon, C., Pernier, J., Herve, G., and Foulon, T. (2015) The M1 family of vertebrate aminopeptidases: role of evolutionarily conserved tyrosines in the enzymatic mechanism

of aminopeptidase B. *Biochimie* 109, 67-77

- Cadel, S., Foulon, T., Viron, A., Balogh, A., Midol-Monnet, S., Noel, N., and Cohen, P. (1997) Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2963-2968
- Cadel, S., Pierotti, A. R., Foulon, T., Creminon, C., Barre, N., Segretain, D., and Cohen, P. (1995) Aminopeptidase-B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules. *Molecular and cellular endocrinology* 110, 149-160
- Camicas J, Hervy J, Adam F, Morel P (1998) Les tiques du monde. Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition (Acarida, Ixodida).
- Chartier, C., J. Itard, P. C. Morel, et P. M. Troncy. 2000. « Précis de parasitologie vétérinaire tropicale (collection Universités francophones) ». *Recherche* 67: 02.
- Chen, L., Lin, Y. L., Peng, G., and Li, F. (2012) Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 17966-17971
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A., and Yu, L. (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Molecular pharmacology* 44, 8-12
- Churchill, L., Bausback, H. H., Gerritsen, M. E., and Ward, P. E. (1987) Metabolism of opioid peptides by cerebral microvascular aminopeptidase M. *Biochimica et biophysica acta* 923, 35-41
- Cotte, V., Bonnet, S., Le Rhun, D., Le Naour, E., Chauvin, A., Boulouis, H. J., Lecuelle, B., Lilin, T., and Vayssier-Taussat, M. (2008) Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging infectious diseases* 14, 1074-1080

-D-

- Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., and Otranto, D. (2012) Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in parasitology* 28, 437-446
- Danziger, R. S. (2008) Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart failure reviews* 13, 293-298
- Davies, D. R., Mamat, B., Magnusson, O. T., Christensen, J., Haraldsson, M. H., Mishra, R., Pease, B., Hansen, E., Singh, J., Zembower, D., Kim, H., Kiselyov, A. S., Burgin, A. B., Gurney, M. E., and Stewart, L. J. (2009) Discovery of leukotriene A4 hydrolase inhibitors using metabolomics biased fragment crystallography. *Journal of medicinal chemistry* 52, 4694-4715
- De la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., and Sonenshine, D. E. (2008) Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 6938-6946
- De Lange, R. J., and Smith, E. L. (1971) Histones: structure and function. *Annual review of biochemistry* 40, 279-314

- Diaz-Perales, A., Quesada, V., Sanchez, L. M., Ugalde, A. P., Suarez, M. F., Fueyo, A., and Lopez-Otin, C. (2005) Identification of human aminopeptidase O, a novel metalloprotease with
- Drag, M., Bogyo, M., Ellman, J. A., and Salvesen, G. S. (2010) Aminopeptidase fingerprints, an integrated approach for identification of good substrates and optimal inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 285, 3310-3318
- Du, Q. S., Meng, J. Z., Liao, S. M., and Huang, R. B. (2012) Energies and physicochemical properties of cation- π interactions in biological structures. *Journal of molecular graphics & modelling* 34, 38-45
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., and Rurangirwa, F. R. (2001) Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51, 2145-2165

-E-

- EFSA (2010) European Food Safety Agency (EFSA) Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Geographic Distribution of Tick-borne Infections and their Vectors in Europe and the other Regions of the Mediterranean Basin. *EFSA J* 8: 1723.
- Evans, C. J., Keith, D. E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K., and Edwards, R. H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science (New York, N.Y.)* 258, 1952-1955

-F-

- Florin, S., Leroux-Nicollet, I., Meunier, J. C., and Costentin, J. (1997) Autoradiographic localization of [³H]nociceptin binding sites from telencephalic to mesencephalic regions of the mouse brain. *Neuroscience letters* 230, 33-36
- Fontes, G., Lajoix, A. D., Bergeron, F., Cadel, S., Prat, A., Foulon, T., Gross, R., Dalle, S., Le-Nguyen, D., Tribillac, F., and Bataille, D. (2005) Miniglucagon (MG)-generating endopeptidase, which processes glucagon into MG, is composed of N-arginine dibasic convertase and aminopeptidase B. *Endocrinology* 146, 702-712
- Foulon, T., Cadel, S., Chesneau, V., Draoui, M., Prat, A., and Cohen, P. (1996) Two novel metallopeptidases with a specificity for basic residues: functional properties, structure and cellular distribution. *Annals of the New York Academy of Sciences* 780, 106-120

