



HAL
open science

Les analogues de l'apéline métaboliquement stables dans le traitement de l'hyponatrémie et de l'insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde

Pierre-Emmanuel Girault-Sotias

► To cite this version:

Pierre-Emmanuel Girault-Sotias. Les analogues de l'apéline métaboliquement stables dans le traitement de l'hyponatrémie et de l'insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde. Pharmacologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5006 . tel-03986345

HAL Id: tel-03986345

<https://theses.hal.science/tel-03986345v1>

Submitted on 13 Feb 2023

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.



COLLÈGE
DE FRANCE
1530



Inserm

Université de Paris

École doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries ED563

Collège de France, CIRB, Neuropeptides Centraux et Régulations Hydrique et Cardiovasculaire, UMR7241/INSERM U1050

Les analogues de l'apéline métaboliquement stables dans le traitement de l'hyponatrémie et de l'insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde

Par Pierre-Emmanuel GIRAULT-SOTIAS

Thèse de doctorat de Pharmacologie

Dirigée par le Dr Catherine LLORENS-CORTES

Et par le Dr Xavier ITURRIOZ

Présentée et soutenue publiquement le 28 Mars 2022, au Collège de France

Devant un jury composé de :

Dr. Catherine LLORENS-CORTES, Directrice de recherche, Collège de France, Directrice de thèse

Dr. Xavier ITURRIOZ, Chargé de recherche HDR, CEA, co-directeur de thèse

Dr. Juliette HADCHOUEL, Directrice de recherche, Sorbonne Université, Rapporteur

Pr. Philippe VALET, Professeur des Universités, Université Toulouse III, Rapporteur

Pr. Philippe MENASCHE, PU-PH, Université de Paris, Examineur

Pr. Alain BERDEAUX, PU-PH Émérite, Université Paris-Est Créteil, Examineur

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été financée par une subvention de la FRM pendant 3 ans. Je remercie la FRM pour m'avoir permis de réaliser ce travail.

Ces lignes qui préfacent mon manuscrit de thèse étaient pour moi les plus dures à écrire, elles signent un tournant important, la fin de mes études et de mes années au Collège de France. Mais j'en garderais un souvenir impérissable, de par les personnes que j'ai rencontrées et qui ont toutes, à leur manière, contribué de près ou de loin à ce travail.

Je tiens tous d'abord à remercier le Dr. Juliette Hadchouel et le Pr. Philippe Valet de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse.

Je remercie également le Pr Philippe Menasché et le Pr Alain Berdeaux pour avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, le Dr Catherine Llorens-Cortes, sans qui, aujourd'hui vous ne pourriez lire ces lignes. Je sais que tout n'a pas été parfait au long de cette thèse, personne n'était prêt à ce qui allait arriver, nous pensions que tout se passerait pour le mieux, malgré la fermeture du laboratoire, le départ de certains et l'arrivée d'une pandémie. Se retrouver toute seule pour encadrer une personne dissipée comme moi n'a pas été de tout repos tous les jours. Malgré tout cela, et bien d'autres faits de ma part, vous êtes restée présente pour moi, vous n'avez jamais baissé les bras, vous avez donné plus que je n'aurais pu imaginer pour mener ce travail à terme et je vous en serai à jamais redevable. Je retiendrai que la thèse, en plus d'être une aventure scientifique merveilleuse, est aussi une grande aventure humaine. De toutes les qualités que vous montrez tous les jours à chacun, celle qui m'a le plus impressionné est votre empathie, dont j'espère en avoir un peu hérité aujourd'hui.

Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse, le Dr. Xavier Iturrioz, pour sa patience quand je ne voulais pas comprendre, son écoute et sa disponibilité et tous les conseils qu'il a pu m'apporter durant ces années.

Je voudrais également remercier tout particulièrement le Dr. Solène Boitard (Boit Boit). Tu t'es retrouvée à devoir m'encadrer, tâche que tu n'avais pas forcément demandée. Mais tu l'as fait et de la meilleure manière qui soit. Tu m'as tant appris et transmis, que ce soit des techniques ou des méthodes de réflexion, avec une patience que peu de personne possèdent, surtout avec une personne dissipée comme moi. Mais avec le temps, cette complicité est devenue beaucoup plus, elle n'était pas que scientifique avec nos grands débats sur des tableaux blancs ou nos théories « fumantes », ces journées/semaines interminables de chirurgie avec toi, étaient devenues un moment de bonheur car tu étais devenue une partenaire, une amie. Tu as toujours été présente pour moi au cours de ces trois années, pour m'écouter, me conseiller, me rassurer et souvent me reconforter. Sans cette amitié sans faille et ton soutien je n'aurais jamais, je pense, été jusqu'au bout. Cette rencontre et tous ces moments partagés ont été les plus beaux au cours de ces trois années, merci du fond du cœur.

Comme je l'évoquais la recherche est une aventure humaine, c'est un travail d'équipe et j'ai eu la chance d'être entouré de personnes exceptionnelles. Certaines m'ont dit qu'elles ne méritaient pas un long laïusse, que leurs places étaient avec les autres, dans une simple ligne de remerciement. Mais toi Nadia (Dame Nadou), je préfère te donner une véritable place. Toi qui as relu l'entièreté de ce manuscrit un nombre incalculable de fois, subis les aléas de mes humeurs, toujours été là pour me remonter le moral et m'écouter me plaindre, je n'aurais pas tenue sans toi. Quand je serais parti, pense à regarder la météo de temps en temps, cela évitera les surprises. Romain (Rominou), l'homme rencontré au détour d'un congrès à Montpellier, je me souviendrais longtemps de notre épopée pour trouver une chambre d'hôtel. Reste qui tu es, sous ton air de ronchon, tu es un petit ravioli de bonheur. A Adrien, pour m'avoir encadré durant mon stage de master 2, montré la rigueur que nécessite la recherche et m'avoir donné envie de poursuivre en thèse, ton amitié est pour moi au centre de ce travail. Mathilde, pour ta bienveillance et ta gentillesse et l'aide que tu m'as apporté dans ce travail. Reda, pour ton amitié, ta bonne humeur constante et ta gentillesse, ne change pas tu seras un médecin génial. Yannick, merci pour l'aide que tu m'as apporté dans mon travail, garde cet état d'esprit et cette gentillesse.

Le collègue a aussi été des rencontres magnifiques avec des échanges et moments géniaux. Je voudrais donc remercier infiniment Pierre (Cailloux), Sonia, Juliette, Marie, Camille, Noémie, Emma, Omar, Maëla, Marion, Léa, Marc, Sabrina, Camille, Jérôme, Julien, Alice, Rachel, Tom, David. Merci d'avoir été là, c'est une chance d'avoir pu passer tout ce temps avec vous les doudous (Évitez la B1 maintenant).

Je voudrais aussi remercier Nicole, Sophie, Maya, Lucie, Sandrine, Morgane, Julien, Estelle, Philippe, Pascal... Que ce soit pour votre gentillesse, votre aide, vos conseils et tout ce qui a permis la réalisation de ce travail.

Mais que serais-je sans mes amis, mon autre famille. Pour tout ce que vous êtes, tout ce qu'on a vécu et partagé. Je ne peux que vous redire que vous êtes tous très chers à mon cœur Adélice, Alice, Ambre, Anouk, Bastien, Charles (de Sud Loire), Grigory, Jimmy, Julie, Ludovic, Lucas, Pia, Robin, Rachel, Romain, Romane, Sarah, Thomas !

A mes grands-parents, j'aurais aimé qu'ils soient là et j'espère qu'ils sont fiers de moi.

A Anne-Sophie et Louis-Maël. Vous m'êtes inestimables, et pour rien au monde je n'aurais pu espérer mieux comme frère et comme sœur. Certes nous ne sommes pas toujours d'accord mais ne changez rien, à part peut-être la tendance bordélique de certains.

A mes parents qui m'ont toujours soutenu, qui ont toujours cru en moi malgré mes choix, mes échecs. Ils m'ont réconforté et relevé pour aller de l'avant, et appris à tout donner pour réaliser mes rêves. Je suis fier d'être votre fils et je vous aime.

A tous, je vous remercie encore pour tout ce que vous m'avez apporté.

Pierre-Emmanuel

TABLE DES ABBREVIATIONS

AC	Adénylate cyclase
ADNc	Acide désoxyribonucléique (ADN) complémentaire
Akt	Protéine-kinase B
Ala	Alanine
α 1-AR	Récepteur α 1-adrénergique
α -SMA	Alpha-smooth muscle actin
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	Protéine-kinase activée par l'AMP
Ang-II	Angiotensine II
Ang-III	Angiotensine III
Ang-IV	Angiotensine IV
ANF	Atrial natriuretic factor
Apéline-R	Récepteur de l'apéline
APJ	Ancienne dénomination du récepteur de l'apéline
AQP2	Aquaporine de type 2
Arg	Arginine
ARM	Antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes
ARNI	Combinaison d'un antagoniste des AT1-R avec un inhibiteur de la néprilysine
ARNm	Acide ribonucléique (ARN) messenger
Asp	Acide aspartique
AT1-R	Récepteur de l'angiotensine II de type 1
AT1a-R	Récepteur de l'angiotensine II de type 1a
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Arginine-vasopressine
BNP	Brain natriuretic peptide (peptide cérébral natriurétique)
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	Concentration en calcium intracellulaire
CHO	Cellules d'ovaires de hamster chinois
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
cTnI	Troponine I cardiaque
dDAVP	1-désamino-8-D-arginine vasopressine
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DOCA	11-deoxycorticostérone acétate
DTD	Diamètre télédiastolique
DTS	Diamètre télésystolique
ECA-2	Enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2
eNOS	Oxyde nitrique synthase (forme endothéliale)
ERK	Kinases régulées par signal extracellulaire
FC	Fréquence cardiaque
FE	Fraction d'éjection
FEVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
FSK	Forskoline
Glu	Acide glutamique
GRK	Kinases des RCPGs
HEK293T	Cellules embryonnaires de rein humain

HFD	High Fat Diet (régime riche en graisse)
HIF-1 α	Facteur 1 α inductible par l'hypoxie
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HTA	Hypertension artérielle
HUVEC	Cellules endothéliales issues de la veine du cordon ombilical humain
IC	Insuffisance Cardiaque
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice 50
<i>i.c.v.</i>	Intracérébroventriculaire
IEC	Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'angiotensine I
IHC	Immunohistochimie
IM	Infarctus du myocarde
<i>i.p.</i>	Intrapéritonéal
IRC	Insuffisance Rénale Chronique
I/R	Ischémie/Reperfusion
<i>i.v.</i>	Intraveineux
K17F	Apéline-17
KO	Knock-out (invalidation génique)
Leu	Leucine
L-NAME	L-NG-nitroarginine Methyl Ester
Lys	Lysine
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
Met	Méthionine
MLC	Myosin light-chain (chaîne légère de la myosine)
mOsm	Milliosmole
NCX	Echangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
NEP	Endopeptidase neutre EC 3.4.24.11 (ou néprilysine)
ND	Néphropathie diabétique
NHE	Echangeur Na ⁺ /H ⁺
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
OD	Oreillette droite
OG	Oreillette gauche
OVLT	Organe vasculaire de la lame terminale
PA	Pression artérielle
pE13F	Forme pyroglutamylée de l'apéline-13
Phe	Phénylalanine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine-kinase A
PKC	Protéine-kinase C
PKRAD	Polykystose rénale autosomique dominante
PLC	Phospholipase C
POMC	Pro-opiomélanocortine
PVN	Noyau paraventriculaire
RCPG	Récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RT-PCR	Real-Time Polymerase chain reaction (transcription inverse et amplification génique)
<i>s.c.</i>	Sous-cutané
Ser	Sérine

SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase (ATPase Ca ²⁺ du réticulum sarco/endoplasmique)
SFO	Organe subfornical
SGLT2	Co-transporteur sodium-glucose de type 2
SHR	Rat spontanément hypertendu
SIAD	Syndrome d'antidiurèse inappropriée
SNAI	syndrome néphrogénique d'antidiurèse inappropriée
SON	Noyau supraoptique
Sphk1	Sphingosine kinase 1
SRA	Système rénine-angiotensine
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
TCD	Tubule contourné distal
TCP	Tubule contourné proximal
TGF-β	Facteur de croissance transformant-β
Trp	Tryptophane
V1a-R	Récepteur de la vasopressine de type 1a
V1b-R	Récepteur de la vasopressine de type 1b
V2-R	Récepteur de la vasopressine de type 2
VD	Ventricule droit
VG	Ventricule gauche
VTD	Volume télédiastolique
VTS	Volume télésystolique

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
TABLE DES ABBREVIATIONS	4
SOMMAIRE.....	7
INTRODUCTION	10
<i>I Découverte du récepteur APJ : un récepteur orphelin couplé aux protéines G.....</i>	<i>10</i>
II Identification des ligands endogènes du récepteur APJ : l'apéline et Elabela	10
II.1 Identification de l'apéline.....	10
II.2 Synthèse de l'apéline : différentes formes moléculaires produites	11
II.3 Métabolisme de l'apéline	12
II.4 Identification d'Elabela.....	13
III Caractéristiques structurales et pharmacologiques du récepteur de l'apéline	13
III.1 Caractéristiques structurales du récepteur de l'apéline	13
III.2 Affinité des différents fragments d'apéline pour le récepteur de l'apéline	15
III.3 Voies de signalisation du récepteur de l'apéline	15
III.3.1 Couplage négatif à l'adénylate cyclase	15
III.3.2 Mobilisation du Ca ²⁺ intracellulaire	15
III.3.3 Activation de la voie des MAP Kinases et de la voie p70S6K/PI3K/Akt	16
III.3.4 Internalisation du récepteur de l'apéline	16
III.3.5 Activation de la production du monoxyde d'azote (NO)	17
III.3.6 L'hétérodimérisation du récepteur de l'apéline	18
IV Distribution de l'apéline et de son récepteur	19
IV.1 Dans le cerveau	19
IV.1.1 Distribution des neurones apélinergiques.....	19
IV.1.2 Expression de l'ARNm du récepteur de l'apéline.....	21
IV.1.3 Co-localisation de l'apéline et de la vasopressine et de leurs récepteurs dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques.....	21
IV.2 Dans le rein.....	21
IV.3 Dans le système cardiovasculaire.....	23
V Rôles de l'apéline et de la vasopressine dans le maintien de l'équilibre hydrique.....	23
V.1 Effet aquarétique de l'apéline	23
V.1.1 Par un effet au niveau du cerveau.....	23
V.1.2 Par un effet au niveau du rein	25
V.1.2.1 Généralités sur l'organisation du rein	25
V.1.2.2 Régulation de l'homéostasie hydro-sodée.....	26
V.1.2.3 Réabsorption du sodium et de l'eau par le rein.....	27
V.1.2.4 Rappel du mécanisme d'action de l'AVP pour induire un effet anti-diurétique dans le canal collecteur	29
V.1.2.5 Effet aquarétique de l'apéline via une action dans le canal collecteur.....	29
V.1.2.6 Effet aquarétique de l'apéline via une action sur le flux sanguin rénal	30

V.2	Rôles de l'apéline et de la vasopressine dans le maintien de l'équilibre hydrique	31
V.2.1	Chez le rat	31
V.2.2	Chez l'homme	32
V.2.3	Effets de l'apéline sur le comportement dipsique	34
V.3	Régulation des taux circulants d'apéline et de vasopressine dans différentes pathologies où une altération de la balance hydrique et une hyponatrémie sont observées.....	35
V.3.1	Hyponatrémie : définitions, causes	35
V.3.2	Variation de la balance apéline-vasopressine dans les pathologies présentant une hyponatrémie.....	36
V.3.2.1	Le syndrome d'antidiurèse inapproprié	36
V.3.2.2	Insuffisance cardiaque	37
V.3.2.3	Cirrhose hépatique.....	38
V.3.3	Traitements de l'hyponatrémie	39
VI	Apéline et pression artérielle.....	40
VI.1	Effets vasculaires de l'apéline.....	40
VI.2	Effets de l'apéline sur la pression artérielle chez le rat contrôle et chez le rat hypertendu	42
VI.3	Inactivation de l'Apéline-R et conséquences sur la pression artérielle	43
VI.4	Évaluation d'une perfusion d'apéline-13 chez l'homme sur la réactivité vasculaire	44
VI.5	Mutations dans le gène du récepteur de l'apéline et hypertension	44
VII	Apéline et fonction cardiaque.....	45
VII.1	Généralités sur le cœur	45
VII.1.1	Anatomie du cœur	45
VII.1.2	Le tissu cardiaque	46
VII.1.3	La révolution cardiaque	47
VII.1.4	Contraction du muscle cardiaque.....	50
VII.2	L'apéline : sur le cœur sain	51
VII.2.1	Effets inotrope et lusitrope positifs	51
VII.2.2	Voies de signalisation mises en jeu lors de l'effet inotrope positif de l'apéline	52
VII.3	Insuffisance cardiaque.....	55
VII.3.1	Description et origines de l'insuffisance cardiaque	55
VII.3.1.1	Epidémiologie.....	55
VII.3.1.2	Physiopathologie.....	56
VII.3.1.3	Mécanismes au niveau cardiaque	57
VII.3.1.4	Mécanismes au niveau extracardiaque.....	59
VII.3.2	Traitements pharmacologiques de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite et limitations	59
VII.3.2.1	Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I	59
VII.3.2.2	Les bêtabloquants	60
VII.3.2.3	Les antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes.....	60
VII.3.2.4	Les gliflozines.....	60
VII.3.2.5	Autres médicaments	61
VII.3.3	Nouveaux types de traitements de l'insuffisance cardiaque.....	61
VII.4	L'apéline dans l'insuffisance cardiaque	62
VII.4.1	Rôle cardioprotecteur.....	62
VII.4.2	Rôle anti-apoptotique.....	63
VII.4.3	Rôles anti-hypertrophique et anti-fibrotique	65

VII.4.4 Rôle pro-angiogénique	66
VIII Développement d'agonistes de l'Apéline-R.....	67
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	71
RESULTATS	73
I Article 1. "A metabolically stable apelin-17 analog decreases AVP-induced antidiuresis and improves Hyponatremia" (Nature Communications)	73
I.1 Introduction.....	73
I.2 Discussion	75
II Article 2. "The metabolically stable apelin-17 analog, LIT01-196, improves cardiac function and reduces remodeling in heart failure post-myocardial infarction"	79
II.1 Introduction.....	79
II.2 Discussion	81
DISCUSSION GENERALE.....	86
PERSPECTIVES.....	90
BIBLIOGRAPHIE	97
ANNEXE I: Article "LIT01-196, a metabolically stable apelin-17 analog, normalizes blood pressure in hypertensive DOCA-salt rats via a NO synthase-dependent mechanism"	113
ANNEXE II: Revue "Apelin and Vasopressin: The Yin and Yang of Water Balance"	114

INTRODUCTION

I Découverte du récepteur APJ : un récepteur orphelin couplé aux protéines G

L'histoire du récepteur de l'apéline débute avec le clonage de l'ADNc du récepteur APJ en 1993 à partir d'une banque génomique humaine par O'Dowd et collaborateurs (O'Dowd et al., 1993). Il s'agit d'une séquence qui code pour un récepteur orphelin, à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G (RCPG), composé de 380 acides aminés. Ce récepteur a été nommé APJ. L'APJ a par ailleurs été cloné chez la souris (Devic et al., 1999) et dans notre laboratoire chez le rat et est composé de 377 acides aminés et partage 31% d'identité de séquence protéique avec le récepteur murin de l'angiotensine II (Ang-II) de type 1a (AT1a-R) et 90 % avec le récepteur orphelin humain APJ (De Mota et al., 2000; O'Carroll et al., 2000). Des expériences de production d'AMP cyclique (AMPC) ou d'inositol phosphates en présence de différents fragments d'angiotensine dans une lignée de cellules d'ovaires d'hamster chinois (CHO) exprimant de façon stable le récepteur APJ de rat ont permis de montrer que ce récepteur n'était pas activé par l'angiotensine II, III ou IV (Ang-III, Ang-IV) (De Mota et al., 2000). Ces expériences montraient que le récepteur APJ n'était pas un récepteur des angiotensines et demeurait un récepteur orphelin pour lequel il fallait trouver le ligand endogène.

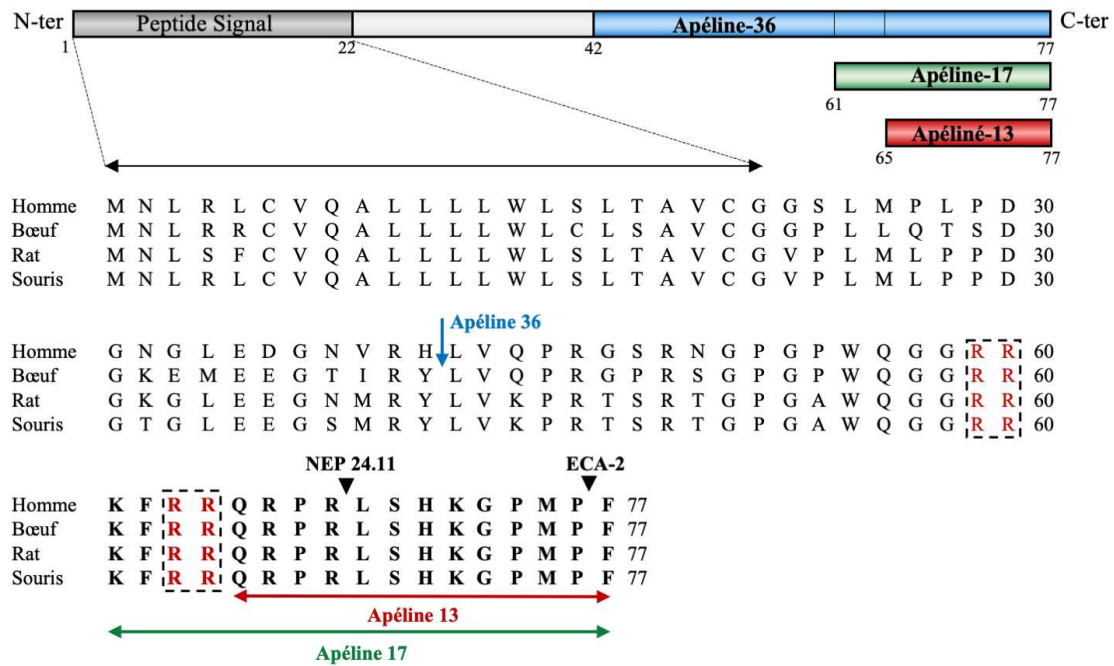
II Identification des ligands endogènes du récepteur APJ : l'apéline et Elabela

II.1 Identification de l'apéline

Fin 1998, Tatemoto et collaborateurs (Tatemoto et al., 1998) ont isolé le ligand endogène du récepteur APJ humain à partir d'extraits d'estomacs de bœuf purifiés par HPLC en utilisant une méthode de criblage fondée sur la mesure des variations de pH extracellulaire. Le peptide de 36 acides aminés isolé a été nommé « apéline » pour **APJ Endogenous LiGaNd**. Dès lors, le récepteur APJ fut nommé, récepteur de l'apéline (Apéline-R). L'apéline est issue d'un large précurseur, la préproapéline, composé de 77 acides aminés (Tatemoto et al., 1998). Chez l'Homme le gène de l'apéline est localisé sur le chromosome X et la phase ouverte de lecture est localisée dans 2 exons (1 et 2) séparés par un intron d'environ 6 kb. La partie non codante en 3' se retrouve aussi dans 2 exons (2 et 3). Ces données peuvent expliquer la présence de deux transcrits de tailles différentes, de 3,0 et 3,5 kb, en proportions variables suivant les tissus étudiés

(Lee et al., 2000). La préproapéline a été isolée dans différentes espèces (Tatemoto et al., 1998; Habata et al., 1999; Lee et al., 2000) et l'alignement des séquences de souris, rat, bœuf et Homme a révélé une conservation stricte des 17 derniers acides aminés situés à l'extrémité C-terminale du précurseur correspondant à l'apéline-17 ou K17F (acides aminés 61 à 77 de la séquence de la préproapéline, Figure 1).

Précurseur de l'apéline, la préproapéline



Formes moléculaires de l'apéline détectées *in vivo* chez le rongeur et chez l'Homme

Apéline 36 L V Q P R G S R N G P G P W Q G G R R K F R R Q R P R L S H K G P M P F
Apéline 17 (K17F) K F R R Q R P R L S H K G P M P F
Forme pyroglutamylée de l'apéline 13 (pE13F) p E R P R L S H K G P M P F

Figure 1 : Alignement des séquences primaires du précurseur de l'apéline, la préproapéline, chez l'Homme, le bœuf, le rat et la souris et des différentes formes moléculaires de l'apéline détectées *in vivo*. Chez ces espèces, l'alignement des séquences en acides aminés a révélé une conservation stricte des 17 derniers acides aminés carboxyterminaux (en gras) correspondant à l'apéline 17 ou K17F. *In vivo*, la préproapéline donne naissance à différentes formes moléculaires d'apéline qui diffèrent par leur longueur : soit les 36 (flèche bleue), 17 (flèche verte) ou 13 (flèche rouge) derniers acides aminés à l'extrémité C-terminale du précurseur. *In vivo*, l'apéline 13 (Q13F) est spontanément pyroglutamylée en pE13F. Les flèches noires représentent les sites de clivage de la NEP et d'ECA-2. En rouge, les doublets dibasiques impliqués dans la maturation de K17F et pE13F. Adapté de (Galanth et al., 2012)

II.2 Synthèse de l'apéline : différentes formes moléculaires produites

In vivo, la préproapéline donne naissance à différentes formes moléculaires d'apéline qui diffèrent par leur longueur, soit les 36, 17 ou 13 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale

du précurseur (Figure 1) (Habata et al., 1999; Hosoya et al., 2000; Kawamata et al., 2001; De Mota et al., 2004; Azizi et al., 2008). L'apéline-13 (acides aminés 65 à 77 de la séquence de la préproapéline) est naturellement pyroglutamylée à son extrémité N-terminale (forme pyroglutamylée de l'apéline-13 ou pE13F) (Tatemoto et al., 1998) (Figure 1). En raison de la présence de doublets dibasiques dans les séquences de la préproapéline (bovine, humaine, de rat et de souris), les prohormone convertases semblent impliquées dans la maturation du précurseur pour donner naissance à K17F et pE13F. La proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 3 (PCSK3 également appelée furine) clive *in vitro* la proapéline directement en apéline-13 sans générer d'isoforme plus longue (Shin et al., 2013). Pour l'apéline-36 (acides aminés 42 à 77 de la séquence de la préproapéline), en raison de l'absence de motifs dibasiques en amont du site de clivage de l'apéline-36, le mécanisme de maturation reste à définir.

L'apéline-36 prédomine dans les poumons, les testicules et l'utérus chez le rat ainsi que dans le colostrum bovin. L'apéline-36 et pE13F ont aussi été détectés dans les glandes mammaires de rat (Hosoya et al., 2000; Kawamata et al., 2001). Dans le cerveau et le plasma de rat, ainsi que dans le plasma humain, les formes prédominantes sont pE13F et K17F alors que la concentration d'apéline-36 est beaucoup plus faible (De Mota et al., 2004; Azizi et al., 2008). Dans le cœur, la forme la plus abondante est l'apéline-13 (Maguire et al., 2009).

II.3 Métabolisme de l'apéline

L'enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 (ECA-2, EC 3.4.17.23), une carboxypeptidase, hydrolyse *in vitro* et *in vivo* la phénylalanine C-terminale de l'apéline-36, K17F ou pE13F (Vickers et al., 2002; Wang et al., 2016) et produit K16P ou pE12P (Figure 1). De plus, il a été récemment montré que l'endopeptidase neutre 24.11 ou néprilysine (NEP, EC 3.4.24.11) hydrolyse la liaison peptidique Arg⁸-Leu⁹ de K17F ainsi que la liaison peptidique Arg⁴-Leu⁵ de pE13F (Figure 1) conduisant à deux peptides tronqués (McKinnie et al., 2016) dépourvus de la capacité de se lier à l'Apéline-R, faisant de la NEP la première enzyme de dégradation de l'apéline capable d'inactiver complètement le peptide. Les analogues synthétiques modifiés au sein du site d'hydrolyse de la NEP (motif « RPRL ») montrent une stabilité protéolytique *in vitro* améliorée tout en gardant une bonne affinité pour l'Apéline-R, soulignant l'importance de ce motif pour la liaison de l'apéline à son récepteur (McKinnie et al., 2017).

II.4 Identification d'Elabela

Un deuxième ligand endogène de l'Apéline-R a été découvert en 2013 par deux équipes différentes et a été nommé Elabela ou Toddler (la nomenclature internationale IUPHAR a défini Elabela comme le nom officiel du peptide) (Chng et al., 2013; Pauli et al., 2014). Ce peptide est codé par le gène nommé APELA pour "Apelin Receptor Early Endogenous Ligand" et est situé sur le chromosome 4 chez l'Homme (Chng et al., 2013; Pauli et al., 2014). L'apéline et Elabela ont peu d'homologie de séquence, et les deux peptides endogènes proviennent de précurseurs différents dont la maturation donne naissance à plusieurs isoformes actives (Read et al., 2019). Elabela est produit à partir d'un précurseur de 54 acides aminés. Après clivage du peptide signal N-terminal composé de 22 acides aminés, l'isoforme Elabela-32 est sécrétée sous forme active (Yang et al., 2017b; Soulet et al., 2020). Elabela-32 peut être ensuite clivée par la furine pour produire deux fragments composés de 22 et 11 acides aminés, nommés respectivement Elabela-22 et Elabela-11 (Chng et al., 2013; Pauli et al., 2014; Soulet et al., 2020). La séquence du fragment C-terminal le plus court, Elabela-11, est strictement conservée dans toutes les espèces. Elabela-32 et Elabela-22 présentent une affinité sub-nanomolaire pour l'Apéline-R, alors qu'Elabela-11 a une moins bonne affinité ($K_i = 5.82 \pm 0.08$) (Yang et al., 2017b; Couvineau et al., 2020). Elabela est principalement exprimée durant le développement au cours de la gastrulation, stade où l'apéline n'est pas exprimé (Chng et al., 2013; Pauli et al., 2014). Chez l'adulte, l'expression de l'ARNm codant pour Elabela est élevée dans la prostate et les reins (Chen et al., 2017). Enfin, les taux circulants d'Elabela peuvent également provenir en partie des cellules endothéliales des vaisseaux (Yang et al., 2017b). Pour une revue sur Elabela voir Read *et coll.* (Read et al., 2019).

III Caractéristiques structurales et pharmacologiques du récepteur de l'apéline

III.1 Caractéristiques structurales du récepteur de l'apéline

L'Apéline-R est un RCPG, qui appartient à la sous-famille de la « Rhodopsine ». On retrouve en effet les motifs caractéristiques de cette sous-famille, comme l'Asp^{2.50} et l'Arg^{3.50} du motif DRY, les cystéines des boucles ECL1 et ECL2 formant un pont disulfure et le motif NsxxNPxxY (De Mota et al., 2000). Des études structure-fonction par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée ont permis de définir le mode de liaison de l'apéline à l'Apéline-R (Figure 2). En effet, il a été montré au laboratoire que des résidus acides de l'Apéline-R situés à la surface du récepteur,

Glu172, Asp282 et Asp92, contribuent à la liaison de pE13F, en interagissant avec les résidus basiques de pE13F, respectivement Arg2, Arg4 et Lys8 (Gerbier et al., 2015). Par la suite, la résolution de la structure cristallographique de l'Apéline-R humain avec un antagoniste peptidique cyclique AMG3054 a confirmé le rôle de l'Asp284 (équivalent de l'Asp282 du récepteur de rat) dans la liaison de l'apéline (Ma et al., 2017). Par ailleurs, il a été démontré que les résidus Phe 255 et Trp 259 étaient des résidus clés pour induire l'internalisation de l'Apéline-R de rat et ne jouaient aucun rôle dans la liaison de l'apéline à son récepteur ou dans le couplage de l'Apéline-R à la protéine Gαi (Iturrioz et al., 2010). Ces deux résidus forment une poche aromatique qui accueille la phénylalanine C-terminale de l'apéline, un résidu clé pour déclencher l'internalisation de l'Apéline-R et la réponse vasodilatatrice de l'apéline comme nous le verrons ultérieurement dans le paragraphe III.3.4 (El Messari et al., 2004; Besserer-Offroy et al., 2018).

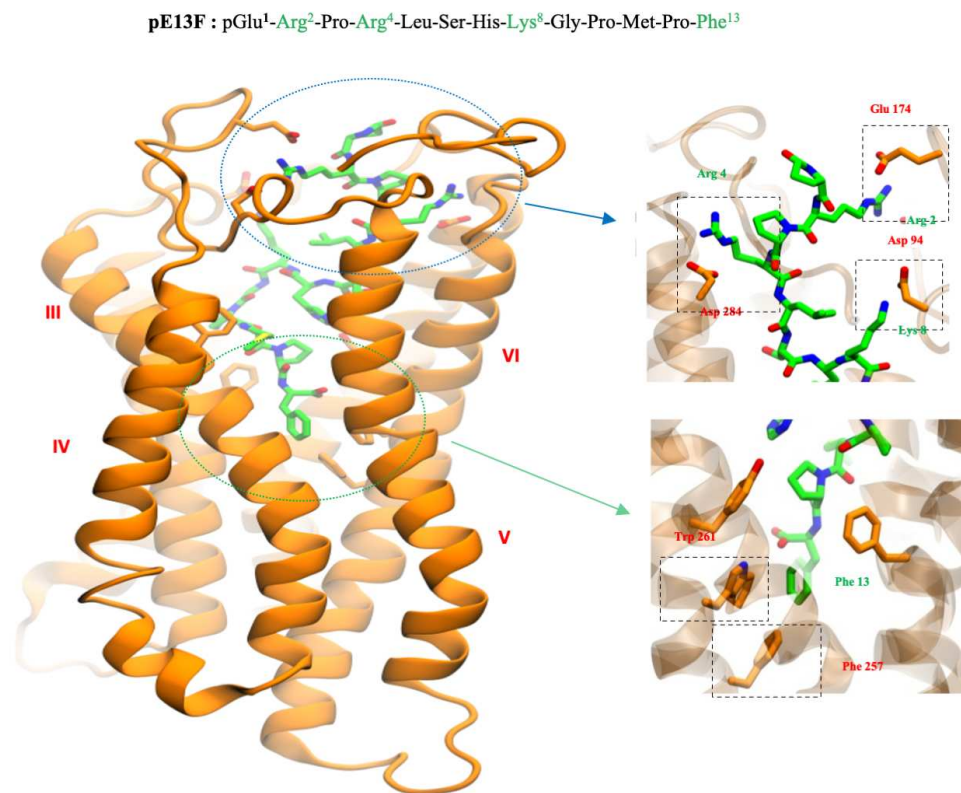


Figure 2 : Représentation du modèle tridimensionnel du récepteur de l'apéline (Apéline-R) humain complexé avec pE13F. Le squelette de l'Apéline-R est en orange tandis que pE13F est en vert. Le cercle en pointillé bleu montre une vue détaillée du site de liaison de pE13F avec les interactions entre les résidus basiques de pE13F (Arg2, Arg4 et Lys8, en vert) et les résidus acides de l'Apéline-R (Asp94, Glu174 et Asp284, en orange). Le cercle en pointillé vert montre une vue détaillée de la cavité hydrophobe à l'intérieur du site de liaison de l'Apéline-R dans laquelle le Phe C-terminale de pE13F (Phe13 en vert) interagit avec les résidus aromatiques de l'Apéline-R (Phe257 et Trp 261, orange). Adapté de (Iturrioz et al., 2010; Gerbier et al., 2015).

III.2 Affinité des différents fragments d'apéline pour le récepteur de l'apéline

Les différentes formes moléculaires de l'apéline (apéline 36, K17F et pE13F) présentent une affinité subnanomolaire pour l'Apéline-R (Hosoya et al., 2000; Katugampola et al., 2001; Kawamata et al., 2001; Medhurst et al., 2003; Iturrioz et al., 2010).

III.3 Voies de signalisation du récepteur de l'apéline

III.3.1 Couplage négatif à l'adénylate cyclase

Plusieurs laboratoires ont montré que les Apéline-Rs murin et humain, exprimés de façon stable dans des cellules CHO ou dans des cellules embryonnaires de rein humain (HEK293T), sont couplés négativement à l'adénylate cyclase (AC). L'apéline 36, K17F et pE13F inhibent la production d'AMPC induite par la forskoline (FSK) avec une concentration inhibitrice 50 (IC₅₀) subnanomolaire (Habata et al., 1999; De Mota et al., 2000; Reaux et al., 2001; Masri et al., 2002; El Messari et al., 2004). Puis Hosoya *et coll.* ont montré que la toxine de Pertussis bloquait l'effet inhibiteur de l'apéline-36 ou de pE13F sur la production d'AMPC, démontrant le couplage de l'Apéline-R à G α i (Hosoya et al., 2000). Ceci a été confirmé par 2 études (Masri et al., 2006; Bai et al., 2008) qui ont montré que l'Apéline-R est préférentiellement couplé aux protéines G α i1 et G α i2.

III.3.2 Mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire

L'apéline-36, K17F et pE13F entraînent par ailleurs une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ([Ca²⁺]_i) dans les cellules de tétatocarcinome Ntera 2 humaines (NT2N), qui se différencient en neurones post-mitotiques après stimulation par l'acide rétinoïque, ainsi que dans des cellules dérivées des basophiles (RBL-2H3) et les cellules HEK293T exprimant de façon stable l'Apéline-R humain, néanmoins le mécanisme mis en jeu n'est pas connu et n'est pas lié à un couplage de l'Apéline-R à G α q (Choe et al., 2000; Medhurst et al., 2003; Zhou et al., 2003a, 2003b). A l'inverse, Hus-Citharel *et coll.* ont montré que K17F diminue la mobilisation du [Ca²⁺]_i induite par l'Ang-II dans les artérioles glomérulaires microdisséquées de rein de rat *via* la production d'oxyde nitrique (NO) (Hus-Citharel et al., 2008). Fait intéressant, dans plusieurs études, la stimulation de l'Apéline-R par K17F ou pE13F induit une vasodilatation et module le tonus vasculaire *via* la production de NO (Reaux et al., 2001; Tatemoto et al., 2001; Hus-Citharel et al., 2008; Gerbier et al., 2017).

III.3.3 Activation de la voie des MAP Kinases et de la voie p70S6K/PI3K/Akt

L'activation du système apéline/Apéline-R peut également induire l'activation des voies de signalisation liées aux kinases. Dans les cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) et dans les cellules CHO exprimant de façon stable l'Apéline-R de souris, la stimulation de l'Apéline-R par l'apéline induit l'activation de la voie de signalisation phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protéine kinase B (Akt) et la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein kinases, MAPK) stimulant la phosphorylation de la protéine kinase ribosomique S6 (p70S6K) (Masri et al., 2002; Bai et al., 2008; Eyries et al., 2008). Plus tard, D'Aniello *et coll.*, ont montré que l'apéline induit la phosphorylation de la kinase p70S6 dans les cellules souches embryonnaires murines *via* une voie dépendante de ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases) (D'Aniello et al., 2009). Les protéines ERK1 et ERK2 sont phosphorylées par l'apéline dans les cellules CHO exprimant de manière stable l'Apéline-R de souris de façon G α i- et protéine kinase C (PKC)-dépendante et indépendamment des petites protéines G, les protéines Ras (Masri et al., 2002, 2006). Nous verrons dans le prochain paragraphe qu'il existe également une activation des MAPK ERK1/2 indépendante de la protéine G α i.

III.3.4 Internalisation du récepteur de l'apéline

Comme pour la plupart des RCPGs, l'apéline en se fixant sur son récepteur, induit la phosphorylation de l'Apéline-R par des kinases des RCPGs (GRK), puis le recrutement de la β -arrestine1/2 et l'internalisation de l'Apéline-R *via* un mécanisme dépendant de la clathrine (Evans et al., 2001; Reaux et al., 2001; Medhurst et al., 2003; Zhou et al., 2003b; El Messari et al., 2004; Iturrioz et al., 2010), K17F entraînant une internalisation plus massive que pE13F à une plus faible concentration. La sérine en position 348 (Ser 348) à l'extrémité C-terminale de l'Apéline-R représente un site de phosphorylation pour GRK2/5 qui est crucial pour l'interaction de l'Apéline-R avec les β -arrestines 1 et 2, permettant ainsi l'internalisation de l'Apéline-R (Chen et al., 2014b).

Comme nous l'avons vu plus haut le tryptophane 259 (Trp 259) et la phénylalanine 255 (Phe 255) situés dans le TMVI en accueillant la phénylalanine C-terminale de pE13F sont responsables de l'internalisation de l'Apéline-R (Iturrioz et al., 2010). De plus, la délétion de la phénylalanine C-terminale de K17F donnant naissance à K16P ou sa substitution par une alanine (Ala) donnant naissance à K17A diminue fortement la capacité du peptide à déclencher l'internalisation de l'Apéline-R sans affecter son affinité pour l'Apéline-R ou sa capacité à

activer le couplage de l'Apéline-R à la protéine G α i (El Messari et al., 2004; Iturrioz et al., 2010; Wang et al., 2016). Toutes ces données indiquent une dissociation fonctionnelle entre le couplage de l'Apéline-R à la protéine G α i et l'internalisation de ce récepteur. Cela implique que l'Apéline-R existe dans différentes conformations déclenchées par des ligands différant par la présence ou l'absence de la phénylalanine C-terminale (Iturrioz et al., 2010). Ces ligands conduiraient ainsi à l'activation de voies de signalisation différentes, conduisant à différents effets biologiques.

Cela suggère que l'Apéline-R peut présenter une « sélectivité fonctionnelle » ou une « signalisation biaisée » par son couplage avec la protéine G α i et d'autre part en recrutant la β -arrestine 1 et 2. Cette hypothèse a été confirmée par Ceraudo *et coll.* (Ceraudo et al., 2014) qui ont montré que K17F active la phosphorylation de ERK1/2 de façon β -arrestine- et protéine G α i-dépendante alors que K16P n'active cette phosphorylation que par la protéine G α i, confirmant le caractère biaisé de K16P. Cette sélectivité fonctionnelle des différentes formes moléculaires de l'apéline, indique que l'activation d'ERK1/2 dépendante de la β -arrestine et indépendante de G α i, pourrait participer à la diminution de la pression artérielle (PA) induite par K17F. En effet, lorsque K16P et pE13A (phénylalanine C-terminale substituée par une Ala) sont injectés par voie intraveineuse (*i.v.*) chez le rat, ils perdent leur capacité à diminuer la PA par rapport aux peptides naturels correspondants à K17F et pE13F (El Messari et al., 2004; Lee et al., 2005). De plus, le complexe Apéline-R/pE13F internalisé est rapidement recyclé à la surface cellulaire *via* une voie Rab4 puis dirigé vers les lysosomes *via* la voie Rab7. Ces deux voies sont liées à l'association β -arrestine 1 avec des différences d'association spatio-temporelles (Lee et al., 2010).

Ces différences sont en accord avec les études montrant que l'apéline-36 conduit à une désensibilisation forte et soutenue de l'Apéline-R alors que la désensibilisation induite par pE13F est transitoire (Masri et al., 2006). K17F présente une capacité à recruter la β -arrestine 2 supérieure à celle de pE13F, ce qui pourrait expliquer sa plus grande capacité à induire l'internalisation de l'Apéline-R et à diminuer la PA (Couvineau et al., 2020). Par conséquent, des différences subtiles existent entre les isoformes d'apéline concernant leurs propriétés pharmacologiques, qui peuvent influencer leurs actions physiologiques. Ces éléments sont donc à prendre en compte dans le choix des analogues de l'apéline à développer.