-G-

- Gabrilovac, J., Breljak, D., Cupic, B., and Ambriovic-Ristov, A. (2005) Regulation of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) by interferon-gamma on the HL-60 cell line. *Life sciences* 76, 2681-2697
- Gainer, H., Russell, J. T., and Loh, Y. P. (1984) An aminopeptidase activity in bovine pituitary

secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from beta-lipotropin60-65. FEBS letters 175, 135-139

- Ghalandarlaki, N., Alizadeh, A. M., and Ashkani-Esfahani, S. (2014) Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy. *BioMed research international* 2014, 394264
- Ghosh, S., Banerjee, S., and Sil, P. C. (2015) The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 83, 111-124
- Gilbert, P. E., and Martin, W. R. (1976) The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 198, 66-82
- Glenner, G. G., Mc, M. P., and Folk, J. E. (1962) A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal alpha-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature* 194, 867
- Goodman, R. R., Snyder, S. H., Kuhar, M. J., and Young, W. S., 3rd. (1980) Differentiation of delta and mu opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 6239-6243

-H-

- Haeggstrom, J. Z., Wetterholm, A., Vallee, B. L., and Samuelsson, B. (1990) Leukotriene A4 hydrolase: an epoxide hydrolase with peptidase activity. *Biochemical and biophysical research communications* 173, 431-437
- Hannoun, C., Chatelain, J., Krams, S., and Guillon, J. C. (1971) [Isolation, in Alsace, of the tick encephalitis virus (arbovirus, group B)]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles* 272, 766-768
- Heger, M., van Golen, R. F., Broekgaarden, M., and Michel, M. C. (2014) The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacological reviews* 66, 222-307
- Henson, H., and Frohne, M. (1976) Crystalline leucine aminopeptidase from lens (alpha-aminoacyl-peptide hydrolase; EC 3.4.11.1). *Methods in enzymology* 45, 504-520
- Hill, R. L., and Smith, E. L. (1960) Isolation and characterization of an enzymically active fragment of papain. *The Journal of biological chemistry* 235, 2332-2339
- Hollt, V., Przewlocki, R., Haarmann, I., Almeida, O. F., Kley, N., Millan, M. J., and Herz, A. (1986) Stress-induced alterations in the levels of messenger RNA coding for proopiomelanocortin and prolactin in rat pituitary. *Neuroendocrinology* 43, 277-282
- Hopsu, V. K., Kantonen, U. M., and Glenner, G. G. (1964) A PEPTIDASE FROM RAT TISSUES SELECTIVELY HYDROLYZING N-TERMINAL ARGININE AND LYSINE RESIDUES. *Life sciences* 3, 1449-1453
- Hsu, C. H., and Cheng, A. L. (2007) Clinical studies with curcumin. *Advances in experimental medicine and biology* 595, 471-480

-I-

- Ikeda, K., Watanabe, M., Ichikawa, T., Kobayashi, T., Yano, R., and Kumanishi, T. (1998) Distribution of prepro-nociceptin/orphanin FQ mRNA and its receptor mRNA in developing and adult mouse central nervous systems. *The Journal of comparative neurology* 399, 139-151
- Iturrioz, X., Rozenfeld, R., Michaud, A., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (2001) Study of asparagine 353 in aminopeptidase A: characterization of a novel motif (GXMEN) implicated in exopeptidase specificity of monozinc aminopeptidases. *Biochemistry* 40, 14440-14448

-J-

- Jahfari, S., Fonville, M., Hengeveld, P., Reusken, C., Scholte, E. J., Takken, W., Heyman, P., Medlock, J. M., Heylen, D., Kleve, J., and Sprong, H. (2012) Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasites & vectors* 5, 74
- Jain, E., Bairoch, A., Duvaud, S., Phan, I., Redaschi, N., Suzek, B. E., Martin, M. J., McGarvey, P., and Gasteiger, E. (2009) Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC bioinformatics* 10, 136

-K-

- Kenny, A. J., Stephenson, S. L. & Turner, A. J. (1987) Cell surface peptidases. *Mammalian ectoenzymes* (Kenny, A. J. & Turner, A. J., eds) pp. 169-210, Elsevier, Amsterdam.
- Khachaturian, H., Lewis, M. E., Haber, S. N., Houghten, R. A., Akil, H., and Watson, S. J. (1985) Prodynorphin peptide immunocytochemistry in rhesus monkey brain. *Peptides* 6 Suppl 2, 155-166
- Kieffer, B. L., and Gaveriaux-Ruff, C. (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in neurobiology* 66, 285-306
- Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., and Hirth, C. G. (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 12048-12052
- Kim, H., and Lipscomb, W. N. (1994) Structure and mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 68, 153-213
- Kolb, A. F., Hegyi, A., and Siddell, S. G. (1997) Identification of residues critical for the human coronavirus 229E receptor function of human aminopeptidase N. *The Journal of general virology* 78 (Pt 11), 2795-2802
- Krober, T., and Guerin, P. M. (2007) In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends in parasitology* 23, 445-449
- Kunii, R., Nemoto, E., Kanaya, S., Tsubahara, T., and Shimauchi, H. (2005) Expression of CD13/aminopeptidase N on human gingival fibroblasts and up-regulation upon stimulation with interleukin-4 and interleukin-13. *Journal of periodontal research* 40, 138-

-L-

- Law, P. Y., Kouhen, O. M., Solberg, J., Wang, W., Erickson, L. J., and Loh, H. H. (2000) Deltorphin II-induced rapid desensitization of delta-opioid receptor requires both phosphorylation and internalization of the receptor. *The Journal of biological chemistry* 275, 32057-32065
- Le Merrer, J., Becker, J. A., Befort, K., and Kieffer, B. L. (2009) Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological reviews* 89, 1379-1412
- Lee, G. K., Ignace, J. A., Robertson, I. D., and Irwin, P. J. (2015) Canine vector-borne infections in Mauritius. *Parasites & vectors* 8, 174
- L'Hostis, M., and Seegers, H. (2002) Tick-borne parasitic diseases in cattle: current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in French cattle farming systems. *Veterinary research* 33, 599-611
- Look, A. T., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., and Peiper, S. C. (1989) Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *The Journal of clinical investigation* 83, 1299-1307
- Lord, J. A., Waterfield, A. A., Hughes, J., and Kosterlitz, H. W. (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267, 495-499

-M-

- Mansour, A., Burke, S., Pavlic, R. J., Akil, H., and Watson, S. J. (1996) Immunohistochemical localization of the cloned kappa 1 receptor in the rat CNS and pituitary. *Neuroscience* 71, 671-690
- Mansour, A., Fox, C. A., Burke, S., Akil, H., and Watson, S. J. (1995) Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *Journal of chemical neuroanatomy* 8, 283-305
- Martinez, D., Aumont, G., Moutoussamy, M., Gabriel, D., Tatareau, A. H., Barre, N., Vallee, F., and Mari, B. (1993) Epidemiological studies on dermatophilosis in the Caribbean. *Revue d'elevage et de medecine veterinaire des pays tropicaux* 46, 323-327
- Matthes, H. W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B. P., and Kieffer, B. L. (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819-823
- Meador-Woodruff, J. H., Pellerito, B., Vaudry, H., Jegou, S., Seidah, N. G., Watson, S. J., and Akil, H. (1988) Regional processing of the N- and C-terminal domains of proopiomelanocortin in monkey pituitary and brain. *Neuropeptides* 11, 111-118
- Meunier, J. C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J. L., Guillemot, J. C., Ferrara, P., Monsarrat, B., and et al. (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377, 532-535
- Miura, T., Ichiki, H., Hashimoto, I., Iwamoto, N., Kato, M., Kubo, M., Ishihara, E., Komatsu, Y.,