III.3.5 Activation de la production du monoxyde d'azote (NO)

Le NO est une molécule endogène synthétisée à partir de la L-arginine dont la catalyse (oxydation) en L-citrulline est assurée par une enzyme, la NO synthase (NOS). Trois isoformes de la NOS sont aujourd'hui connues : la NOS neuronale (nNOS), la NOS inductible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS). La eNOS est exprimée constitutivement notamment au niveau des

cellules endothéliales vasculaires et dans les myocytes. La eNOS peut être activée par une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (Fleming and Busse, 1999). Le NO endogène joue un rôle important dans la régulation de la PA, c'est un puissant vasodilatateur, sa libération par les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux sanguins va induire une relaxation des muscles lisses vasculaires (Denninger and Marletta, 1999).

Plusieurs études ont démontré que les effets hypotenseur et vasodilatateur de l'apéline sont sensibles aux inhibiteurs de la eNOS (L-NAME et LMMA, analogues synthétiques de son substrat la L-arginine) (Tatemoto et al., 2001; Japp et al., 2008). De plus, le système apélinergique augmente l'activité de la eNOS de manière dépendante du $[Ca^{2+}]_i$ dans des aortes de rat microdisséquées (Jia et al., 2007). Une autre étude a rapporté que la signalisation PI3K/Akt induite par l'apéline peut augmenter la phosphorylation de l'eNOS et donc son activité dans des aortes de souris isolées (Zhong et al., 2007). Cette activité accrue va engendrer une augmentation de la production et la libération de NO par les cellules endothéliales (Mughal et al., 2018) et induire une vasodilatation.

III.3.6 L'hétérodimérisation du récepteur de l'apéline

De plus, comme de nombreux RCPGs, l'Apéline-R peut également former des hétérodimères *in vitro* avec d'autres RCPGs. Il a été démontré que l'Apéline-R se dimérise avec le récepteur de l'Ang-II de type 1 (AT1-R), conduisant à une inhibition de la signalisation de l'Ang-II par l'apéline (Chun et al., 2008; Sun et al., 2011; Siddiquee et al., 2013). L'apéline exerce donc une coopérativité négative sur la liaison de l'Ang-II à son récepteur (Siddiquee et al., 2013). L'Apéline-R peut également s'hétérodimériser avec le récepteur κ -opioïde, entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire des cellules HEK293T surexprimant les deux récepteurs. Cet effet est médié par l'activation de la PKC et la diminution de l'activité de la protéine kinase A (PKA) (Li et al., 2012b). Dans les cellules HUVEC, il a été démontré que l'Apéline-R s'hétérodimérise avec le récepteur de la bradykinine de type 1, entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire et de la phosphorylation de la eNOS *via* une voie de signalisation PKC-dépendante et dépendante de la protéine G α_q (Bai et al., 2014b). Le même groupe a montré que l'Apéline-R peut former des oligomères avec le récepteur de la neurotensine (NTSR1) et que ces oligomères vont induire l'activation de ERK1/2 *via* l'activation du calcium (Ca^{2+}) d'une façon G α_q dépendante (Bai et al., 2014a). Ces derniers travaux sont encore préliminaires et reste à confirmer. Par ailleurs, Cai *et coll.* ont montré que l'Apéline-R pouvait

également former des homodimères fonctionnels capables de coupler à différentes Gαi (Cai et al., 2017).

IV Distribution de l'apéline et de son récepteur

IV.1 Dans le cerveau

Des études par transcription inverse et amplification génique (RT-PCR) quantitative (Kawamata et al., 2001; Medhurst et al., 2003), hybridation *in situ* et Northern blot (Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000) ont montré que les ARNm codant pour la préproapéline ou pour l'Apéline-R sont distribués de façon hétérogène dans diverses structures cérébrales chez le rat et l'Homme.

IV.1.1 Distribution des neurones apélinergiques

Concernant l'apéline, le développement d'un anticorps polyclonal présentant une affinité et une sélectivité élevées pour K17F (qui reconnaît également pE13F et l'apéline-36) a permis de visualiser, pour la première fois, la présence de neurones apélinergiques dans le cerveau de rat (Reaux et al., 2001, 2002; De Mota et al., 2004). Les corps cellulaires de ces neurones sont particulièrement abondants au sein de l'hypothalamus et du bulbe rachidien, structures impliquées dans le contrôle neuroendocrinien, le comportement dipsique, le comportement alimentaire et la régulation de la PA. On retrouve notamment l'apéline dans le noyau supraoptique (SON) et la partie magnocellulaire du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus, le noyau arqué, le noyau réticulé bulbaire latéral et le noyau ambigu (Reaux et al., 2002). Les fibres et les terminaisons des neurones apélinergiques sont plus largement distribuées, en particulier, une forte densité est présente dans la couche interne de l'éminence médiane et dans l'hypophyse postérieure (Brailoiu et al., 2002; Reaux et al., 2002), suggérant que les neurones apélinergiques du PVN et du SON se projettent, comme les neurones magnocellulaires vasopressinergiques et ocytocinergiques, dans l'hypophyse postérieure (Figure 3). Des études de double marquage en immunofluorescence ont confirmé cette hypothèse en montrant que l'apéline est localisée dans les mêmes neurones magnocellulaires hypothalamiques que l'arginine-vasopressine (AVP, hormone antidiurétique) (De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo et al., 2004) et l'ocytocine (Brailoiu et al., 2002; Bodineau et al., 2011). De nombreuses fibres apélinergiques ont également été visualisées dans la région située le long du troisième ventricule, dans la lame terminale (composée de l'organe subfornical, SFO ; de l'organe

vasculaire de la lame terminale, OVLT et du noyau médian préoptique), impliquée dans la régulation du comportement dipsique (Johnson et al., 1996).

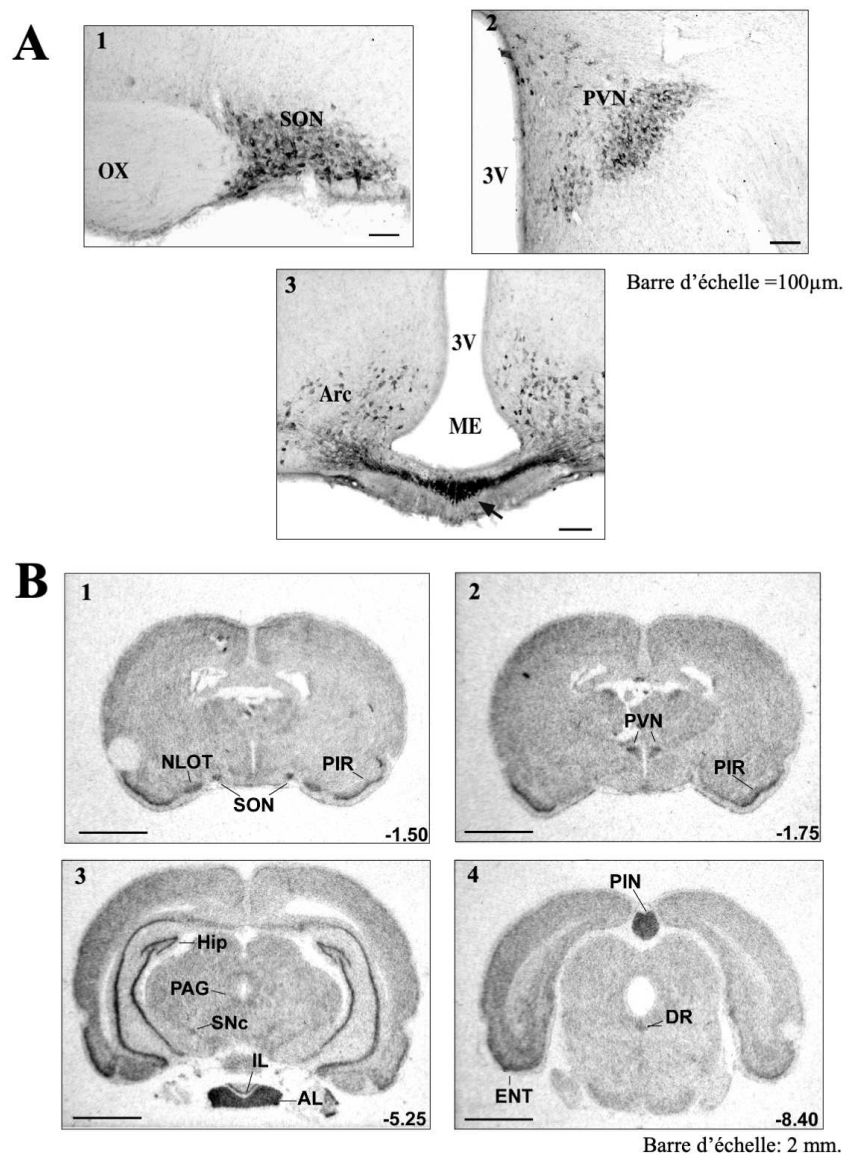


Figure 3 : Distribution des corps cellulaires et des fibres des neurones apélinergiques et de l'expression de l'ARNm des récepteurs de l'apéline, dans le cerveau de rat adulte. (A) Coupes frontales de cerveau de rat adulte injecté avec de la colchicine. Les corps cellulaires et les fibres immunoréactive à l'apéline sont localisés dans le SON (1), le PVN (2), l'Arc et la ME (3). (B) Distribution de l'expression de l'ARNm de l'Apéline-R dans des coupes frontales de cerveau de rat adulte. Les figures ont été scannées directement à partir des films obtenus par autoradiographique des coupes de cerveau hybridés avec la sonde antisens dirigée contre l'ARNm de l'Apéline-R. Les sections représentatives sont situées à des antériorités différentes déterminées à partir du bregma indiqué dans le coin inférieur droit. Abréviation: AL = lobe antérieur de l'anté-hypophyse ; Arc = noyau arqué de l'hypothalamus ; DR = noyau Raphé dorsal ; ENT = cortex entorhinal ; HIP = hippocampe ; IL = lobe intermédiaire de l'hypophyse ; ME = éminence médiane ; NLOT = noyau du tractus olfactif latéral ; OX = chiasma optique ; PAG = substance grise périaqueducale ; PIN = glande pinéale ; PIR = cortex piriforme ; PVN = noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; SNc = pars compacta de la substance noire ; SON = noyau supraoptique ; 3V = troisième ventricule. Adapté de (De Mota et al., 2000; Reaux et al., 2002).

IV.1.2 Expression de l'ARNm du récepteur de l'apéline

Tout comme l'apéline, le récepteur de ce peptide est très largement distribué dans le cerveau de rat (De Mota et al., 2000; Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000). Ainsi, l'expression de l'ARNm de l'Apéline-R a été observée par hybridation *in situ* dans le cortex cérébral (au niveau du cortex piriforme et du cortex entorhinal), l'hippocampe et dans des structures contenant les neurones monoaminergiques (dopamine, sérotonine, noradrénaline) tels que la substance noire *pars compacta*, le noyau raphé dorsal et le *locus coeruleus*. Une expression très forte est détectée dans les noyaux hypothalamiques riches en apéline, dont le PVN, le SON et le noyau arqué, ainsi que dans la glande pinéale et les lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse (Figure 3).

IV.1.3 Co-localisation de l'apéline et de la vasopressine et de leurs récepteurs dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques

Des expériences de double marquage associant l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ* ont mis en évidence dans le PVN et le SON la présence de l'ARNm codant pour l'Apéline-R (Reaux et al., 2001; O'Carroll and Lolait, 2003; Pope et al., 2012), et celles des ARNm codant pour les récepteurs de l'AVP de type 1a (V1a-R) et 1b (V1b-R) (Hurbin et al., 1998), dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques (Figure 5). D'autres études portant sur la distribution de l'apéline dans le PVN, le SON, l'éminence médiane et le noyau magnocellulaire accessoire dorsolatéral ont montré un fort marquage de l'apéline et une colocalisation avec l'AVP dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques (Brailoiu et al., 2002; De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo et al., 2004). L'ensemble de ces données sont en faveur d'une interaction entre l'apéline et l'AVP.

IV.2 Dans le rein

Les ARNm codant pour la préproapéline, ainsi que pour l'Apéline-R, sont exprimés dans le rein chez le rat et chez l'Homme (Hosoya et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; Medhurst et al., 2003). Une immunoréactivité apéline est également détectée dans les cellules endothéliales humaines de petits vaisseaux intrarénaux (Klein et al., 2005). L'expression de l'apéline a été détectée chez le rat dans les cellules épithéliales tubulaires, les glomérules et les cellules épithéliales vasculaires (Ripoll et al., 2011), mais d'autres laboratoires ont montré que l'expression de l'apéline était largement limitée aux cellules isolées de la médulla (O'Carroll et al., 2017). Dans deux autres études, une immunoréactivité apéline a été visualisée chez l'homme dans le canal

collecteur (De Falco et al., 2002) et chez le rat, dans les canaux collecteurs médullaires, co-localisée avec l'expression des aquaporines de type 2 (AQP2) (Xu et al., 2020).

L'expression de l'ARNm de l'Apéline-R est détectée dans les cellules musculaires lisses endothéliales et vasculaires des artérioles glomérulaires de rat (Hus-Citharel et al., 2008). Chez le rat une expression élevée de l'ARNm de l'Apéline-R est présente dans les glomérules, environ 8 fois plus élevée que dans les autres segments de néphron. L'expression dans tous les segments de néphron est modérée mais significative (O'Carroll et al., 2000; Hus-Citharel et al., 2008) (Figure 4), y compris de manière intéressante dans le canal collecteur où les récepteurs de la vasopressine de type 2 (V2-R) sont également exprimés (Ostrowski et al., 1992). On observe une expression plus faible dans le canal collecteur cortical que dans le canal collecteur de la médullaire externe et une expression plus élevée dans le canal collecteur de la médullaire interne (Hus-Citharel et al., 2008; O'Carroll et al., 2017).

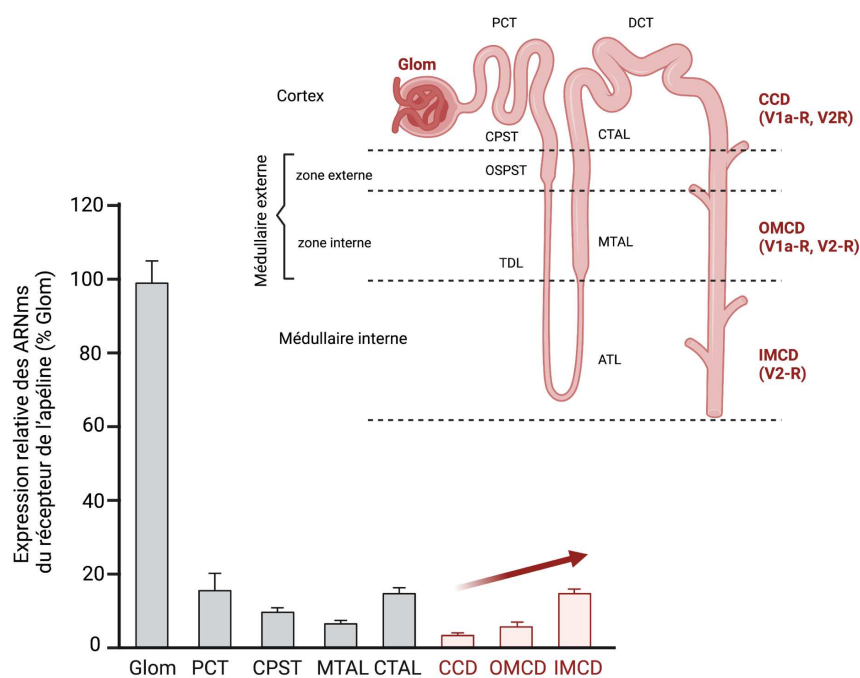


Figure 4 : Expression des ARNm de l'Apéline-R le long du néphron. Le long des segments de néphron de rat, on observe une expression très élevée des ARNm du récepteur de l'apéline dans le glomérule alors qu'elle est plus modérée mais significative le long du néphron. De plus, de manière intéressante on note la présence des ARNm en gradient croissant le long du canal collecteur, là où sont exprimés les récepteurs de la vasopressine.

Glom : glomérule ; *PCT* : tubule contourné proximal ; *CPST* : pars recta corticale du tubule proximal ; *OSPST* : pars recta médullaire du tubule proximal ; *TDL* : segment grêle descendant ; *ATL* : segment grêle ascendant ; *MTAL* : branche large ascendante de la médulla externe ; *CTAL* : branche large ascendante corticale ; *DCT* : tubule contourné distal ; *CCD* : canal collecteur cortical ; *OMCD* : canal collecteur de la médulla externe ; *IMCD* : canal collecteur de la médulla interne. Adapté de (Hus-Citharel et al., 2008)

IV.3 Dans le système cardiovasculaire

Des études par RT-PCR ont rapporté des niveaux élevés de l'expression des ARNm de l'Apéline-R et de la préproapéline ainsi qu'une immunoréactivité de l'apéline, dans l'aorte, les artères coronaires, et pulmonaires de rat (Hosoya et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; Medhurst et al., 2003). Dans le système cardiovasculaire de l'embryon de souris, il a été démontré que l'ARNm de l'Apéline-R prédomine dans les cellules endothéliales des artères et des veines et dans les feuillets endocardiques du cœur (Kang et al., 2013). L'Apéline-R est exprimé chez le chien dans les cardiomyocytes, sur la membrane sarcoplasmique au niveau des bandes Z, une structure clé pour la contraction. Ces données sur la localisation de l'Apéline-R suggèrent que l'apéline pourrait avoir un effet sur la contractilité cardiaque (Chamberland et al., 2010).

Chez l'Homme la distribution de l'Apéline-R dans le système cardiovasculaire a été étudiée par immunohistochimie (IHC). Une immunoréactivité a été visualisée dans les cardiomyocytes ventriculaires, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et les cellules endothéliales intramyocardiques, et aussi dans les artères coronaires, mammaires et pulmonaires, et la veine saphène (Kleinz et al., 2005), mais la spécificité des anticorps dirigés contre l'Apéline-R reste sujet à débat. Une immunoréactivité apéline a été observée dans les cellules endothéliales vasculaires des gros vaisseaux, tels que l'artère coronaire et la veine saphène, les vaisseaux sanguins du rein et de la glande surrénale, et les cellules endothéliales vasculaires et endocardiques des oreillettes et des ventricules du cœur (Kleinz and Davenport, 2004).

V Rôles de l'apéline et de la vasopressine dans le maintien de l'équilibre hydrique

V.1 Effet aquarétique de l'apéline

V.1.1 Par un effet au niveau du cerveau

Comme il est établi depuis longtemps, les neurones neurosécrétoires magnocellulaires vasopressinergiques libèrent l'AVP, un peptide antidiurétique et vasoconstricteur, dans les capillaires fenestrés de la neurohypophyse en réponse aux variations d'osmolalité plasmatique et de volémie (Manning et al., 1977; Brownstein et al., 1980) ou sous l'action de différentes neurohormones dont l'Ang-II ou l'Ang-III et les peptides natriurétiques (Zini et al., 1996; Gouzènes et al., 1998). La co-localisation AVP/apéline dans les neurones magnocellulaires hypothalamiques et l'association étroite des récepteurs des deux peptides avec ces mêmes

neurones suggéraient l'existence d'une interaction entre ces deux peptides et la possibilité d'une réponse apélinergique aux stimuli osmotiques et volémiques. Ainsi, indépendamment du rétrocontrôle exercé par l'AVP, qui augmente sa propre libération par une action autocrine *via* ses récepteurs localisés sur les neurones vasopressinergiques (Gouzènes et al., 1998; Ludwig, 1998), l'apéline pourrait également moduler l'activité de ces neurones, et par conséquent la libération de l'AVP dans la circulation sanguine, en agissant sur ses récepteurs exprimés par les neurones vasopressinergiques. Cette hypothèse a été testée dans le modèle de la rate en lactation, chez laquelle une hyperactivité des neurones magnocellulaires vasopressinergiques a été observée (Poulain et al., 1977), afin de conserver au mieux l'eau de l'organisme pour une production optimale de lait maternel pour les nouveau-nés (Gimpl and Fahrenholz, 2001). Dans ce modèle, K17F, injectée dans le troisième ventricule, diminue l'activité électrique phasique des neurones vasopressinergiques, réduit la sécrétion d'AVP de l'hypophyse postérieure dans la circulation sanguine et entraîne une diurèse aqueuse (De Mota et al., 2004) (Figure 5).