- Okada, M., Ishida, T., and Tanigawa, K. (2001) Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 8, 85-87
- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J. L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G., and Meunier, J. C. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS letters* 341, 33-38
- Mordarski, S., Lysenko, L., Gerber, H., Zietek, M., Gredes, T., and Dominiak, M. (2009) The effect of treatment with fentanyl patches on pain relief and improvement in overall daily functioning in patients with postherpetic neuralgia. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 60 Suppl 8, 31-35
- Mulenga, A., Sugimoto, C., and Onuma, M. (2000) Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2, 1353-1361

-N-

- Nguyen, T. T., Chang, S. C., Evnouchidou, I., York, I. A., Zikos, C., Rock, K. L., Goldberg, A. L., Stratikos, E., and Stern, L. J. (2011) Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nature structural & molecular biology* 18, 604-613
- Noble, F., and Roques, B. P. (2007) Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert opinion on therapeutic targets* 11, 145-159
- Noble, F., Benturquia, N., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., and Roques, B. P. (2008) Use of preproenkephalin knockout mice and selective inhibitors of enkephalinases to investigate the role of enkephalins in various behaviours. *Psychopharmacology* 196, 327-335

-O-

- Oi, N., Jeong, C. H., Nadas, J., Cho, Y. Y., Pugliese, A., Bode, A. M., and Dong, Z. (2010) Resveratrol, a red wine polyphenol, suppresses pancreatic cancer by inhibiting leukotriene A(4)hydrolase. *Cancer research* 70, 9755-9764
- Orning, L., Gierse, J. K., and Fitzpatrick, F. A. (1994) The bifunctional enzyme leukotriene-A4 hydrolase is an arginine aminopeptidase of high efficiency and specificity. *The Journal of biological chemistry* 269, 11269-11273

-P-

- Palmieri, F. E., Bausback, H. H., and Ward, P. E. (1989) Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. *Biochemical pharmacology* 38, 173-180
- Parola, P., and Raoult, D. (2001) Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32, 897-928
- Pérez-Eid C (2007) Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire:

Lavoisier Paris.

- Pert, C. B., and Snyder, S. H. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* (New York, N.Y.) 179, 1011-1014
- Peter, R. J., Van den Bossche, P., Penzhorn, B. L., and Sharp, B. (2005) Tick, fly, and mosquito control--lessons from the past, solutions for the future. *Veterinary parasitology* 132, 205-215
- Peter, T. F., Burridge, M. J., and Mahan, S. M. (2002) Ehrlichia ruminantium infection (heartwater) in wild animals. *Trends in parasitology* 18, 214-218
- Petney, T. N., Horak, I. G., and Rechav, Y. (1987) The ecology of the African vectors of heartwater, with particular reference to *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum*. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 54, 381-395
- Pham, V. L., Cadel, M. S., Gouzy-Darmon, C., Hanquez, C., Beinfeld, M. C., Nicolas, P., Etchebest, C., and Foulon, T. (2007) Aminopeptidase B, a glucagon-processing enzyme: site directed mutagenesis of the Zn²⁺-binding motif and molecular modelling. *BMC biochemistry* 8, 21
- Piesse, C., Tymms, M., Garrafa, E., Gouzy, C., Lacasa, M., Cadel, S., Cohen, P., and Foulon, T. (2002) Human aminopeptidase B (rnpep) on chromosome 1q32.2: complementary DNA, genomic structure and expression. *Gene* 292, 129-140
- Pinto, M., Rougeot, C., Gracia, L., Rosa, M., Garcia, A., Arsequell, G., Valencia, G., and Centeno, N. B. (2012) Proposed Bioactive Conformations of Opiorphin, an Endogenous Dual APN/NEP Inhibitor. *ACS medicinal chemistry letters* 3, 20-24
- Pittius, C. W., Kley, N., Loeffler, J. P., and Holtt, V. (1985) Quantitation of proenkephalin A messenger RNA in bovine brain, pituitary and adrenal medulla: correlation between mRNA and peptide levels. *The EMBO journal* 4, 1257-1260

-R-

- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1995) Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods in enzymology* 248, 183-228
- Reddy, S., and Aggarwal, B. B. (1994) Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS letters* 341, 19-22
- Reeves, P. J., Callewaert, N., Contreras, R., and Khorana, H. G. (2002) Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13419-13424
- Reis, C., Cote, M., Le Rhun, D., Lecuelle, B., Levin, M. L., Vayssier-Taussat, M., and Bonnet, S. I. (2011) Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS neglected tropical diseases* 5, e1186
- Rinaldo-Matthis, A., and Haeggstrom, J. Z. (2010) Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. *Biochimie* 92, 676-681

- Roques, B. P. (1991) [New approach in the research of analgesics and antihypertensive agents]. *Annales pharmaceutiques francaises* 49, 317-326
- Roques, B. P. (2000) Novel approaches to targeting neuropeptide systems. *Trends in pharmacological sciences* 21, 475-483
- Roques, B. P., Fournie-Zaluski, M. C., and Wurm, M. (2012) Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nature reviews. Drug discovery* 11, 292-310
- Roques, B. P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M. C., and Beaumont, A. (1993) Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacological reviews* 45, 87-146
- Rosa, M., Arsequell, G., Rougeot, C., Calle, L. P., Marcelo, F., Pinto, M., Centeno, N. B., Jimenez-Barbero, J., and Valencia, G. (2012) Structure-activity relationship study of opiorphin, a human dual ectopeptidase inhibitor with antinociceptive properties. *Journal of medicinal chemistry* 55, 1181-1188
- Roth-Deri, I., Green-Sadan, T., and Yadid, G. (2008) Beta-endorphin and drug-induced reward and reinforcement. *Progress in neurobiology* 86, 1-21
- Rougeot, C., Messaoudi, M., Hermitte, V., Rigault, A. G., Blisnick, T., Dugave, C., Desor, D., and Rougeon, F. (2003) Sialorphin, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8549-8554
- Rougeot, C., Robert, F., Menz, L., Bisson, J. F., and Messaoudi, M. (2010) Systemically active human opiorphin is a potent yet non-addictive analgesic without drug tolerance effects. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 61, 483-490

-S-

- Sanz, B., Perez, I., Beitia, M., Errarte, P., Fernandez, A., Blanco, L., Estalella, I., Loizate, A., Irazusta, J., Lopez, J. I., and Larrinaga, G. (2015) Aminopeptidase N activity predicts 5-year survival in colorectal cancer patients. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 63, 740-746
- Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications* 27, 157-162
- Selles, A. J., Villa, D. G., and Rastrelli, L. (2015) Mango polyphenols and its protective effects on diseases associated to oxidative stress. *Current pharmaceutical biotechnology* 16, 272-280
- Severo, M. S., Stephens, K. D., Kotsyfakis, M., and Pedra, J. H. (2012) *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future microbiology* 7, 719-731
- Simon, E. J. (1973) In search of the opiate receptor. *The American journal of the medical sciences* 266, 160-168
- Snelgrove, R. J., Jackson, P. L., Hardison, M. T., Noerager, B. D., Kinloch, A., Gaggar, A.,

- Shastry, S., Rowe, S. M., Shim, Y. M., Hussell, T., and Blalock, J. E. (2010) A critical role for LTA4H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. *Science (New York, N.Y.)* 330, 90-94
- Soding, J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 951-960
- Stachurski, F. (2000) Invasion of West African cattle by the tick *Amblyomma variegatum*. *Medical and veterinary entomology* 14, 391-399
- Stachurski, F., and Lancelot, R. (2006) Footbath acaricide treatment to control cattle infestation by the tick *Amblyomma variegatum*. *Medical and veterinary entomology* 20, 402-412
- structural similarity to aminopeptidase B and leukotriene A4 hydrolase. *The Journal of biological chemistry* 280, 14310-14317