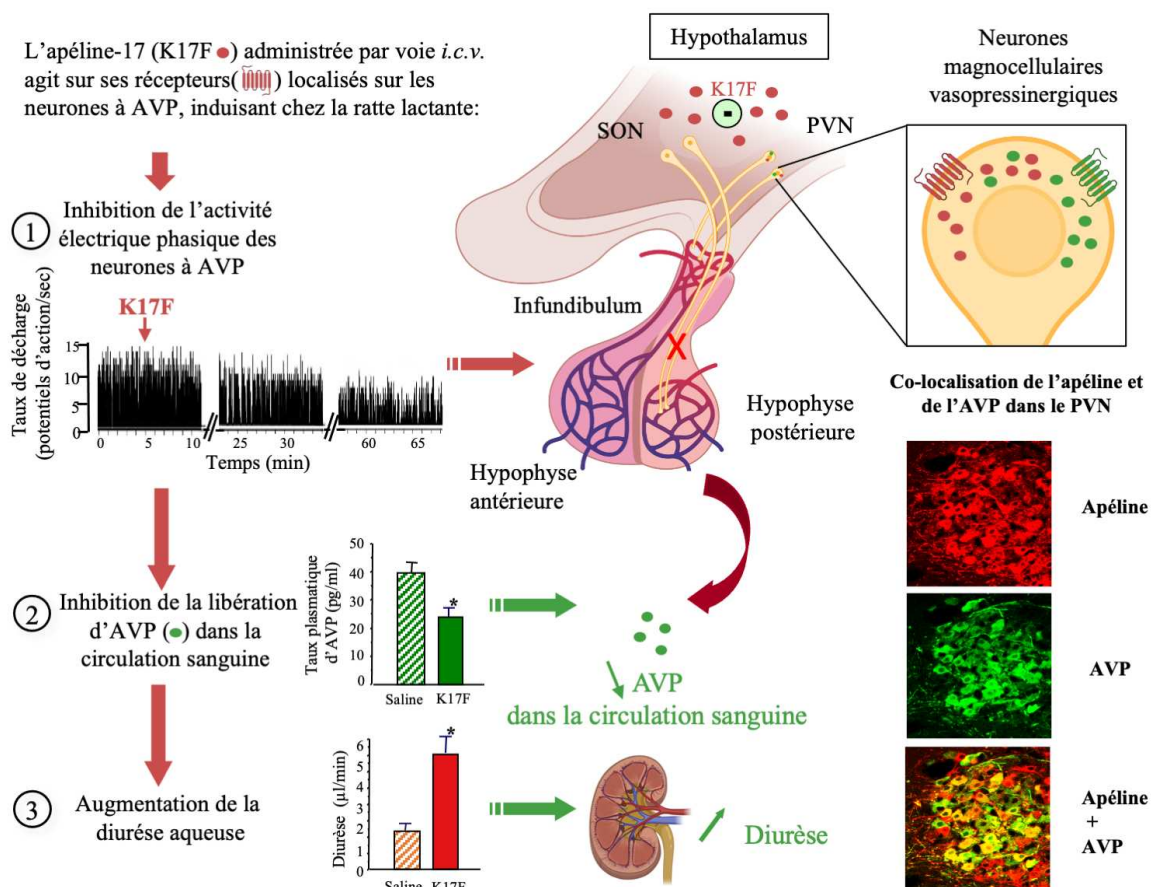


Figure 5 : Action centrale de l'apéline sur l'activité des neurones magnocellulaires vasopressinergiques, la libération systémique de la vasopressine (AVP) et la diurèse. L'apéline et son récepteur (en rouge) colocalisent avec l'AVP et son récepteur de type 1 (V1-R) (en vert) au sein des neurones magnocellulaires vasopressinergiques des noyaux paraventriculaire (PVN) et supraoptique (SON). Chez la rate en lactation, K17F administrée par voie

intracérébroventriculaire (*i.c.v.*) inhibe l'activité électrique phasique de ces neurones et la sécrétion de l'AVP de l'hypophyse postérieure dans la circulation sanguine, conduisant au niveau rénal à une augmentation de la diurèse aqueuse. Les images réalisées par microscopie confocale montrent la distribution de l'immunoréactivité de l'AVP et de l'apéline dans les corps cellulaires des neurones vasopressinergiques dans la partie magnocellulaire du PVN chez le rat. Une forte co-localisation de l'apéline (en rouge) et de la vasopressine (en vert) a été détectée dans les neurones vasopressinergiques du PVN. Les corps cellulaires présentant une double immunoréactivité apparaissent en jaune lors de la superposition des images. Adapté de (De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo et al., 2004).

De même, une réduction importante de la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine, est observée après injection par voie intracérébroventriculaire (*i.c.v.*) de K17F ou pE13F chez des souris déshydratées pendant 24 heures (Reaux et al., 2001), une condition qui entraîne, elle aussi, une hyperactivité des neurones vasopressinergiques. On peut conclure de ces résultats que l'apéline pourrait, comme l'AVP, être libérée au niveau somatodendritique et exercer un effet inhibiteur direct sur l'activité des neurones vasopressinergiques et la libération systémique d'AVP par une action autocrine *via* ses récepteurs localisés sur ces neurones. Par ce mécanisme, l'apéline jouerait donc le rôle d'inhibiteur naturel de l'effet antidiurétique de l'AVP.

V.1.2 Par un effet au niveau du rein

V.1.2.1 Généralités sur l'organisation du rein

Les reins sont localisés dans la partie postérieure de l'abdomen, de part et d'autre de la colonne vertébrale sous les dernières côtes. Les reins sont les organes qui assurent notamment la filtration du sang et la production de l'urine. C'est par l'artère rénale qu'arrive le sang jusqu'au rein, la filtration s'effectue au niveau du glomérule, et ressort par la veine rénale. L'urine primitive formée par cette filtration traverse le tubule, puis va s'évacuer par l'uretère dans la vessie.

Le rein se compose de plusieurs parties :

- La capsule rénale, un tissu fibreux qui entoure le corps du rein, sous la couche de graisse
- La zone corticale, situé juste au-dessous de la capsule rénale, où sont localisés les glomérules, les tubules contournés proximaux (TCP) et distaux (TCD) et le début du canal collecteur.
- La zone médullaire, la partie interne du rein, où sont localisés les anses de Henlé et la partie terminale des canaux collecteurs.
- Le bassinnet, une cavité située au centre de chaque rein où l'urine s'accumule.

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein, chaque rein en contient environ 400 à 800 000. Chaque néphron est constitué de deux parties, un glomérule et un tubule qui le suit. Le corpuscule de Malpighi qui comporte le glomérule, composé d'une artériole entourée par différents feuillettes (pariétal et viscéral) formant la capsule de Bowman. La vascularisation du glomérule est

effectuée par l'artériole glomérulaire afférente, et se résout en 5 ou 6 artérioles qui donnent naissance à une vingtaine d'anses capillaires, elles sont finalement reprises par l'artériole glomérulaire efférente. C'est là où va s'effectuer la première étape de l'élaboration de l'urine, par la formation de l'ultrafiltrat glomérulaire (urine primitive). L'eau et des constituants du plasma vont passer à travers la barrière de filtration glomérulaire, en séparant le plasma de la chambre urinaire, par des phénomènes de convection et de diffusion, sous l'effet de la pression hydrostatique et de la pression oncotique.

Le prolongement de la capsule de Bowman se fait par le tubule qui est composé de différents segments spécialisés qui vont permettre de modifier la composition de l'ultrafiltrat glomérulaire. Cette traversée tubulaire va s'effectuer par le TCP, puis l'anse de Henlé (branche descendante et branche ascendante), le TCD et le canal collecteur. L'urine ainsi formée va se déverser des canaux collecteurs dans les papilles, puis dans les calices qui se jettent dans le pyélon, qui est lui-même relié à l'uretère pour terminer dans la vessie.

En plus de ses fonctions métaboliques dans la régulation de l'équilibre hydrique et électrolytique, de l'élimination des produits métaboliques et de la régulation de la volémie, le rein assure également une fonction endocrine. De nombreuses substances à activité biologique sont synthétisées dans le rein comme l'érythropoïétine (EPO), le calcitriol (la forme active de la vitamine D), la rénine et l'endothéline. Le rein joue également un rôle dans la régulation de la PA par des modulation hémodynamiques, notamment *via* la production de rénine enzyme limitante dans la production d'angiotensine I, à l'origine de l'Ang-II, le peptide actif du système rénine-angiotensine (SRA) systémique.

V.1.2.2 Régulation de l'homéostasie hydro-sodée

Chaque jour, les glomérules produisent environ 180 litres d'ultrafiltrat, ce qui correspond au débit de filtration glomérulaire (DFG), pour un débit urinaire final d'environ 1 à 2 litres d'urine par jour. Ainsi, la majeure partie de l'ultrafiltrat glomérulaire est réabsorbée par le tubule pendant le transit de l'urine primitive, depuis le glomérule vers le système excréteur. Le tubule rénal joue donc un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre hydrique et de la volémie, permettant notamment l'élimination et la réabsorption d'eau libre et du sodium. La quantité d'eau dans un secteur est étroitement liée à la concentration de solutés le composant et ne diffusant pas librement dans le secteur adjacent. Ce sont les osmoles, leur concentration est appelée osmolarité quand elle est rapportée à 1 litre de plasma et osmolalité quand elle est rapportée à 1 kilogramme d'eau. L'osmolalité plasmatique est un des paramètres physiologiques les plus rapidement

régulés, ce qui va permettre de maintenir une osmolalité identique entre les milieux intra- et extracellulaire en permanence, indépendamment des apports en eau et en sel.

A l'état d'équilibre, l'osmolalité est identique entre le compartiment extracellulaire et le compartiment intracellulaire et égale à environ 285 mOsm/kg d'eau. Lors d'apports alimentaires comportant un apport de sodium et d'apport hydrique, le sodium ainsi que l'eau vont modifier l'osmolalité plasmatique et la volémie. Le rein va permettre de maintenir l'osmolalité entre les compartiments intra- et extracellulaires à l'équilibre, ainsi que la volémie, en modulant l'élimination de sodium et d'eau.

V.1.2.3 Réabsorption du sodium et de l'eau par le rein

La formation de l'urine définitive va s'effectuer tous au long de la traversée tubulaire par une succession de phénomènes d'échanges de solvant ou de solutés entre l'ultrafiltrat glomérulaire et le capillaire péri-tubulaire, à travers des épithéliums spécialisés (Figure 6). Tout au long de cette traversée, la réabsorption du sodium va servir de « force motrice » à la réabsorption ou la sécrétion d'autres électrolytes et métabolites, et constituer la majeure partie de la consommation en énergie du rein. La réabsorption du sodium se fait tout au long de la traversée tubulaire, 2/3 de l'eau filtrée par le glomérule est réabsorbée pendant la traversée du TCP et 2/3 du sodium filtré est également réabsorbé, ce qui définit le caractère iso-osmotique obligatoire de la réabsorption hydrosodée dans le TCP. D'autres solutés vont être réabsorbés dans le TCP comme le glucose, les acides aminés ainsi que les bicarbonates et le phosphate (de façon couplée au sodium).

Le fluide tubulaire va, par la suite, passer dans l'anse de Henlé qui est composée d'une branche descendante puis d'une branche ascendante, et dans laquelle il existe une réabsorption découplée du sodium et de l'eau (Figure 6). La branche descendante est perméable à l'eau et imperméable au sodium et au chlore, permettant, par un gradient osmolaire dans la médullaire rénale, une augmentation de l'osmolarité urinaire (donc une concentration des urines) par une réabsorption de l'eau. La branche large ascendante de l'anse de Henlé est, elle, imperméable à l'eau et perméable aux ions, ce qui va entraîner une réabsorption active du sodium, du chlore et du potassium. Cela permet une réabsorption des ions, ce qui va entraîner une diminution de l'osmolarité urinaire (donc une dilution des urines). Ainsi, à la fin de l'anse de Henlé, 25% supplémentaires de la charge filtrée en sodium et en eau ont été réabsorbés.

Dans le TCD, l'osmolarité du fluide tubulaire va diminuer pour atteindre sa valeur minimale soit 60 mOsmol/L. Il est imperméable à l'eau et permet la réabsorption du sodium et du chlore (6-8%) ce qui va entraîner une dilution des urines.

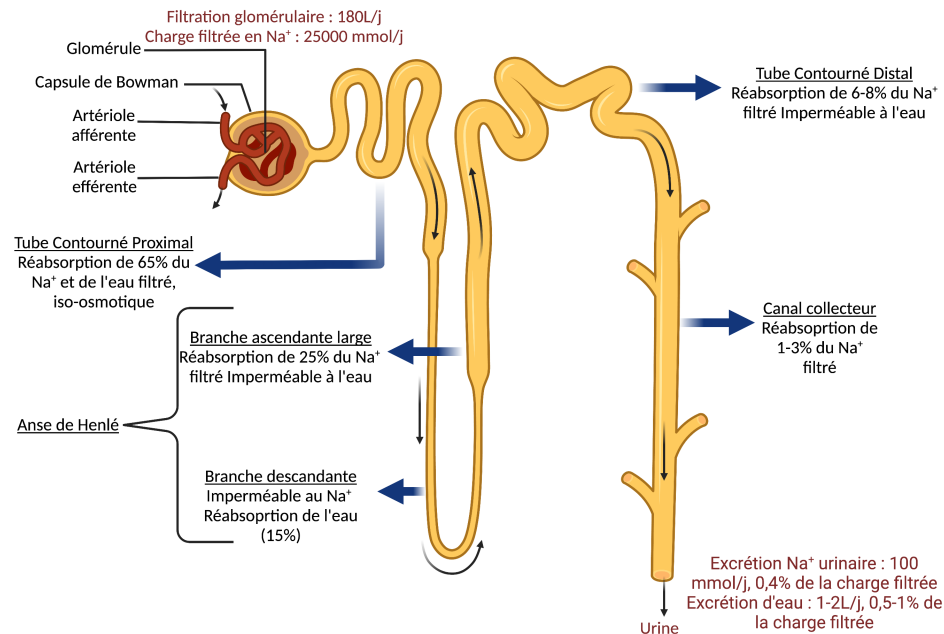


Figure 6 : Organisation fonctionnelle du néphron. Schéma représentant les sites de réabsorption de l'eau et du sodium au niveau des différents segments du néphron.

Le canal collecteur est lui composé de deux types cellulaires : les cellules principales et les cellules intercalaires. Les cellules intercalaires sont responsables de l'équilibre acido-basique (réabsorption des bicarbonates, sécrétion de protons) et de la réabsorption du potassium. Les cellules principales permettent la réabsorption de sodium et la sécrétion de potassium sous l'effet de l'aldostérone, et la réabsorption d'eau sous l'effet de l'AVP et de l'apéline.

La concentration des urines, la sécrétion de potassium, l'acidification des urines et la réabsorption du sodium vont être sous la dépendance de diverses influences hormonales. La réabsorption du sodium, couplée à la sécrétion de potassium dans le canal collecteur, est assurée par le canal sodium (ENaC), stimulé par l'aldostérone. La réabsorption de l'eau permettant l'ajustement de l'osmolalité finale de l'urine est sous la dépendance de l'AVP, *via* son action sur le récepteur V2-R, et de l'apéline, comme cela est discuté dans ce manuscrit. La position distale du canal collecteur lui confère un rôle essentiel dans la régulation de l'équilibre hydro-sodée et l'équilibre acido-basique.

V.1.2.4 Rappel du mécanisme d'action de l'AVP pour induire un effet anti-diurétique dans le canal collecteur

Le canal collecteur est connu pour être le site de l'action antidiurétique de l'AVP (Terada et al., 1993; Morello and Bichet, 2001). En effet, l'AVP dans ce segment, en stimulant les V2-R, induit une augmentation de la production d'AMPC et active la PKA qui phosphoryle le canal perméable à l'eau, l'AQP2. Cela se traduit par l'insertion des AQP2 phosphorylées au niveau de la membrane apicale des cellules principales du canal collecteur (Nielsen et al., 1995; Sands et al., 1997), conduisant à une réabsorption d'eau dans les cellules puis dans la circulation sanguine. Ce mécanisme va ainsi diminuer la diurèse et augmenter l'osmolalité urinaire.

V.1.2.5 Effet aquarétique de l'apéline via une action dans le canal collecteur

La présence des ARNm de l'apéline-R le long du canal collecteur suggère que l'apéline pourrait agir comme un peptide aquarétique non seulement par une action centrale, mais aussi par une action directe au niveau du rein.

En accord avec cette hypothèse, dans le canal collecteur, K17F inhibe la production d'AMPC induite par la 1-Desamino-8-D-Arginine vasopressine (dDAVP), un agoniste spécifique et sélectif du V2-R (Hus-Citharel et al., 2014). De plus, l'administration par voie *i.v.* de K17F chez la rate en lactation, induit une diminution significative de l'immunomarquage AQP2 à la membrane apicale du canal collecteur avec un gradient cortico-médullaire (Hus-Citharel et al., 2014) (Figure 7). Finalement, K17F administrée par voie *i.v.* en doses croissantes chez des rates en lactation (Hus-Citharel et al., 2008) ou l'apéline-13 administrée en continu pendant 24 heures par voie *i.v.* chez des rats mâles Sprague-Dawley (Murza et al., 2016) augmente fortement la diurèse de manière dose-dépendante. Simultanément une diminution significative de l'osmolalité urinaire, sans changement de l'excrétion de sodium et de potassium a été observée.

L'ensemble de ces données suggère que l'apéline pourrait agir comme un peptide aquarétique par une action directe sur le canal collecteur. Ces données ont été récemment renforcées par les travaux de Boulkeroua *et coll.* (Boulkeroua et al., 2019) qui ont observé dans une lignée cellulaire de canal collecteur corticale de souris hautement différenciée (mpkCCD) exprimant le V2-R, l'apéline-R et l'AQP2, que l'application de l'apéline-13 sur ces cellules diminue la phosphorylation et l'expression à la membrane apicale de l'AQP2 induite par la dDAVP après 30 à 60 min de traitement, et diminue l'expression de l'ARNm de l'AQP2 induite par la dDAVP après 8 à 24 heures de traitement. Plus récemment, une autre étude a montré l'action diurétique de pE13F qui impliquerait la voie AMPC/PKA/récepteur soluble de la prorénine dans le canal

collecteur (Chen et al., 2021). Ainsi, l'effet aquarétique de l'apéline implique, non seulement une action centrale, mais aussi une action directe au niveau des reins en neutralisant l'effet antidiurétique de l'AVP survenant *via* le V2-R dans le canal collecteur (Figure 7).

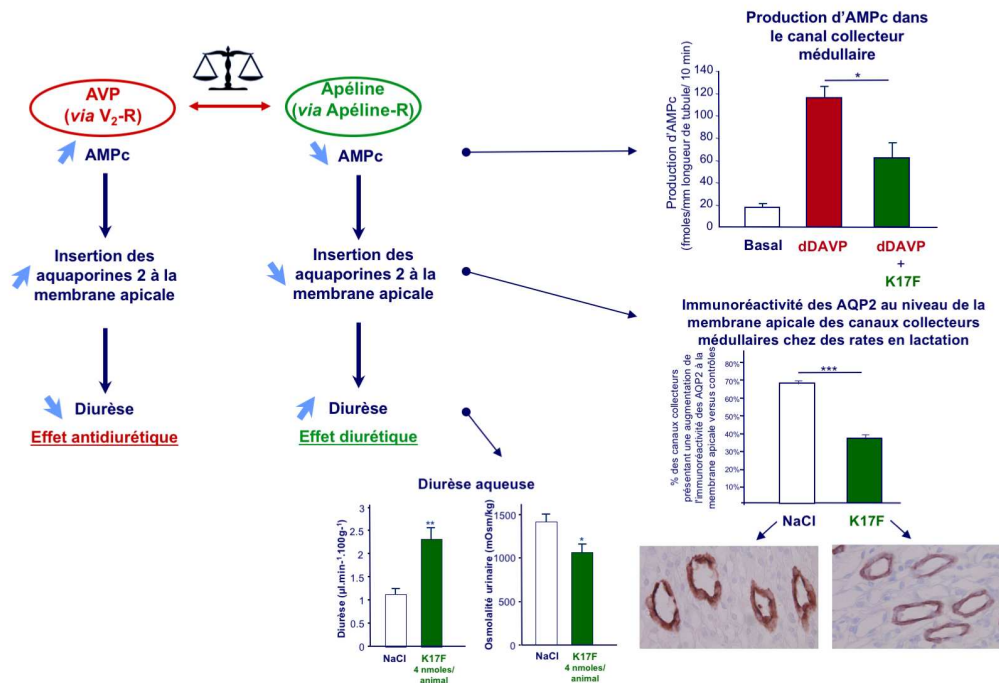


Figure 7 : L'apéline inhibe l'effet antidiurétique de la vasopressine au niveau rénal dans les cellules principales du canal collecteur. L'AVP se lie au récepteur V2 (V2R) localisé dans les cellules principales du canal collecteur, et stimule l'adénylate cyclase (AC) via le couplage du V2-R à la protéine Gs et augmente la production d'AMPc. Il en résulte une augmentation de l'activité de la protéine kinase A (PKA), induisant l'insertion des aquaporines de type 2 (AQP2) à la membrane apicale. La réabsorption de l'eau (H₂O) est permise par les AQP2 au niveau de la membrane apicale ce qui entraîne simultanément une diminution de la diurèse et une augmentation de la concentration de l'urine. L'apéline en se liant à l'Apéline-R présent dans les cellules principales du canal collecteur, inhibe l'AC via le couplage de l'Apéline-R à la protéine Gi et diminue la production d'AMPc induite par la dDAVP, un agoniste du V2-R et l'activité de la PKA. Il en résulte une diminution de l'insertion des AQP2 au niveau de la membrane apicale, entraînant une diminution de la réabsorption d'eau et par conséquent une augmentation de la diurèse et une diminution de l'osmolalité urinaire. Adapté de (Hus-Citharel et al., 2014).

V.1.2.6 Effet aquarétique de l'apéline via une action sur le flux sanguin rénal

De plus, les ARNms de l'Apéline-R ont également été détectés dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des artérioles glomérulaires (Hus-Citharel et al., 2008). L'application de l'apéline sur ces artérioles préalablement contractées par l'Ang-II induit une vasorelaxation. Cet effet vasodilatateur de l'apéline est NO-dépendant et directement lié à une inhibition par ce peptide de l'augmentation du [Ca²⁺]_i induite par l'Ang-II (Hus-Citharel et al., 2008). L'expression des Apéline-Rs dans les glomérules et les artérioles glomérulaires ainsi que l'effet vasodilatateur de l'apéline au niveau des artérioles efférentes de type musculaire qui vont

donner naissance aux *vasa recta*, suggèrent fortement que l'apéline en se fixant sur ses récepteurs localisés dans ces structures provoque une augmentation du débit sanguin rénal, ce qui participe également à l'augmentation de la diurèse induite par l'apéline. D'autre part, l'inhibition par l'apéline de l'effet vasoconstricteur induit par l'Ang-II dans les artérioles glomérulaires conforte les effets opposés du système apélinergique et du SRA systémique sur la PA, comme nous le verrons plus tard (Ishida et al., 2004).

L'ensemble de ces données souligne le rôle crucial de l'apéline dans le maintien de l'équilibre hydrique en agissant, non seulement au niveau central *via* une inhibition de la libération de l'AVP par l'hypophyse postérieure dans la circulation sanguine, mais aussi directement au niveau rénal, en bloquant l'effet antidiurétique de l'AVP dans le canal collecteur médié par le V2-R et en augmentant le flux sanguin rénal.