-T-

- Terenius, L. (1973) Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta pharmacologica et toxicologica* 33, 377-384
- Tian, X. Z., Chen, J., Xiong, W., He, T., and Chen, Q. (2009) Effects and underlying mechanisms of human opiorphin on colonic motility and nociception in mice. *Peptides* 30, 1348-1354
- Tong, W. G., Ding, X. Z., Hennig, R., Witt, R. C., Standop, J., Pour, P. M., and Adrian, T. E. (2002) Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 3232-3242
- Tsui, F. W., Haroon, N., Reveille, J. D., Rahman, P., Chiu, B., Tsui, H. W., and Inman, R. D. (2010) Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* 69, 733-736

-U-

- Umezawa, H., Aoyagi, T., Ohuchi, S., Okuyama, A., Suda, H., Takita, T., Hamada, M., and Takeuchi, T. (1983) Arphamenines A and B, new inhibitors of aminopeptidase B, produced by bacteria. *The Journal of antibiotics* 36, 1572-1575
- Urban, S., Textoris-Taube, K., Reimann, B., Janek, K., Dannenberg, T., Ebstein, F., Seifert, C., Zhao, F., Kessler, J. H., Halenius, A., Henklein, P., Paschke, J., Cadel, S., Bernhard, H., Ossendorp, F., Foulon, T., Schadendorf, D., Paschen, A., and Seifert, U. (2012) The efficiency of human cytomegalovirus pp65(495-503) CD8+ T cell epitope generation is determined by the balanced activities of cytosolic and endoplasmic reticulum-resident peptidases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189, 529-538

-W-

- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P., and Roques, B. P. (1986) Neuronal localization of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and autoradiography. *The EMBO journal* 5, 3163-3166
- Ward, P. E., Benter, I. F., Dick, L., and Wilk, S. (1990) Metabolism of vasoactive peptides by

- plasma and purified renal aminopeptidase M. *Biochemical pharmacology* 40, 1725-1732
- Willadsen, P. (2004) Anti-tick vaccines. *Parasitology* 129 Suppl, S367-387
- Wisner, A., Dufour, E., Messaoudi, M., Nejdi, A., Marcel, A., Ungeheuer, M. N., and Rougeot, C. (2006) Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17979-17984
- Wong, A. H., Zhou, D., and Rini, J. M. (2012) The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *The Journal of biological chemistry* 287, 36804-36813
- Yang, Y., Liu, C., Lin, Y. L., and Li, F. (2013) Structural insights into central hypertension regulation by human aminopeptidase A. *The Journal of biological chemistry* 288, 25638-25645
- Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C. D., Takeda, J., Reisine, T., and Bell, G. I. (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6736-6740
- Yoburn, B. C., Purohit, V., Patel, K., and Zhang, Q. (2004) Opioid agonist and antagonist treatment differentially regulates immunoreactive mu-opioid receptors and dynamin-2 in vivo. *European journal of pharmacology* 498, 87-96

-Z-

- Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L. J., and Kastin, A. J. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386, 499-502
- Zini, S., Fournie-Zaluski, M. C., Chauvel, E., Roques, B. P., Corvol, P., and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11968-11973