V.2 Rôles de l'apéline et de la vasopressine dans le maintien de l'équilibre hydrique

V.2.1 Chez le rat

La colocalisation AVP/apéline et de leurs récepteurs (V1-R et Apéline-R) au sein des neurones magnocellulaires vasopressinergiques et leurs actions opposées sur la diurèse ont conduit à caractériser la régulation de ces peptides dans le cadre du maintien de l'équilibre hydrique. Chez le rat déshydraté pendant 24 heures, l'hyperactivité des neurones vasopressinergiques s'accompagne d'une augmentation concomitante de la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine et d'une diminution des taux circulants d'apéline (De Mota et al., 2004). Parallèlement, il a été montré par une approche d'immunohistochimie quantitative, une augmentation du contenu neuronal en apéline dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques du PVN et du SON alors que le contenu neuronal en AVP diminuait fortement malgré une synthèse accrue (Reaux-Le Goazigo et al., 2004). Ceci montrait que la déshydratation entraîne une régulation opposée de l'apéline et de l'AVP. Il est bien établi que, lors d'une déshydratation, la libération de l'AVP est non seulement augmentée dans la circulation sanguine mais aussi au niveau somato-dendritique et l'AVP, en stimulant ses autorécepteurs V1-R exprimés par les neurones magnocellulaires vasopressinergiques, augmente sa propre libération dans la circulation sanguine. A l'inverse, l'apéline s'accumule dans ces mêmes neurones au lieu d'être libérée et, de ce fait, ne peut exercer son effet inhibiteur sur la libération d'AVP, ce qui a pour conséquence d'augmenter la libération de l'AVP dans la circulation sanguine. Cette conclusion est en accord

avec les observations suivantes : l'augmentation du contenu neuronal en apéline, observée chez les animaux déshydratés, est inhibée par l'administration par voie *i.c.v.* d'un antagoniste sélectif des V1-R et est mimée par une administration par voie *i.c.v.* d'AVP (De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo et al., 2004). Ceci suggère que l'augmentation du contenu neuronal en apéline est due à l'augmentation de la libération somato-dendritique d'AVP secondaire à la déshydratation. Cette interprétation implique que l'apéline et l'AVP soient libérées de façon différentielle par les neurones magnocellulaires vasopressinergiques dans lesquels elles sont co-localisées. En accord avec cette hypothèse, des études de double marquage en microscopie confocale ont montré que les deux peptides se retrouvent en grande partie dans des granules neurosécrétoires, de taille et de distribution distinctes, dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques (De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo et al., 2004) (Figure 5).

Ainsi, l'ensemble de ces données démontre que lors d'une déshydratation, l'apéline et l'AVP jouent un rôle complémentaire dans le maintien de l'équilibre hydrique. Alors que l'augmentation de libération somato-dendritique de l'AVP optimise l'activité électrique phasique des neurones vasopressinergiques (Gouzènes et al., 1998; Ludwig, 1998), facilitant la sécrétion de l'AVP dans la circulation sanguine, l'apéline s'accumule dans ces neurones au lieu d'être libérée dans la circulation sanguine, provoquant ainsi une diminution de l'inhibition qu'elle exerce sur les neurones vasopressinergiques (De Mota et al., 2004). La régulation opposée apéline/AVP lors de la déshydratation a pour conséquence d'optimiser la libération de l'AVP dans la circulation sanguine. L'AVP en stimulant les V2-R présents dans les cellules principales du canal collecteur, augmente l'insertion des AQP2 à la membrane apicale et diminue la diurèse, évitant ainsi une perte additionnelle d'eau au niveau des reins pour faire face à la déshydratation (Figures 7 et 9).

V.2.2 Chez l'homme

Cette régulation croisée de l'apéline et de l'AVP suite à une stimulation osmotique a également été aussi observée chez l'Homme (Azizi et al., 2008). Dans cette étude, 10 volontaires sains de sexe masculin ont été soumis, soit à une restriction hydrique de 12 heures suivie d'une perfusion de soluté salé hypertonique afin d'augmenter l'osmolalité plasmatique, soit à une charge hydrique par voie orale afin de diminuer l'osmolalité plasmatique. L'augmentation de l'osmolalité plasmatique s'accompagne d'une baisse des taux d'apéline dans le plasma alors que ceux d'AVP augmentent de façon linéaire. A l'inverse, la diminution de l'osmolalité plasmatique produit une réduction de la concentration plasmatique d'AVP et induit une rapide élévation de la

concentration plasmatique d'apéline (Figure 8). Ces résultats montrent pour la première fois chez l'Homme une régulation de l'apéline par les stimuli osmotiques, de plus cette régulation est opposée à celle de l'AVP (Figure 8). Ceci suggère que l'apéline, comme l'AVP, joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre hydrique chez l'Homme comme chez le rongeur.

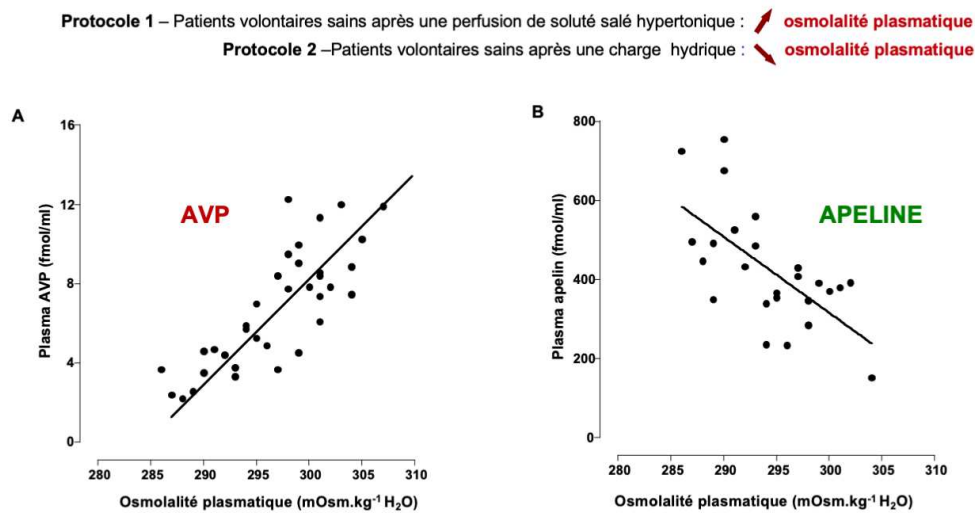


Figure 8 : Corrélations linéaires entre les concentrations plasmatiques d'AVP et d'apéline et l'osmolalité plasmatique. (A) entre la concentration plasmatique d'AVP et l'osmolalité plasmatique ; (B) entre la concentration plasmatique d'apéline et l'osmolalité plasmatique chez des patients volontaires sains après une perfusion de soluté salé hypertonique ou une charge hydrique. L'AVP et l'apéline plasmatiques sont régulées de façon opposée par les stimuli osmotiques chez l'homme. Adapté de (Azizi et al., 2008).

En résumé les expériences menées chez le rongeur et les études cliniques réalisées chez des volontaires sains ont montré que l'apéline et l'AVP pourraient être considérés comme le Yin et le Yang de l'équilibre hydrique de l'organisme (Figure 9).

Sur cette figure, dans les conditions physiologiques, l'apéline (en vert) et l'AVP (en violet) sont libérées des neurones magnocellulaires vasopressinergiques à des niveaux appropriés pour assurer la réabsorption d'eau adéquate et le volume d'urine produit est normal. Dans le canal collecteur du rein, l'AVP agit sur les V2-R pour augmenter la production d'AMPc et l'insertion de l'AQP2 à la membrane apicale, conduisant à la réabsorption d'eau. A l'inverse, l'apéline, par son action sur l'Apéline-R, a un effet opposé permettant de maintenir l'équilibre hydrique. Lors d'une déshydratation, les neurones vasopressinergiques sont fortement activés et l'AVP est libérée en masse dans la circulation sanguine plus rapidement qu'elle n'est synthétisée, entraînant une diminution du contenu neuronal en AVP, tandis que l'apéline s'accumule dans les mêmes neurones plutôt que d'être libérée et de ce fait, l'apéline ne peut plus exercer son effet inhibiteur sur la libération de l'AVP. Ceci aboutit à une hyperstimulation des V2-R dans le canal collecteur

et à une augmentation de l'insertion des AQP2 à la membrane apicale, conduisant à la réabsorption d'eau et à une diminution de la diurèse pour faire face à la déshydratation. En revanche, lors d'une charge hydrique, l'activité des neurones magnocellulaires vasopressinergiques est inhibée, ce qui diminue la libération de l'AVP dans la circulation sanguine et entraîne une accumulation du contenu neuronal en AVP. A l'inverse, la libération d'apéline dans la circulation sanguine augmente rapidement. Ceci aboutit à une hyperstimulation des Apéline-R dans le canal collecteur et à une diminution de l'insertion des AQP2 à la membrane apicale, conduisant à une augmentation de la diurèse pour faire face à la charge hydrique

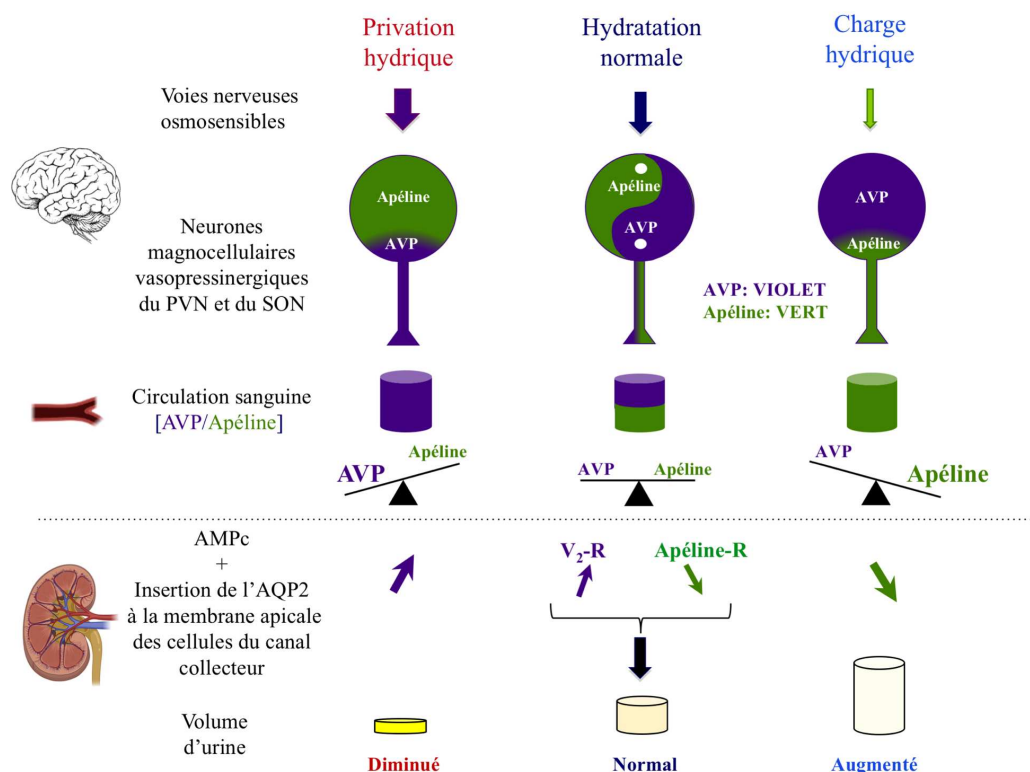


Figure 9 : L'apéline et l'AVP : le Yin et le Yang de l'équilibre hydrique. Adapté de (Llorens-Cortes and Moos, 2012).

V.2.3 Effets de l'apéline sur le comportement dipsique

En accord avec un rôle de l'apéline dans la régulation de l'équilibre hydrique qui dépend, non seulement de la sécrétion d'AVP et de son action au niveau rénal, mais aussi de la régulation de la soif et de la prise de sel (Denton et al., 1996), des fibres et des terminaisons apélinergiques ont été visualisées dans les structures cérébrales contrôlant le comportement dipsique (la lamina terminalis localisé le long du troisième ventricule et qui comprend le SFO, l'OVLT et le noyau médian préoptique) (Reaux et al., 2002). De plus, il a été montré que l'injection d'apéline par

voie *i.c.v.* chez le rat déshydraté pendant 24 heures réduisait la quantité d'eau ingérée (Reaux et al., 2001). Une autre étude a été réalisée chez le rat susceptible de devenir obèse lorsqu'il est soumis à un régime riche en graisses (High Fat Diet, HFD). Chez cet animal nourri avec une alimentation standard, l'injection d'apéline par voie *i.c.v.* diminue la quantité d'eau ingérée, alors que l'effet disparaît lorsque l'animal est soumis à un régime HFD (Clarke et al., 2009). Cette réponse pourrait être liée à une modification de l'expression de l'ARNm de l'Apéline-R observée chez le rat obèse. De plus, chez les souris déficientes pour l'Apéline-R ayant accès à une eau de boisson hypertonique (2% de sel dans l'eau de boisson), la quantité d'eau ingérée est significativement supérieure à celle mesurée chez les souris sauvages soumises au même régime (Roberts et al., 2010). Ceci confirme l'importance du récepteur de l'Apéline-R dans le contrôle de l'équilibre hydrique.

Ainsi, l'influence de l'apéline sur la diurèse (*via* une action centrale et rénale) de même que celle qu'elle exerce sur le comportement dipsique pourraient contribuer à une régulation fine des pertes hydriques, régulation dont l'importance physiologique pourrait être plus ou moins variable en fonction de l'état physiopathologique de l'organisme.

V.3 Régulation des taux circulants d'apéline et de vasopressine dans différentes pathologies où une altération de la balance hydrique et une hyponatrémie sont observées

V.3.1 Hyponatrémie : définitions, causes

L'hyponatrémie, définie par une concentration plasmatique de sodium inférieure à 135 mmol/L. L'hyponatrémie est le trouble électrolytique le plus courant, avec une prévalence de 20% à 35% chez les patients hospitalisés, très fréquente chez les personnes âgées, L'hyponatrémie peut être liée à une augmentation des taux de vasopressine (hormone anti-diurétique) dans le sang qui entraîne au niveau des reins une réabsorption d'eau, diminuant la diurèse. Cette augmentation de vasopressine peut être inappropriée (syndrome d'antidiurèse inapproprié, SIAD) ou consécutive à une diminution du volume circulant (insuffisance cardiaque, cirrhose) (Ellison and Berl, 2007). L'hyponatrémie est importante à reconnaître car elle est associée à une mortalité élevée (Kim et al., 2008; Waikar et al., 2009; Kovesdy et al., 2012) et parce qu'elle peut être le marqueur d'une maladie sous-jacente.

V.3.2 Variation de la balance apéline-vasopressine dans les pathologies présentant une hyponatrémie

V.3.2.1 Le syndrome d'antidiurèse inapproprié

Le SIAD précédemment désigné comme le syndrome de sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique (SIADH) est la cause la plus fréquente d'hyponatrémie. De nombreuses affections cliniques peuvent provoquer un SIAD et parmi elles des tumeurs, qui peuvent sécréter de l'AVP par voie ectopique, des troubles du système nerveux central et des maladies pulmonaires. Un certain nombre de médicaments peuvent également induire un SIAD, en augmentant la sécrétion d'AVP comme les antidépresseurs tricycliques, les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, les opiacés, et/ou en potentialisant son effet comme la carbamazépine, la chlorpropamide ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Peri, 2019). Dans le SIAD, les taux plasmatiques d'AVP sont anormalement élevés par rapport à l'osmolalité plasmatique (Ellison and Berl, 2007). En agissant sur les V2-Rs présents dans le rein au niveau des canaux collecteurs, cette concentration accrue d'AVP va augmenter la production d'AMPc, conduisant à une insertion plus importante des AQP2 à la membrane apicale, entraînant une réabsorption d'eau plus élevée, une diminution de la diurèse et une hyponatrémie. L'hyponatrémie provoque l'entrée d'eau dans les cellules en raison d'une hypo-osmolalité plasmatique (état hypotonique) (Verbalis et al., 2013). Les symptômes sont principalement liés à l'hypertrophie des cellules du système nerveux central et leur gravité dépend de la concentration sérique de sodium. Des symptômes graves, tels que coma, convulsions, arrêt respiratoire, sont généralement associés à une hyponatrémie aiguë mettant la vie en danger. Des symptômes moins sévères tels que maux de tête, irritabilité, nausées/vomissements, ralentissement mental, confusion, désorientation sont observés dans l'hyponatrémie chronique (Verbalis, 2019). Étant donné la régulation opposée des taux plasmatiques d'apéline et d'AVP par les stimuli osmotiques chez des sujets sains, la réponse de l'apéline au défaut d'osmorégulation de l'AVP dans le SIAD a été étudiée (Blanchard et al., 2013). Chez l'homme, les taux circulants de copeptine sont souvent évalués et représentent un bon indicateur de la libération de l'AVP dans la circulation sanguine (Morgenthaler et al., 2008). En effet, la copeptine est un peptide issu du même précurseur que l'AVP, la préproAVP, elle est moins rapidement dégradée que l'AVP et de plus, il existe un rapport stœchiométrique entre les taux d'AVP et ceux de copeptine libérés dans la circulation sanguine. Chez les patients SIAD, les taux plasmatiques d'apéline et de copeptine, ajustés en fonction du sexe et de l'âge, sont augmentés de 26 % et 75 % respectivement par rapport à ceux mesurés chez des sujets sains (Blanchard et al., 2013). Chez 86 % des patients atteints de SIAD, le rapport apéline/copeptine plasmatique est en dehors de la fourchette prédite, mettant en évidence le défaut osmorégulateur

primaire chez ces patients. Le rapport apéline/AVP anormal contribue à la rétention d'eau chez les patients hyponatrémiques SIAD (Blanchard et al., 2013). Il a donc été émise l'hypothèse que l'activation de l'Apéline-R par un agoniste de ce récepteur pourrait contrecarrer la réabsorption d'eau induite par l'AVP et corriger l'hyponatrémie.

V.3.2.2 Insuffisance cardiaque

L'hyponatrémie chez les patients atteints d'IC peut être multifactorielle. Les principaux mécanismes de l'hyponatrémie dans l'IC sont :

- une activation neurohormonale adaptative, avec un rôle prépondérant de l'AVP, ce qui entraîne un état de dilution du sodium sanguin.
- Une stimulation de la soif due à un faible débit cardiaque et à l'Ang-II
- Une rétention de l'eau libre dans le cadre d'un DFG réduit.

Selon la population de patients, la prévalence de l'hyponatrémie chez les patients atteints d'IC varie entre 11 et 27 % (Adrogue and Madias, 2000; Gheorghide et al., 2007; Dunlap et al., 2017) et l'hyponatrémie a été associée à une augmentation des complications liées à l'IC et une diminution de la survie (Verbrugge et al., 2015). Chez les patients atteints d'IC, la réduction du débit cardiaque et de la volémie efficace induit une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) systémique (Oster et al., 1994; Ambrosy et al., 2014) qui entraîne une vasoconstriction périphérique et une rétention d'eau et de sodium. De plus, les taux d'Ang-II circulants, qui sont augmentés, pénètrent les organes circumventriculaires (qui contiennent des capillaires fenestrés) comme le SFO ou l'OVLT, et stimulent les AT1-R présents dans ces structures, provoquant une hyperactivité du SRA cérébral (Leenen et al., 2020). Cette hyperactivité du SRA cérébral est responsable de l'hyperactivité sympathique, de l'augmentation de la libération de l'AVP dans la circulation sanguine et de l'augmentation du comportement dipsique.

La libération accrue de l'AVP entraîne une augmentation de la perméabilité à l'eau dans les canaux collecteurs, une augmentation de la rétention d'eau libre et de l'hyponatrémie observées chez les patients souffrant d'IC. (Oren, 2005). Les patients atteints d'une IC sévère présentent des taux plasmatiques d'AVP supérieurs à ceux mesurés chez des volontaires sains (Uretsky et al., 1985) et qui ne diminuent pas de manière appropriée avec une charge hydrique (Goldsmith et al., 1986; Filippatos and Elisaf, 2013). Les patients atteints d'IC et hyponatrémiques présentent non seulement une production accrue d'AVP mais aussi une dérégulation de l'AVP caractérisée par une élévation de ses niveaux malgré la présence d'une surcharge volumique, d'une distension auriculaire et d'une faible osmolalité plasmatique (Kalra et al., 2001; Lee et al., 2003).

Finalement, chez les patients atteints d'IC, notre laboratoire, en collaboration avec le CIC de l'hôpital Européen Georges Pompidou, a montré que le rapport apéline/copeptine plasmatique était significativement diminué (-57%) comparativement aux sujets sains, conséquence de l'hyperactivation de la sécrétion d'AVP (Blanchard et al., 2013). Ceci suggère que l'augmentation de la sécrétion d'apéline chez les patients atteints d'IC est inappropriée et ne peut contrebalancer la surproduction d'AVP, contribuant à un métabolisme anormal de l'eau, à la rétention hydrique et à l'hyponatrémie observées chez ces patients.

V.3.2.3 Cirrhose hépatique

L'hyponatrémie est fréquemment observée chez les patients présentant une ascite secondaire à une cirrhose avancée et à une hypertension portale. Lors de la progression de la cirrhose et de l'hypertension portale, il va y avoir une vasodilatation splanchnique, ce qui va conduire à l'activation de mécanismes compensatoires similaires à ceux mobilisés pendant l'IC tels que le SRAA, le système nerveux sympathique et la sécrétion d'AVP pour augmenter la volémie (John and Thuluvath, 2015). Cela va entraîner une vasoconstriction ainsi qu'une rétention hydro-sodée, il va être observé une hyperhydratation globale (excès d'eau et de sodium avec excès d'eau supérieur à l'excès de sodium) et le développement d'une ascite. Dans moins de 10% des cas observés, l'hyponatrémie est due à une utilisation excessive de diurétiques ou à des pertes gastro-intestinales telles que des diarrhées (hyponatrémie hypovolémique) (Attar, 2019). L'hyponatrémie chez les patients cirrhotiques est principalement hypervolémique, elle est attribuée à l'incapacité des reins à éliminer l'eau sans soluté, ce qui entraîne une accumulation disproportionnée d'eau par rapport au sodium (Ginés et al., 1998). La gestion de l'hyponatrémie dans ce contexte est un défi car les traitements conventionnels de l'hyponatrémie, y compris la restriction hydrique et la correction de l'hypokaliémie, sont souvent inefficaces dans le cadre d'une cirrhose hépatique avancée.

Chez les patients atteints d'une cirrhose hépatique une augmentation des taux circulants d'AVP qui aggravent la rétention d'eau et l'hyponatrémie a été observée (Alukal et al., 2020). Dans une autre étude, les taux plasmatiques d'apéline chez ces patients sont diminués (Owen et al., 2021). Le rapport apéline/AVP n'a pas été déterminé car les mesures des taux d'AVP et d'apéline ont été effectués dans 2 études différentes. Cependant, dans notre laboratoire, en collaboration avec le CIC de l'HEGP, nous avons mesuré les taux d'apéline et d'AVP chez des patients atteints de cirrhose hépatique et hyponatrémiques. Nous avons observé une augmentation des taux d'AVP mais aucune modification des taux d'apéline circulants. Le rapport apéline/AVP était diminué (résultats non publiés). L'absence apparente de stimulation de l'apéline plasmatique chez ces

patients pourrait résulter de l'effet antagoniste de la stimulation osmotique et de l'inhibition hémodynamique.

V.3.3 Traitements de l'hyponatrémie

Diverses approches sont utilisées pour traiter l'hyponatrémie hypervolémique chronique, elles reposent sur la réduction de l'apport en eau libre et/ou l'augmentation de l'excrétion rénale d'eau libre. Il est d'abord privilégié de traiter l'origine de l'hyponatrémie (médicamenteuse ou la cause du SIAD). La restriction hydrique (<500 mL/j) est utile et permet de corriger progressivement sur plusieurs jours l'hyponatrémie. Mais si le trouble de dilution est très marqué (par une osmolalité urinaire très élevée), il peut être envisagé la prescription de diurétiques de l'anse (furosémide) permettant d'augmenter l'excrétion rénale d'eau libre. La combinaison de la restriction hydrique et de l'utilisation de diurétiques de l'anse constitue les traitements de première intention. Si ces approches ne sont pas suffisantes à la correction de l'hyponatrémie, le recours à un antagoniste spécifique du V2-R, le tolvaptan, peut être mis en place. Plusieurs essais cliniques ont montré que le tolvaptan était clairement efficace pour augmenter la natrémie plasmatique chez les patients souffrant d'hyponatrémie due au SIAD, à l'IC ou à la cirrhose hépatique (Schrier et al., 2006; Konstam et al., 2007; Berl et al., 2010).

Son utilisation est toutefois limitée du fait de son mode d'action qui entraîne un inconfort chez les patients (polyurie, polydipsie, nycturie) et de ses effets nocifs potentiels, notamment une correction excessive de l'hyponatrémie et une toxicité hépatique (Malhotra et al., 2014). Si l'hyponatrémie est corrigée trop rapidement, il existe un risque élevé de voir survenir une démyélinisation osmotique. La vitesse de correction doit donc être contrôlée rigoureusement, elle ne doit pas dépasser 10 mmol/L/j les premières heures et 8 mmol/L les 24 heures suivantes, donc 18 mmol/L lors des premières 48 heures. Tzoulis *et coll.*, ont observé après traitement par le tolvaptan (15 mg/ jour par voie orale) une correction excessive (>12 mmol/L/24 h) de la natrémie plasmatique chez 23% des patients avec une hyponatrémie résistante due à un SIAD (Tzoulis et al., 2016). Une démyélinisation osmotique a été signalé chez un patient atteint d'IC traité avec 15 mg de tolvaptan et des diurétiques, la natrémie plasmatique ayant brutalement augmenté de 126 à 142 mmol/L le premier jour puis jusqu'à 187 mmol/L les jours suivants (Malhotra et al., 2014).

Néanmoins, la principale indication du tolvaptan est dans le traitement de l'hyponatrémie chez les patients présentant un SIAD (Li et al., 2017), il a également été proposé comme option thérapeutique dans l'IC aigüe (Luo et al., 2020). D'autres études cliniques ont montré que son administration améliore les symptômes chez les patients souffrant d'IRC ou d'ascite réfractaire

(Sen et al., 2018; Bellos et al., 2020). Considérant les effets indésirables du tolvaptan, le développement de nouvelles classes thérapeutiques pourrait être utile pour le traitement de l'hyponatrémie.

VI Apéline et pression artérielle

Comme énuméré précédemment, l'apéline et son récepteur sont largement exprimés dans tout le système cardiovasculaire, ce qui a suscité un intérêt considérable pour le rôle du système apélinergique dans la régulation des fonctions cardiovasculaires (pour revue, (Mughal and O'Rourke, 2018)).

VI.1 Effets vasculaires de l'apéline

L'apéline a des effets vasomoteurs complexes, en effet différentes études ont montré que l'apéline peut provoquer soit une vasodilatation soit une vasoconstriction, en fonction de la présence ou de l'absence de l'endothélium vasculaire. Cette double action de l'apéline est attribuée à la présence de l'Apéline-R à la fois dans les cellules endothéliales et musculaires lisses de la paroi des vaisseaux sanguins.

Ex vivo, l'apéline-13 et pE13F entraînent une vasodilatation des artères et de veines de gros calibre (Maguire et al., 2009) et de plus petit calibre (Salcedo et al., 2007). D'autres expériences ont montré, sur des artères mammaires et des veines saphènes provenant de patients ayant subi un pontage aorto-coronarien, que plusieurs isoformes de l'apéline (l'apéline-13, l'apéline-36 et pE13F) provoquent une vasodilatation dose-dépendante (Maguire et al., 2009).

De plus, des expériences réalisées sur des artères d'origine humaine ou murine ont démontré le rôle du NO dans la vasodilatation induite par l'apéline. Chez l'Homme, la vasodilatation des artères mésentériques mais pas des artères hépatiques, a été atténuée en présence de L-NAME (un inhibiteur de la NOS) (Salcedo et al., 2007). Chez le rat, sur des artéριοles glomérulaires (Hus-Citharel et al., 2008) et des aortes microdisséquées (Gerbier et al., 2017) précontractées par l'Ang-II, l'effet vasodilatateur de K17F a été inhibé par le L-NAME. De plus, sur l'aorte de rat, l'apéline a provoqué une augmentation de l'activité de la eNOS et de la formation de NO, dépendante de la concentration et du temps d'application du peptide (Jia et al., 2007). Cela suggère que l'apéline produit une vasorelaxation endothélium-dépendante en stimulant la libération de NO. Dans les cellules endothéliales humaines, l'activation des voies mécanosensorielles par une contrainte de cisaillement augmente l'expression de l'Apéline-R et

la formation de l'apéline et du NO (Busch et al., 2015). Par ailleurs, l'apéline a atténué les contractions induites par l'Ang-II sur la veine porte de rat, mais l'effet de l'apéline n'a été que partiellement inhibé par la dénudation endothéliale, ce qui suggère que l'apéline peut agir *via* son récepteur présent sur l'endothélium mais aussi *via* son récepteur présent sur les cellules musculaires lisses pour provoquer une vasorelaxation (Gurzu et al., 2006). L'apéline peut également favoriser la vasodilatation par un mécanisme dépendant des prostanoides. L'application d'apéline sur des artères mammaires humaines induit une vasodilatation qui est abolie en présence d'indométacine, mais qui n'est pas modifiée en présence de L-NAME (Maguire et al., 2009). L'inhibition de l'activité de la cyclooxygénase par l'indométacine entraîne une réduction de la synthèse des prostacyclines (PGI₂), un puissant vasodilatateur. Il existe donc au moins deux mécanismes vasodilatateurs médiés par l'apéline : NO-dépendant et prostanoidé-dépendant.

Malgré les données existantes démontrant l'activité vasodilatatrice du système apélinergique, plusieurs études ont rapporté un effet vasoconstricteur de l'apéline dans certaines conditions physiopathologiques. En effet, lorsque l'apéline est appliquée sur des vaisseaux isolés dépourvus d'endothélium ou dans des conditions où les cellules endothéliales sont endommagées ou dysfonctionnelles, elle provoque une vasoconstriction. Ainsi, lorsque pE13F est appliqué sur des veines saphènes et des artères mammaires humaines dénudées de leur endothélium (Katugampola et al., 2001; Maguire et al., 2009), ainsi que sur des artères coronaires prélevées sur des patients atteints d'athérosclérose (Pitkin et al., 2010), elle entraîne une vasoconstriction. Les mécanismes moléculaires responsables de la vasoconstriction induite par l'apéline sont mal compris. Dans les cellules musculaires lisses de l'aorte thoracique chez la souris, l'apéline provoque une vasoconstriction en augmentant la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) (Hashimoto et al., 2006) ce qui constitue un mécanisme potentiel de la vasoconstriction médiée par l'apéline. Récemment une équipe a observé, dans un modèle de souris surexprimant l'Apéline-R dans les cellules musculaires lisses vasculaires, une vasoconstriction des artères coronaires induite par l'apéline. Cet effet a été significativement augmenté en présence d'un agoniste des récepteur α 1-adrénergiques (α 1-AR) et significativement diminué chez les souris déficientes en α 1-AR (Nagano et al., 2019). Ces résultats suggèrent qu'il existe une interaction entre l'Apéline-R présent dans les cellules musculaires lisses et l' α 1-AR, peut-être *via* une interaction entre leurs voies de signalisation ou *via* une hétérodimérisation entre ces deux récepteurs.

L'ensemble de ces données montre que, dans les conditions physiologiques en présence de vaisseaux intacts, l'apéline, en stimulant son récepteur présent sur les cellules endothéliales, provoque une vasodilatation des vaisseaux médié par le NO, mais en absence d'endothélium un effet vasoconstricteur est observé. Il est nécessaire d'améliorer notre compréhension des voies de signalisation de l'Apéline-R impliquées pour mieux comprendre ces effets fonctionnels opposés.

VI.2 Effets de l'apéline sur la pression artérielle chez le rat contrôle et chez le rat hypertendu

C'est dans les années 2000 que l'effet hypotenseur *in vivo* de l'apéline a été rapporté, lorsqu'il a été démontré que l'injection d'apéline par voie *i.v.*, chez le rat normotendu anesthésié, entraîne une réduction de la PA (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2001). Par la suite, dans le même modèle, il a été montré que l'effet hypotenseur de pE13F est inhibé par le L-NAME (Tatemoto et al., 2001). Les différentes formes moléculaires de l'apéline n'ont pas toutes le même effet sur la PA. Chez les rats normotendus anesthésiés, l'apéline-12 (correspondant à l'apéline-13 délétée de la glutamine N-terminale) est plus efficace pour réduire la PA moyenne que l'apéline-13 et l'apéline-36 (Tatemoto et al., 2001), tandis que K17F produit un effet hypotenseur plus important que l'apéline-13 et que K16P ne modifie pas la PA (El Messari et al., 2004).

Il a également été montré que l'apéline a des effets bénéfiques dans différents modèles expérimentaux d'hypertension. En effet, les niveaux d'expression de l'ARNm de la préproapéline et de l'Apéline-R sont réduits chez les rats hypertendus (Zhang et al., 2006; Akcilar et al., 2013). De plus, une baisse des taux plasmatiques d'apéline a été observée chez des patients hypertendus comparativement aux patients normotendus (Xie et al., 2017).

Chez le rat SHR (rat spontanément hypertendu, un modèle d'hypertension artérielle d'origine génétique) anesthésié, l'administration par voie *i.v.* d'apéline-13 entraîne une baisse plus marquée de la PA que chez le rat normotendu (Lee et al., 2005). Dans un modèle d'hypertension exacerbée par le sel (rats SHR soumis à un régime riche en sel), l'administration continue de pE13F à l'aide d'une pompe osmotique introduite par voie sous-cutanée (*s.c.*) pendant 6 semaines a entraîné une diminution de la PA par rapport au rat contrôle SHR soumis à un régime normosodé (Sainsily et al., 2021).

L'effet de l'apéline chez le rat DOCA-sel (un modèle expérimental d'hypertension dépendant du sel, à rénine basse et vasopressine élevée) a été peu étudié à ce jour. Une étude a rapporté que l'injection intrapéritonéale (*i.p.*) de pE13F (200 µg/kg/jour), chez le rat DOCA-sel vigile,

entraîne une diminution de la PA par rapport au rat contrôle normotendu (Akçilar et al., 2013). Mais cette étude peut présenter des biais, elle a été conduite sur un petit nombre d'animaux (n=7 à 8), à une seule dose, et la méthode de mesure de la PA par « tail cuff » (pression prise à la queue) est peu sensible. Dans un modèle d'hypertension pulmonaire induite par un traitement par la monocrotaline chez le rat, l'injection chronique par voie *i.p.* de pE13F pendant 17 jours a permis d'abaisser la PA (Falcão-Pires et al., 2009). De plus, l'administration d'Elabela, un autre agoniste de l'Apéline-R (Ho et al., 2017), chez des rats DOCA-sel et SHR, a provoqué une diminution de la PA (Chen et al., 2020; Sainsily et al., 2021). Récemment, notre laboratoire a publié un article dont je suis co-auteur (**Article 3** en annexe) sur les effets du LIT01-196 sur la PA chez le rat DOCA-sel. Cette étude a montré que l'administration aiguë du LIT01-196 (90 nmol/kg, *s.c.*) normalise la PA chez des rats DOCA-sel pendant plus de 7 h. L'effet hypotenseur induit par le LIT01-196 est NO-dépendant et reste inchangé après 4 injections *s.c.* quotidiennes consécutives.

Collectivement, ces données suggèrent que l'activation de l'Apéline-R peut constituer une nouvelle approche pharmacologique, complémentaire de celles déjà existantes, dans le traitement de l'hypertension artérielle (HTA) et de ses complications.

VI.3 Inactivation de l'Apéline-R et conséquences sur la pression artérielle

Des études portant sur l'implication fonctionnelle de l'apéline et de son récepteur dans la régulation de la PA ont été menées en utilisant des souris invalidées pour le gène de l'Apéline-R. Les coupes histologiques du cœur, du poumon, du rein, de la rate, du cerveau, de l'ovaire, du muscle squelettique, du foie et du tissu adipeux blanc n'ont révélé aucune différence de morphologie entre les souris de type sauvage et les souris déficientes pour l'Apéline-R homozygotes. Ces dernières ne présentent aucun changement de la PA mais un poids légèrement diminué par rapport aux souris sauvages. Cependant sur le plan fonctionnel, les souris déficientes pour l'Apéline-R présentent une augmentation de la PA plus importante lors de l'administration d'Ang-II que les souris sauvages recevant le même traitement (Ishida et al., 2004). Ces données indiquent que l'apéline en se fixant sur l'Apéline-R inhibe l'action pressive de l'AngII. Le système apélinergique et le SRA régulent de façon opposée la PA.

VI.4 Évaluation d'une perfusion d'apéline-13 chez l'homme sur la réactivité vasculaire

Chez l'humain, dans une étude portant sur 24 volontaires sains (Japp et al., 2008), la perfusion intra-brachiale d'apéline-36 et de pE13F (0,1 à 30 nmol/min) a favorisé la vasodilatation dans les vaisseaux de résistance de l'avant-bras. Cette vasodilatation a été atténuée par un « clamp NO » (composé de L-NAME co-infusé avec un donneur de NO, le nitroprussiate), mais pas par l'inhibition de la cyclooxygénase par l'aspirine (Japp et al., 2008). D'autres études ont aussi démontré que la perfusion de pE13F, chez des volontaires sains, induit une augmentation dose-dépendante du débit sanguin et de la vasodilatation dans l'avant-bras (Brame et al., 2015; Yang et al., 2017a). De plus, conformément aux données *in vitro* qui montrent une dissociation de plus en plus lente, de l'apéline-36 que de pE13F, de l'Apéline-R (Hosoya et al., 2000), l'apéline-36 a présenté une action plus prolongée de la vasodilatation chez l'Homme (Japp et al., 2008). La perfusion systémique chez des volontaires sains de pE13F a entraîné une baisse de 5 à 10% de la PA, a réduit les résistances vasculaires périphériques et provoqué une légère augmentation de la fréquence cardiaque (FC), qui était probablement un phénomène compensatoire lié à la baisse de PA (Japp et al., 2010).

VI.5 Mutations dans le gène du récepteur de l'apéline et hypertension

Plusieurs études ont été réalisées pour étudier les associations entre des polymorphismes génétiques dans le gène de la préproapéline et/ou de l'Apéline-R et la susceptibilité de présenter une HTA. Une méta-analyse a démontré aucune corrélation significative entre les polymorphismes du gène de la préproapéline et le risque de développer une hypertension essentielle dans la population chinoise (Wang et al., 2019). D'autres études portant sur des polymorphismes dans le gène de l'Apéline-R, rs7119375, rs10501367, rs11544374, rs9943582, rs948847 et rs2282623, ont montré qu'ils étaient associés au risque de présenter une hypertension essentielle dans différentes populations (Chine, Mexique, Iran) (Niu et al., 2010; Liu et al., 2014; Esteban-Martínez et al., 2016; Huang et al., 2016; Li et al., 2016; Nowzari et al., 2018; Wu et al., 2018). Récemment, une méta-analyse a été réalisée sur ces résultats. Comme il n'y avait que peu d'études portant sur des polymorphismes autres que le rs7119375, ils ont décidé de mener une méta-analyse seulement pour ce polymorphisme, 5 études réalisées en Chine ont été incluses, avec un total de 3567 patients atteints d'hypertension et 3256 volontaires sains. Les résultats ont montré l'existence d'une association significative entre la mutation rs7119375 et le risque de développer une hypertension essentielle (Yoshikawa et al., 2020). D'autres études portant sur

des groupes ethniques et populations différentes sont donc nécessaires pour pouvoir confirmer ces données.

L'ensemble de ces données suggèrent que le système apélinergique pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la PA et de l'HTA chez l'Homme.

VII Apéline et fonction cardiaque

VII.1 Généralités sur le cœur

Le cœur est le moteur du système cardiovasculaire, c'est un organe musculaire creux situé au milieu de la cavité thoracique entre les deux lobes pulmonaires, capable de se contracter de manière régulière et autonome. Sa principale fonction est de faire circuler le sang, dans un premier temps vers les poumons pour l'oxygéner mais également pour éliminer les déchets métaboliques tel que le dioxyde de carbone, puis dans un second temps, vers l'ensemble de l'organisme pour approvisionner en oxygène et en éléments nutritifs tous les tissus et l'organisme.

VII.1.1 Anatomie du cœur

Le cœur est un muscle strié composé de quatre cavités (Figure 10) : l'oreillette droite (OD) et le ventricule droit (VD) formant le « cœur droit » et l'oreillette gauche (OG) et le ventricule gauche (VG) formant le « cœur gauche ». Le « cœur droit » et le « cœur gauche » sont accolés l'un à l'autre et séparés par une paroi, le septum qui permet la séparation du sang oxygéné et du sang non oxygéné. On distingue le septum inter-auriculaire séparant les OD et OG et le septum inter-ventriculaire séparant les VD et VG (Figure 10). Le contrôle du flux sanguin entre les oreillettes et les ventricules est assuré par différentes valves, empêchant le reflux sanguin entre les cavités, la tricuspide entre l'OD et le VD et la mitrale entre l'OG et le VG (Figure 10).

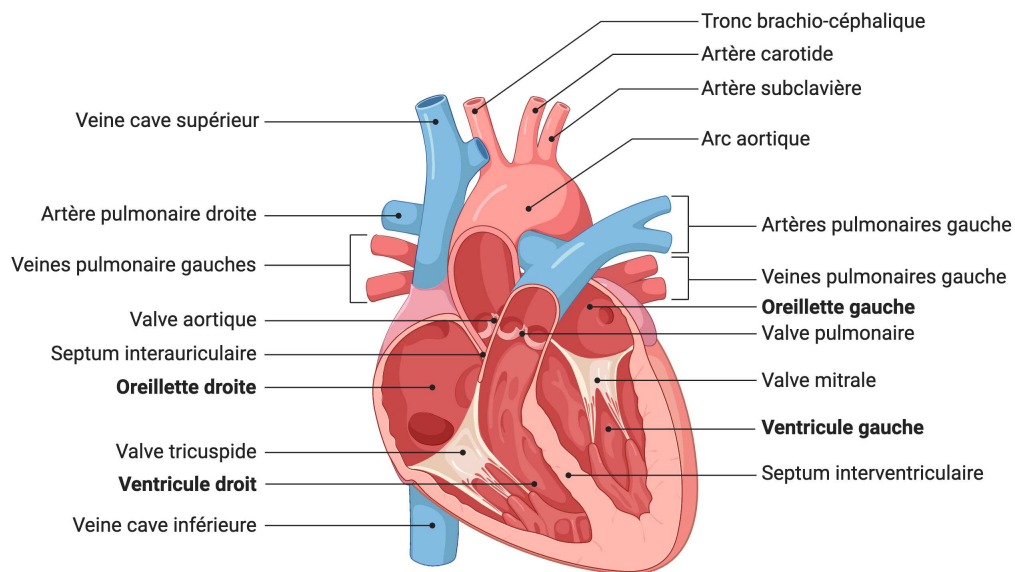


Figure 10 : Représentation schématique de l'anatomie du cœur

Chaque cavité cardiaque est connectée à des vaisseaux permettant l'entrée du sang appauvri en oxygène et la sortie du sang oxygéné. Le « cœur droit » assure la circulation du sang dépourvu d'oxygène, il arrive dans l'OD par la veine cave supérieure et inférieure, l'OD se contracte pour faire passer le sang dans le VD au travers de la valve tricuspide. Une fois dans le VD, il est envoyé dans l'artère pulmonaire au travers de la valve pulmonaire vers les poumons (Figure 10). Le « cœur gauche » assure la circulation du sang oxygéné, qui entre dans l'OG depuis les quatre veines pulmonaires. La contraction de l'OG fait transiter le sang dans le VG au travers de la valve mitrale, puis la contraction du VG propulse le sang dans l'aorte au travers de la valve aortique. Le « cœur droit » correspond donc à la circulation pulmonaire tandis que le « cœur gauche » correspond à la circulation systémique.