Résumé

Chez les Mammifères, les enképhalines sont des neuromédiateurs peptidiques qui jouent un rôle clé dans le contrôle des voies de transmission de la douleur. Ces enképhalines sont très rapidement dégradées par 2 métallopeptidases membranaires, l'Endopeptidase neutre (NEP) et l'Aminopeptidase neutre (APN). Ces enképhalines interrompent l'action analgésique de ces peptides et jouent un rôle crucial dans la modulation de la transmission douloureuse. Deux inhibiteurs physiologiques de ces enképhalines ont été identifiés : la sialorphine chez le rat (QHNPR) et l'opiorphine chez l'homme (QRFSR). *In vivo*, ces pentapeptides sont capables d'induire une analgésie équivalente à celle de la morphine, sans ses effets secondaires. L'importance des fonctions physiologiques régulées par ces deux médiateurs nécessite la connaissance de leur(s) mécanisme(s) d'action afin de développer des molécules utiles au traitement des douleurs sévères et chroniques. Cependant, les connaissances actuelles sont limitées puisque la sialorphine et l'opiorphine demeurent des peptides singuliers. En effet, à ce jour, aucun analogue ou homologue fonctionnel n'a été caractérisé dans d'autres espèces animales. Nous nous sommes donc intéressés au modèle de la tique *Ixodes ricinus*, car sa morsure n'engendre pas de réactions nociceptives chez son hôte, laissant présager la sécrétion, *via* la salive, de substances anti-douleur puissantes. Ce modèle semblait donc pertinent pour la mise en évidence d'autres homologues de la super-famille de l'opiorphine et de la sialorphine. Les objectifs étaient : *i*) isoler et caractériser des peptides extraits de la salive ayant la capacité d'inhiber l'activité NEP et APN ; *ii*) identifier les gènes codant les précurseurs de ces peptides pour analyser leur parenté avec ceux de l'opiorphine et la sialorphine ; *iii*) identifier, à l'aide de ce marqueur phylogénétique, de nouveaux peptides « opiorphine-like » chez d'autres Invertébrés. A ce jour, aucun résultat probant n'a été obtenu, probablement du fait de l'utilisation d'une quantité insuffisante de matériels biologiques en rapport avec les techniques de fractionnement et d'analyses utilisées. En parallèle, nous avons recherché des homologues des précurseurs de l'opiorphine et de la sialorphine dans les banques de données de séquences. Les objectifs étaient : *i*) identifier l'ensemble de ces peptides ; *ii*) évaluer leur potentiel inhibiteur *in vitro* vis-à-vis de la NEP et de l'APN. Les analyses nous ont permis d'identifier chez certains Mammifères des analogues positionnels de ces inhibiteurs. Des tests préliminaires ont montré que la plupart d'entre eux étaient capables d'inhiber l'APN, certains avec une efficacité supérieure à celle de l'opiorphine. En revanche, un seul inhibiteur de la NEP a pu être mis en évidence.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons également étudié l'effet de différentes molécules naturelles sur l'activité de l'Aminopeptidase B (Ap-B). Les résultats obtenus montrent que la curcumine et la mangiférine inhibent l'Ap-B de manière non-compétitive.

Summary

In mammals, enkephalins are peptide neurotransmitters that play a key role in the control of the routes of pain transmission. These enkephalins are rapidly degraded by 2 membrane metallopeptidases, the neutral endopeptidase (NEP) and the neutral aminopeptidase (APN). These enkephalins interrupt the analgesic action of these peptides and play a crucial role in modulating pain transmission. Two physiological inhibitors of these enkephalins were identified: sialorphin in rats (QHNPR) and opiorphin in humans (QRFSR). *In vivo*, these pentapeptides are capable of inducing analgesia similar to that of morphine, without its side effects. The importance of physiological functions regulated by these two mediators requires knowledge of their mechanism of action to develop molecules useful in treatment of severe and chronic pain. However, current knowledge are limited, since sialorphin and opiorphin remain singular peptides. Indeed, to date, no similar or functional homologue has been characterized in other animal species. We are therefore interested to the model of the tick *Ixodes ricinus*, because its bite does not cause nociceptive responses in the host, suggesting secretion of powerful painkilling substances via saliva. This model seemed to be relevant for the detection of other members of the superfamily of opiorphin and sialorphin. The objectives were: *i*) isolate and characterize peptides extracted from saliva having the ability to inhibit the NEP and APN activities; *ii*) identify the genes encoding the precursors of these peptides to analyze their relationship with those of opiorphin and sialorphin; *iii*) identify, using this phylogenetic marker, new peptides "opiorphin-like" in other invertebrates. To date, no conclusive result has been obtained, probably due to the use of an insufficient amount of biological materials related to the techniques used. In parallel, we looked for homologs of opiorphin and sialorphin in sequence databases. The objectives were: *i*) identify all of these peptides; *ii*) assess their inhibitory potential, *in vitro*, against the NEP and APN. The analysis allowed us to identify in some mammals positional analogues of these inhibitors. Preliminary tests have shown that most of them were able to inhibit the APN, some with upper efficacy to opiorphin. But, only one NEP inhibitor has been highlighted.

As part of my thesis, we also studied the effect of different natural molecules on the activity of the aminopeptidase B (Ap-B). The results obtained show that curcumin and mangiferine inhibit the Ap-B according to a non-competitive mechanism.