VII.1.2 Le tissu cardiaque

Le tissu cardiaque est composé de plusieurs feuillets cellulaires, une enveloppe externe (le péricarde), une enveloppe interne (l'endocarde) entre lesquelles se trouve la paroi musculaire correspondant au myocarde (Figure 11).

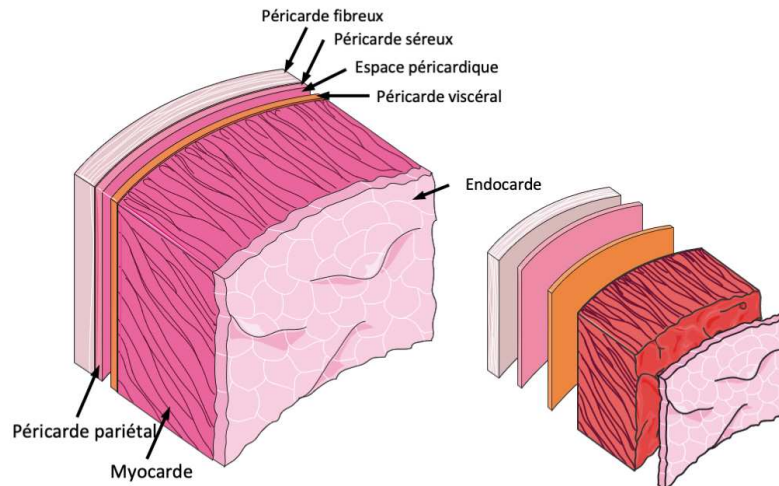


Figure 11 : Représentation schématique des différents feuillets du tissu cardiaque. Le péricarde (enveloppe externe), l'endocarde (enveloppe interne) et le myocarde situé entre les deux.

- Le péricarde est une couche de tissu conjonctif qui entoure le cœur. Il est composé de deux parties : une partie superficielle, le péricarde fibreux et d'une partie profonde, le péricarde séreux. Le péricarde séreux est lui-même formée de deux couches : un feuillet viscéral qui enveloppe le cœur (ou épicarde) et d'un feuillet pariétal qui délimite la cavité péricardique et facilite les mouvements cardiaques.
- L'épicarde et le myocarde sont séparés par une couche sous-épicaudique qui rassemble le tissu adipeux cardiaque, les nerfs et la vascularisation coronarienne.
- Le myocarde est un feuillet cellulaire médian contenant notamment les cellules cardiaques spécialisées : les cardiomyocytes qui permettent la contraction cardiaque.
- Le myocarde est séparé de l'endocarde par une couche sous-endocardique constituée de tissu conjonctif, de cellules nodales et de cellules cardionectrices de Purkinje.
- L'endocarde est une mince membrane endothéliale, qui tapisse la face interne des quatre cavités cardiaques. Elle est constituée d'un endothélium bordant la lumière du cœur et d'une couche conjonctive sous endothéliale qui sont séparés par des fibres de collagène.

VII.1.3 La révolution cardiaque

Le cycle cardiaque ou révolution cardiaque correspond à l'ensemble des évènements affectant le cœur entre deux systoles atriales consécutives. Elle se décompose en trois phases : la systole auriculaire, la systole ventriculaire et la diastole (Figure 12).

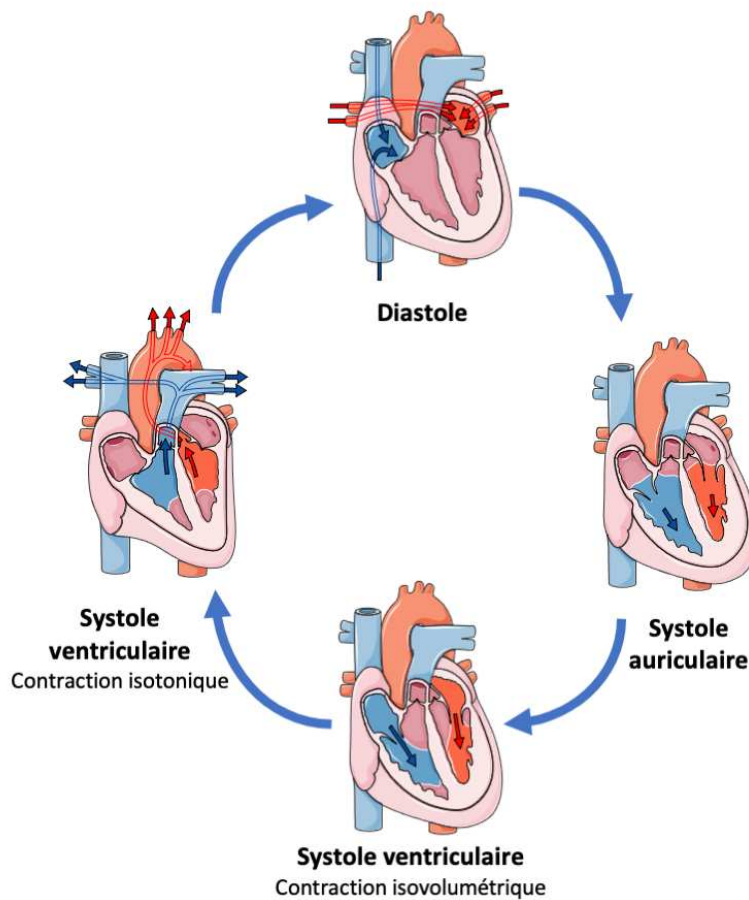


Figure 12 : Représentation schématique des 3 phases du cycle cardiaque. La systole auriculaire, la systole ventriculaire (contraction isovolumétrique puis isotonique) et la diastole.

La systole auriculaire correspond à la contraction des oreillettes. Elle permet l'éjection active du sang contenu dans les oreillettes vers les ventricules à travers les valves auriculo-ventriculaires (mitrale et tricuspide).

La systole ventriculaire correspond à la contraction des ventricules, qui se décompose en deux phases. La phase initiale correspond à la contraction isovolumétrique au cours de laquelle les valves auriculo-ventriculaires vont se fermer, la pression intra-ventriculaire va augmenter jusqu'à l'ouverture des valves sigmoïdes (aortique et pulmonaire). La seconde phase correspond à la phase d'éjection (ou contraction isotonique) au cours de laquelle le sang est expulsé des ventricules dans un premier temps rapidement puis de plus en plus lentement à mesure que la quantité de sang à éjecter diminue. Lorsqu'à la fin de l'éjection, la pression intra-ventriculaire devient inférieure à la PA, les valves-sigmoïdes se referment empêchant alors le reflux du sang dans les ventricules.

La diastole correspond à la phase de relaxation du myocarde, elle se déroule en deux étapes. La première étape très courte correspond à la relaxation isométrique. Au cours de cette phase, la pression intra-ventriculaire, suite à la vidange des ventricules, diminue pour devenir inférieure à celle des oreillettes et entraîne l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires. La seconde étape, qui représente la grande partie de la diastole, correspond au remplissage des ventricules. Elle se déroule en trois temps : un remplissage initial rapide suivi d'un remplissage lent dû à l'égalisation des pressions intra-ventriculaire et intra-auriculaire et enfin, un remplissage terminal rapide, induit par le début d'une nouvelle systole auriculaire, qui chasse le sang restant dans les oreillettes vers les ventricules et donne lieu à un nouveau cycle.

A partir du cycle cardiaque, il est possible de définir plusieurs paramètres permettant d'évaluer la fonction cardiaque :

- La fréquence cardiaque (FC) : le nombre de battements (ou pulsations) par unité de temps (en battements par minute).
- Le volume télédiastolique (VTD) : volume maximal atteint quand le cœur est le plus relaxé.
- Le volume télésystolique (VTS) : volume minimal atteint quand le cœur est le plus contracté.
- Le diamètre télédiastolique (DTD) : diamètre maximal atteint quand le cœur est le plus relaxé.
- Le diamètre télésystolique (DTS) : diamètre minimal atteint quand le cœur est le plus contracté.
- Le volume d'éjection systolique (VES) : volume sanguin éjecté par chaque ventricule au moment de la systole (en mL). Il correspond à la différence entre le VTD et le VTS.
- Le débit cardiaque (Qc) : FC x VES (exprimé en mL ou L/min)
- La fraction de raccourcissement (FR) : pourcentage de diminution du diamètre cardiaque, calculée de la manière suivante :

$$FR (\%) = (DTD - DTS) / DTD$$

- La fraction d'éjection (FE) : pourcentage de sang éjecté à chaque battement cardiaque, calculée de la manière suivante :

$$FE (\%) = (VTD - VTS) / VTD$$

La contraction des oreillettes et des ventricules du muscle cardiaque est assurée par les fibres myocardiques, réunies en unités fonctionnelles, les sarcomères.

VII.1.4 Contraction du muscle cardiaque

Les fibres myocardiques forment un réseau tridimensionnel complexe constitué d'un ensemble de cardiomyocytes connectés en série par l'intermédiaire de disques intercalaires (strie-Z), eux même constitués de desmosomes et de jonctions communicantes (jonctions gap). La fibre myocardique est composée d'un ensemble de myofibrilles qui résultent elles-mêmes de l'alignement d'unités contractiles élémentaires : les sarcomères (Figure 13).

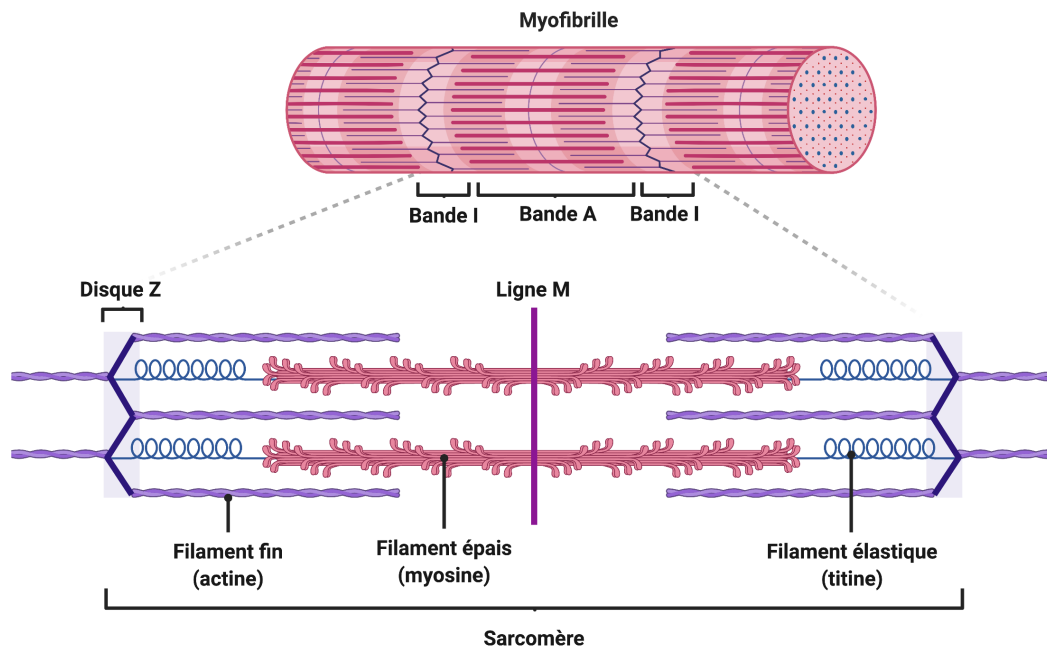


Figure 13 : Représentation schématique de la structure et de la composition des sarcomères.

Les sarcomères sont composés d'un agencement de filaments fins et de filaments épais. Les filaments fins sont formés de monomères d'actine mais aussi d' α -tropomyosine, de troponine C (TnC), troponine I (TnI) et troponine T (TnT). Les filaments épais quant à eux sont essentiellement composés de myosine, avec à leur extrémité, des têtes permettant le glissement des filaments de myosine sur ceux d'actine lors de la contraction musculaire.

Un sarcomère correspond au segment présent entre deux stries-Z (ou disques Z) voisines. Les sarcomères sont responsables de l'apparence striée du muscle cardiaque. En effet, chacun d'entre eux est composé d'une ligne M centrale correspondant au chevauchement des filaments épais, de deux bandes I situés de part et d'autre de la strie-Z et correspondant à l'empilement des filaments fins ainsi que d'une bande A qui elle correspond au chevauchement des filaments fins et épais (Figure 13).

La contraction cardiaque résulte du raccourcissement des sarcomères. Le complexe des troponines cardiaques présent au niveau des filaments fins régule cette contraction en réponse au

Ca²⁺. Brièvement, la fixation du Ca²⁺ sur la TnC entraîne un changement conformationnel du complexe des troponines. La tropomyosine se déplace et libère au niveau de l'actine, le site d'interaction avec la myosine. L'interaction entre l'actine et la myosine provoque un glissement des filaments fins et ainsi le raccourcissement des sarcomères (Figure 14).

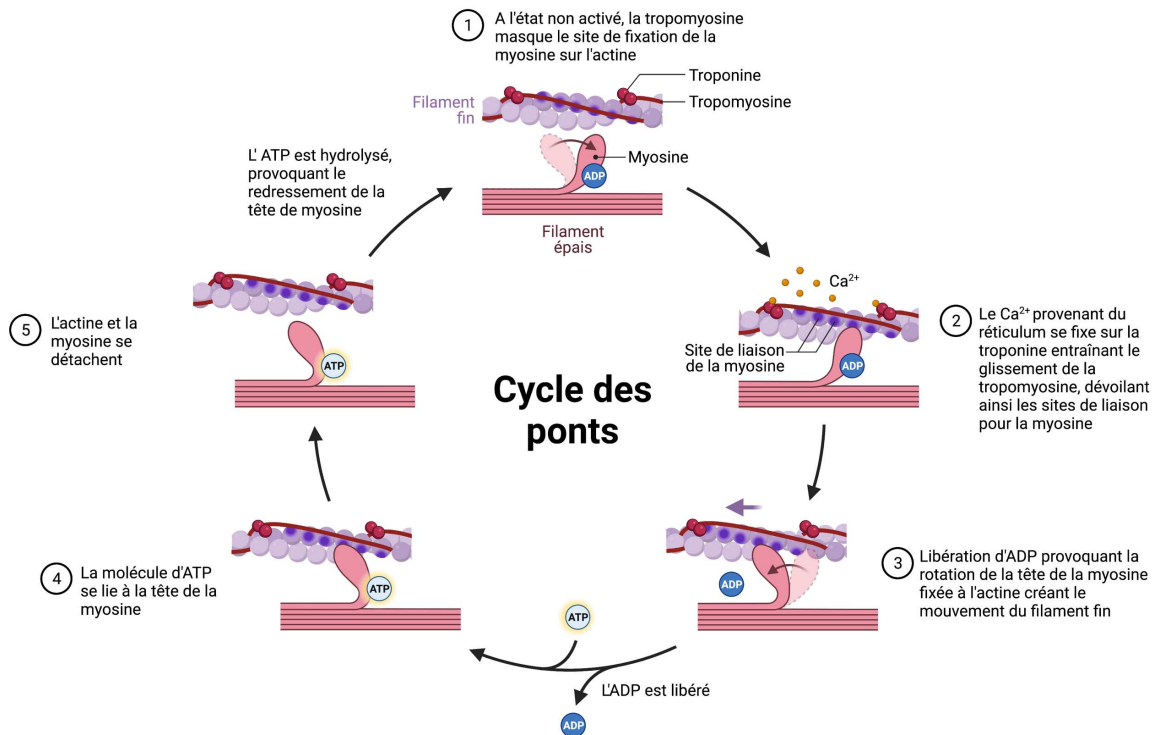


Figure 14 : Cycle des ponts. Cycle de liaison/dissociation entre l'actine et les têtes de myosine associée à des changements de conformation de la myosine permettant le glissement relatif des filaments d'actine et de myosine, qui est responsable du raccourcissement des sarcomères à l'origine de la contraction cardiaque

Le raccourcissement simultané de l'ensemble des sarcomères est à l'origine du raccourcissement des fibres myocardiques et de la contraction cellulaire. Les disques Z composés d' α -actinine, de filamine ou encore de téléthonine assurent le maintien de l'organisation des myofilaments en connectant les sarcomères adjacents et en les stabilisant au moment de la contraction.

VII.2 L'apéline : sur le cœur sain

VII.2.1 Effets inotrope et lusitrope positifs

Le système apélinergique est un puissant inotrope positif, que ce soit *ex vivo* ou *in vivo* (Japp and Newby, 2008; Pitkin et al., 2010; Wang et al., 2013a). C'est en 2002 que l'implication de l'apéline/Apéline-R sur la contractilité cardiaque a été observée. En effet, Szokodi *et coll.* ont montré pour la première fois *ex vivo*, dans un modèle de cœur isolé perfusé de rat, que la perfusion d'apéline-16 (délétion de la lysine à l'extrémité N-terminale de K17F) entraînait une

augmentation progressive et dose-dépendante (de 1 pM à 10 nM) de la tension développée, qui est maximale (69 %) à 24 minutes (Szokodi et al., 2002). Plus tard, Gerbier *et coll.* ont montré dans le même modèle, que la perfusion de K17F augmentait aussi de manière dose-dépendante la contractilité cardiaque avec une concentration efficace 50 de 28 nM (Gerbier et al., 2017).

L'effet inotrope positif de l'apéline a aussi été observé dans des cardiomyocytes isolés de rat adulte où la perfusion d'apéline-16 (1-10 nM) induit une augmentation significative du raccourcissement des sarcomères (Farkasfalvi et al., 2007). De plus, dans un modèle de cardiomyocytes n'exprimant pas l'apéline (apéline-KO) exposés à différentes pré-charges, il a été observé un abaissement de la pente de la relation contrainte-longueur en fin de diastole, en réponse à 10 nM d'apéline, un effet dépendant de la précharge (Peyronnet et al., 2017). Cela suggère un effet lusitropique positif de l'apéline, indiquant que l'apéline améliore la relaxation cardiaque.

In vivo, il a été observé chez des souris anesthésiées, une augmentation de la contractilité, lors d'une perfusion aigüe par voie *i.v.* de 100 nM d'apéline-12 (5 µL/min pendant 20 minutes) (Ashley et al., 2005). Il est intéressant de noter que, chez ces animaux, l'administration aigüe d'apéline n'a pas été suivie d'une augmentation du volume systolique, du débit cardiaque et de la pression systolique, des changements auxquels on pourrait s'attendre en raison d'une contractilité accrue (Ashley et al., 2005). Cette administration aigüe a entraîné une augmentation de la compliance du VG, ce qui se traduit par une diminution des pré- et post- charges. Chez le rat, la perfusion aigüe d'apéline-16 (0,01 µg/min pendant 20 minutes) a augmenté de manière significative la contractilité cardiaque par une augmentation du volume d'éjection systolique (Berry et al., 2004).

VII.2.2 Voies de signalisation mises en jeu lors de l'effet inotrope positif de l'apéline

Les voies de signalisation mises en jeu lors de l'effet inotrope positif de l'apéline sont encore sujet à débat aujourd'hui. Il a été proposé que l'augmentation de la contractilité du myocarde induite par l'apéline serait liée à des mécanismes dépendants du Ca²⁺ (Dai et al., 2006; Wang et al., 2008) ou indépendants du Ca²⁺ (Farkasfalvi et al., 2007; Charo et al., 2009; Parikh et al., 2018).

Szokodi *et coll.*, ont observé que l'effet inotrope de l'apéline sur les coeurs isolés de rats est lié en partie à la protéine Gi ou Go, mais que l'effet de la protéine Gq n'est pas complètement exclu. L'effet inotrope serait dû à l'activation de la phospholipase C (PLC) et de la PKC, et impliquerait les échangeurs NHE (Na⁺/H⁺) et NCX (Na⁺/Ca²⁺) (Szokodi et al., 2002).

L'activité des échangeurs NHE et NCX dépend de la force électromotrice, qui elle-même dépend du potentiel membranaire ainsi que des concentrations intracellulaires des ions (sodium, hydrogène et calcium). Ainsi, cette étude a montré pour la première fois que l'apéline produit un effet inotrope positif, indépendant du courant calcique (Szokodi et al., 2002).

En 2006, Dai *et coll.*, ont proposé que l'augmentation de la contractilité induite par l'apéline soit le résultat d'une augmentation transitoire de la concentration de Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire plutôt que d'un changement dans la réactivité des myofilaments contractiles au Ca^{2+} (Figure 15A) (Dai et al., 2006). Ces observations ont été corroborées en 2008 par les travaux de Wang *et coll.*, qui ont montré que l'apéline exerce une action inotrope et lusitrope positive sur des cardiomyocytes isolés en entraînant une libération accrue de Ca^{2+} . Cette libération accrue de Ca^{2+} est obtenue par une augmentation de l'influx de Ca^{2+} par l'échangeur NCX et une augmentation de la recapture du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique régulée par la pompe SERCA (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase), dont l'activité est contrôlée par sa phosphorylation par la PKC (Figure 15A) (Wang et al., 2008).

Ces études sont en contradiction avec l'étude de Farkasfalvi *et coll.* qui ont montré que l'application d'apéline-16 (1nM), sur des cardiomyocytes isolés de rats contrôle et insuffisant cardiaque, entraîne un raccourcissement accru des sarcomères. L'effet inotrope positif n'est pas dû à une augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mais à une augmentation de l'activité de l'échangeur NHE (Farkasfalvi et al., 2007). L'alcalinisation intracellulaire produite par l'augmentation de l'activité de l'échangeur NHE induit une augmentation de la sensibilité des myofilaments au calcium, et ainsi accroît la contraction cardiaque (Figure 15B).

En 2009, une étude portant sur des cardiomyocytes de souris déficientes en préproapéline ou en Apéline-R a révélé que la perte d'apéline ou d'Apéline-R entraînait une diminution de la contractilité cardiaque sans générer de différence dans la cinétique de mobilisation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ce qui suggère que l'apéline et l'Apéline-R affecteraient soit la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} , soit la cinétique du cycle des ponts (Figure 14) (Charo et al., 2009). Perjés *et coll.* ont proposé que l'activation des voies de signalisation PKC α et ERK1/2 par l'apéline provoque une augmentation de la phosphorylation de la MLC (Myosin light-chain) (Perjés et al., 2014), qui entraîne la liaison des têtes de myosine aux filaments d'actine et le raccourcissement des sarcomères (Figure 15B).

De plus, le niveau de phosphorylation des protéines myofilamentaires cardiaques peut affecter leur performance contractile en fonction de leur longueur, ce qui régule positivement la relation de Frank-Starling. Selon la loi de Frank-Starling, plus la précharge augmente (c'est-à-dire plus

les forces liées au remplissage du sang dans le ventricule avant la systole augmentent), plus la force de contraction qui en découle sera grande, en raison d'une tension plus importante des fibres myocardiques. En effet, il a été observé entre 2014 et 2016, dans un modèle de cardiomyocytes préchargés mécaniquement, que l'apéline augmente leur complianc, comme l'indique la régulation négative de la relation force-longueur en fin de diastole, ce qui améliorerait la contractilité (Peyronnet et al., 2017). De plus, en 2018, Parikh *et coll.* ont montré, sur des cardiomyocytes déficients en Apéline-R, une régulation négative de la relation de Frank-Starling, sans augmentation transitoire de la concentration en $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'étirement (Parikh et al., 2018). Cette étude a également fourni des indications sur le mécanisme d'action de l'apéline en mettant en évidence une réduction de la phosphorylation de la troponine I cardiaque (cTnI) par la PKA. Ce mécanisme connu pour augmenter la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} , est en accord avec l'inhibition de la voie AC-AMPC-PKA par l'apéline, *via* l'activation de la sous-unité $G_{\alpha i}$ (Figure 15B) (Szokodi et al., 2002; Scimia et al., 2012).

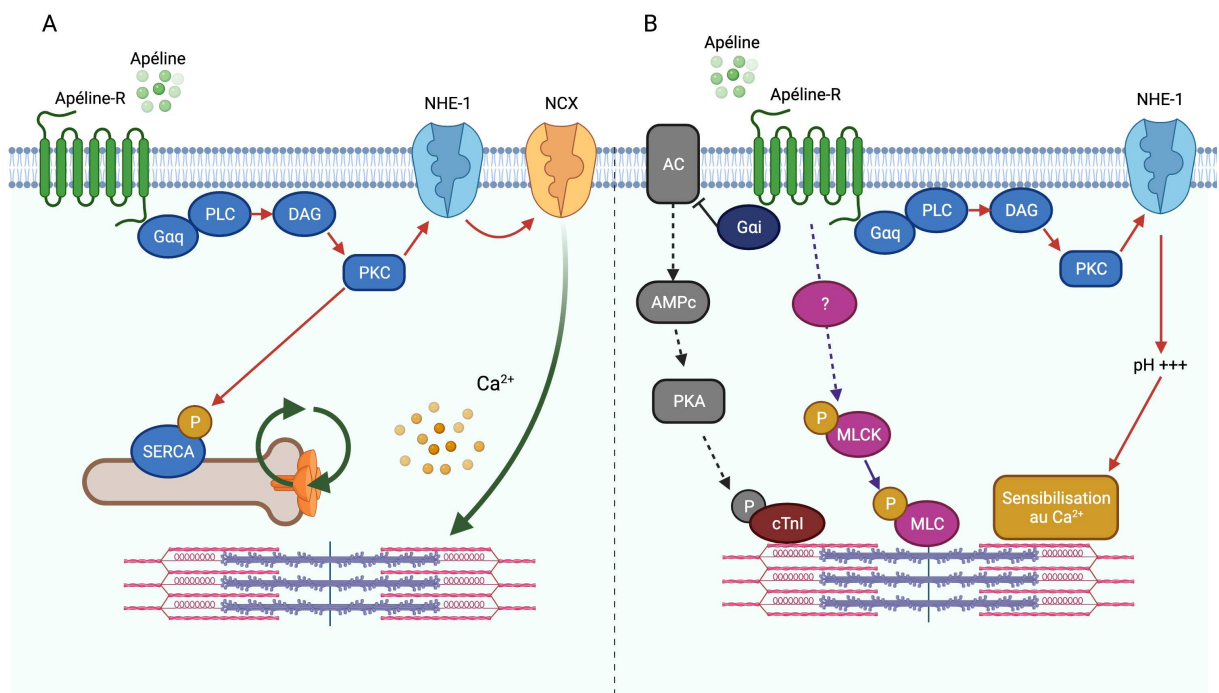


Figure 15 : Voies de signalisation potentielles de l'Apéline-R impliquées dans l'effet inotrope positif de l'apéline indépendant et dépendant du Ca^{2+} . (A) L'activation de l'Apéline-R par l'apéline induit également un effet inotrope positif qui s'accompagne d'une mobilisation transitoire du Ca^{2+} accrue par l'activation de l'échangeur NCX dépendante de $G_{\alpha q}$. Un effet lusitrope positif (augmentation de la vitesse de relaxation myocardique) est également induit par la phosphorylation de SERCA via la PKC. (B) L'activation de l'Apéline-R par l'apéline augmente la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} . Les mécanismes mis en jeu comprennent l'alcalinisation intracellulaire par l'activation de l'échangeur NHE dépendant de $G_{\alpha q}$, la déphosphorylation de la cTnI dépendant de $G_{\alpha i}$ et la phosphorylation de la MLC. Adapté de (Seo et al., 2020)

Il a également été démontré que le système apélinergique influence la conduction cardiaque. Des expériences *ex vivo* sur des cardiomyocytes isolés de rat démontrent que l'apéline augmente la

vitesse de conduction dans des cardiomyocytes et influence le potentiel d'action cardiaque (Farkasfalvi et al., 2007; Cheng et al., 2013). L'apéline raccourcit le potentiel d'action dans les myocytes auriculaires *via* des effets sur de multiples courants ioniques (Cheng et al., 2013).

VII.3 Insuffisance cardiaque

VII.3.1 Description et origines de l'insuffisance cardiaque

VII.3.1.1 Épidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde. On estime à 17,7 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardiovasculaires, soit 31% de la mortalité mondiale. Parmi ces décès, on estime que 7,4 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne et 6,7 millions à un AVC (chiffres 2015). Les maladies cardiovasculaires constituent donc un problème majeur de santé publique loin devant les infections respiratoires, les affections néonatales, et les cancers (Figure 16). On retrouve en tête les cardiopathies ischémiques associées à l'IC avec 9 millions de décès par an.

Au sein des pays développés, l'incidence de l'IC, ajustée à l'âge, diminue depuis quelques années, ce qui reflète une meilleure prise en charge des maladies cardiovasculaires. Cependant en raison du vieillissement de la population, l'incidence globale tend à augmenter (Roth et al., 2015; Savarese and Lund, 2017; Conrad et al., 2018). En France, la prévalence de l'IC est estimée entre 2 à 3% de la population adulte (Gabet et al., 2014) mais étant donné que les études n'incluent généralement que les cas d'IC diagnostiqués/reconnus, la prévalence réelle est probablement plus élevée (van Riet et al., 2014). De plus, la prévalence augmente avec l'âge, environ 1% chez les personnes âgées de moins de 55 ans à plus de 10% chez les personnes âgées de 70 ans ou plus (Bibbins-Domingo et al., 2009; van Riet et al., 2016; Benjamin et al., 2018). Le pronostic de l'IC reste sévère avec une lourde morbi-mortalité. En France, l'IC est la cause de plus de 160 000 hospitalisations et de 70 000 décès par an. La mortalité à 5 ans après l'apparition des premiers signes reste comprise entre 30 et 50 % (De Peretti et al., 2014).

Les principales causes de mortalité dans le monde

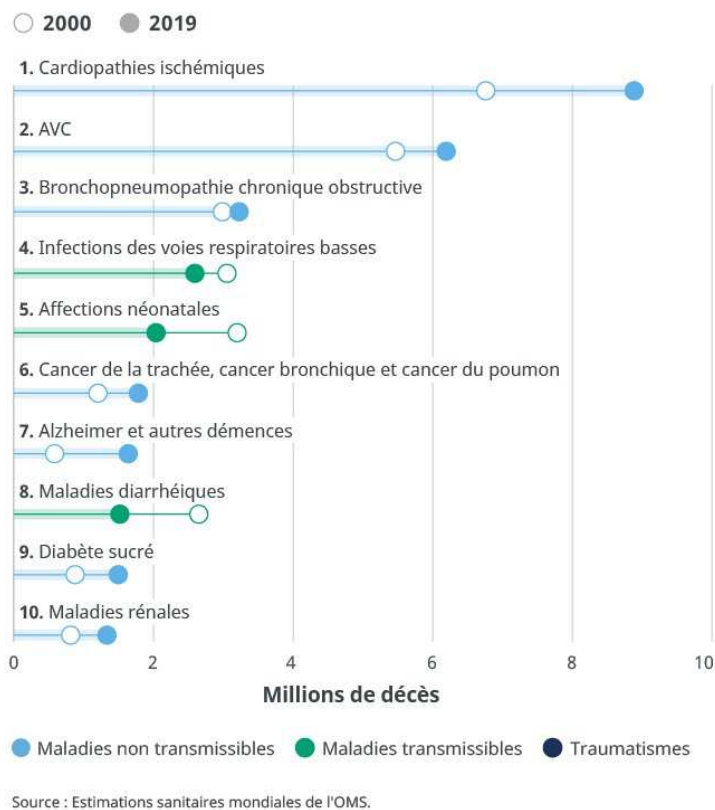


Figure 16 : Principales causes de mortalité dans le monde. Estimations sanitaires mondiales de l'OMS entre 2000 et 2019. Source WHO 2020

VII.3.1.2 Physiopathologie

D'un point de vue physiopathologique, l'IC peut être définie comme **l'incapacité du cœur à délivrer un débit suffisant de sang pour répondre aux besoins de l'organisme, et donc un maintien normal des pressions de remplissage**. D'un point de vue clinique l'IC est définie par la Société Européenne de Cardiologie (ESC) par : des symptômes cliniques (dyspnée au moment de l'effort, œdème des chevilles et fatigue), des signes cliniques (turgescence jugulaire, crépitations pulmonaires et œdème périphérique) associés à une anomalie structurelle et/ou fonctionnelle du cœur qui entraîne des pressions intracardiaques élevées et/ou un débit cardiaque insuffisant au repos et/ou à l'effort (le plus souvent évaluée par une échocardiographie). Le plus souvent l'IC est due à un dysfonctionnement du myocarde : soit systolique, soit diastolique, soit les deux. Cependant, les pathologies des valves, du péricarde et de l'endocarde, ainsi que les anomalies du rythme cardiaque et de la conduction peuvent également causer ou contribuer à l'IC. L'IC peut être également d'origine génétique, liée à une hypertension ou une inflammation chronique, une coronaropathie ou une occlusion vasculaire, un alcoolisme persistant, ou un effet secondaire à des traitements lourds tels que ceux administrés lors d'une chimiothérapie.

L'IC est aujourd'hui divisée en plusieurs classes, sur la base de la mesure de la FE ventriculaire gauche (FEVG). Cette division est due aux premiers essais de traitements de l'IC qui ont montré une amélioration substantielle des résultats chez les patients donc la FEVG était inférieure à 40%. Or l'IC peut être diagnostiquée chez des patients ayant une FEVG supérieure à 40%. La classification suivante de l'IC a été proposée :

- Les patients ayant une FEVG réduite $\leq 40\%$, ont une IC dite à FE réduite. Le mécanisme principal est un défaut de contraction du VG, moins de sang est éjecté à chaque systole/contraction cardiaque et le VG a tendance à se dilater.
- Les patients dont la FEVG est comprise entre 41% et 49% ont une IC à FE modérément altérée.
- Les patients présentant des symptômes et des signes d'IC, avec des preuves d'anomalies cardiaques structurelles et/ou fonctionnelles et/ou des taux de peptides natriurétiques élevés, et dont la FEVG est supérieure à 50%, ont une IC avec FE préservée. Le mécanisme principal est un problème de remplissage, le cœur se vide bien mais ne se remplit pas correctement. La cavité du VG n'est pas dilatée et les parois sont souvent épaissies (hypertrophie concentrique), le VG est donc plus rigide et toute augmentation de volume va entraîner une augmentation importante de la pression diastolique. Ce type d'IC est plus fréquent chez le sujet âgé et chez la femme enceinte et plus souvent associé à l'HTA.

Le registre à long terme de l'ESC, qui porte sur les patients externes ambulatoires, indique que 60% des patients présentent une IC à FE réduite, 24% une IC à FE modérément altérée et 16% IC à FE préservée (Chioncel et al., 2017).

A la suite d'un dysfonctionnement cardiaque, l'organisme va mettre en place différents mécanismes compensateurs. On parle de remodelage cardiaque. L'ensemble de ces mécanismes compensateurs sont bénéfiques à court terme car ils permettent de maintenir le débit cardiaque et les pressions de perfusion des différents organes. Il s'agit d'un remodelage bénéfique : le myocarde s'hypertrophie - les cardiomyocytes s'épaississent. A long terme, leurs effets prolongés vont être délétères car ils participent à l'augmentation de l'effort cardiaque et de la consommation en oxygène du cœur. Le remodelage cardiaque devient alors délétère avec un amincissement du myocarde, un allongement des cardiomyocytes, et une dilatation du VG.

VII.3.1.3 Mécanismes au niveau cardiaque

Le remodelage cardiaque se définit par des changements de la géométrie des cavités cardiaques :

- L'hypertrophie des parois, pour répondre à l'augmentation de la pression systolique à la suite d'une sténose aortique ou dans l'HTA. Cette augmentation va permettre de normaliser la contrainte exercée sur la paroi ventriculaire selon la loi de Laplace, **hypertrophie concentrique**. Mais cela va avoir un effet délétère à long terme, il va y avoir une augmentation du travail cardiaque et une augmentation de la rigidité des parois.
- L'activation du système sympathique (tachycardie) permet de maintenir le débit cardiaque, mais son activation prolongée va augmenter le travail cardiaque et la consommation en oxygène du cœur.
- La dilatation ventriculaire, due à une altération de la FE après un infarctus du myocarde (IM) ou une cardiomyopathie dilatée, du fait de la diminution de la force de contraction du muscle cardiaque, va entraîner une augmentation du volume téléstolique. Lors de la diastole suivante, la pression télédiastolique va avoir tendance à augmenter, ce qui va entraîner une augmentation de la contrainte sur les parois ventriculaires et progressivement contribuer à augmenter le volume télédiastolique, **on observe donc un remodelage ou hypertrophie excentrique** (Figure 17). La dilatation ventriculaire est un processus important dans la compensation, en effet l'augmentation du volume télédiastolique lorsque la FEVG diminue permet de conserver un volume d'éjection ventriculaire, mais cela augmente la contrainte pariétale (qui est proportionnelle au rayon de la cavité) qui va être délétère à long terme. Une hypertrophie excentrique est observée par une surcharge de volume par exemple après une régurgitation mitrale ou aortique, un IM, ou une cardiomyopathie dilatée.
- L'augmentation de la pression ventriculaire au moment du remplissage (précharge) va entraîner l'étirement des fibres myocardiques ce qui va s'accompagner d'une augmentation de l'inotropie du ventricule jusqu'à une certaine limite de dilatation (loi de Starling).

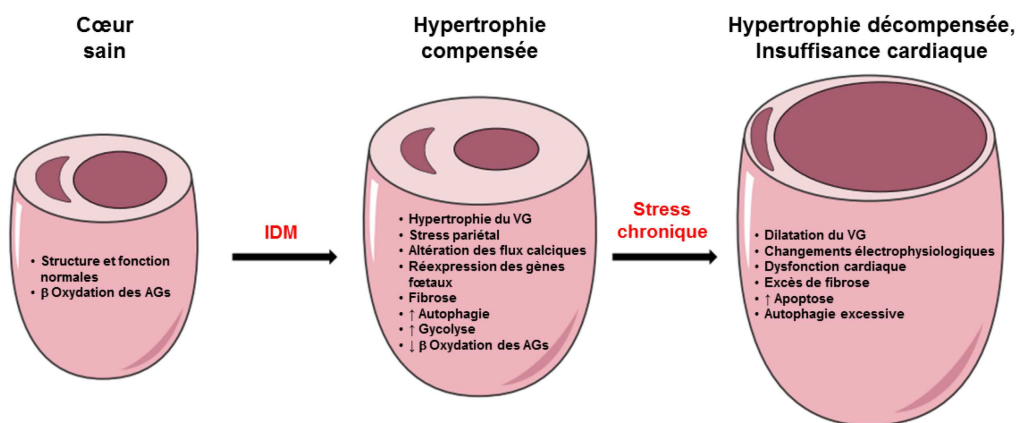


Figure 17 : Représentation schématique du remodelage ventriculaire gauche. Adapté de (Tham et al., 2015)

VII.3.1.4 Mécanismes au niveau extracardiaque

De nombreux systèmes neurohormonaux sont activés, mais c'est l'activation du système sympathique et du SRAA qui va être le plus important. Cela va induire une vasoconstriction qui va contribuer à maintenir une pression de perfusion, mais elle est hétérogène au niveau de l'organisme. Certains territoires comme la circulation cérébrale ou coronaire sont épargnés aux dépens d'autres territoires (cutanés, muscle, rate, rein...), mais cela entraîne une augmentation du travail cardiaque, des effets pro-arythmiques et des effets toxiques directs des catécholamines sur les myocytes.

Une rétention hydrosodée liée à la baisse de perfusion rénale et à la diminution de la natriurèse (lié à l'activation du SRA) contribue à augmenter la volémie plasmatique et à augmenter la précharge (loi de Starling). On peut observer chez les patients des signes congestifs cliniques comme des œdèmes ou épanchements.

L'IC peut être aggravée par la désynchronisation cardiaque, lors d'un trouble de conduction, la dépolarisation s'effectuant de proche en proche, les segments myocardiques ne vont pas se contracter de manière synchrone ce qui va engendrer une contraction retardée.

VII.3.2 Traitements pharmacologiques de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite et limitations

Il existe trois principaux objectifs de traitement pour les patients atteints d'IC à FE réduite : 1) la réduction de la mortalité, 2) la prévention des hospitalisations récurrentes dues à l'aggravation de l'IC et 3) l'amélioration de l'état clinique, de la capacité fonctionnelle et de la qualité de vie.

Les recommandations de l'ESC 2021 pour les traitements pharmacologiques des patients insuffisants cardiaques avec FE réduite sont les suivantes : les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (IEC) ou la combinaison d'antagoniste des récepteurs de l'Ang-II de type 1 (AT1-R) avec un inhibiteur de la néprilysine (ARNI), les bêtabloquants, les antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes (ARM), les inhibiteurs du co-transporteur sodium-glucose de type 2 (SGLT2) et les diurétiques de l'anse (McDonagh et al., 2021).

VII.3.2.1 Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I

Les IEC ont été la première classe de médicaments à réduire la mortalité et la morbidité chez les patients atteints d'IC à FE réduite (Packer et al., 1999) et à améliorer les symptômes de l'IC. Ils sont recommandés chez tous les patients ayant une FE réduite, sauf en cas de contre-indication ou d'intolérance. Leur efficacité a été démontrée pour cinq molécules (captopril, enalapril,

lisinopril, ramipril, trandolapril). Les principaux effets secondaires possibles sont la toux, l'hypotension artérielle et l'insuffisance rénale. Chez les patients symptomatiques incapables de tolérer un IEC, il est possible de le remplacer par le LCZ696/Entresto, une combinaison d'un antagoniste des AT1-R, le valsartan et d'un inhibiteur de la néprilysine, le sacubitril (McMurray et al., 2014).

VII.3.2.2 Les bêtabloquants

Les bêtabloquants réduisent la mortalité et la morbidité chez les patients atteints d'IC à FE réduite, en plus du traitement par un IEC et un diurétique (Hjalmarson et al., 2000; Packer et al., 2002; Flather et al., 2005) tout en améliorant également les symptômes (Fowler, 1997). Leur efficacité a été démontré pour quatre molécules (bisoprolol, carvedilol, metoprolol et nebivolol). Les conditions d'administration restent assez strictes, ils doivent être initiés chez les patients cliniquement stables, euvoémiques, à une faible dose et augmentés progressivement jusqu'à la dose maximale tolérée. De plus, il existe un consensus sur le fait que les IEC et les bêtabloquants peuvent être commencés ensemble dès le diagnostic d'IC à FE réduite.

VII.3.2.3 Les antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes

Les ARM (spironolactone ou éplérénone) sont des diurétiques épargneurs de potassium. Ils sont recommandés, en plus d'un IEC et d'un bêtabloquant chez tous les patients atteints d'IC à FE réduite afin de réduire la mortalité et le risque d'hospitalisation, tout en améliorant également les symptômes (Pitt et al., 1999; Zannad et al., 2011). Il faut cependant faire attention aux risques d'hyperkaliémie et d'insuffisance rénale, qui peuvent apparaître en présence d'un IEC. Ils sont donc contre-indiqués chez les patients présentant une insuffisance rénale et chez ceux présentant une hyperkaliémie. De plus, les ARM bloquent les récepteurs qui fixent l'aldostérone (récepteurs des minéralocorticoïdes) mais aussi ceux qui fixent le cortisol (récepteurs des glucocorticoïdes) mais ils peuvent aussi activer ceux de la progestérone. Ce manque de sélectivité induit de nombreux effets indésirables chez 20% des patients traités, notamment une gynécomastie (9% des hommes), une impuissance mais aussi un dérèglement menstruel et une perte de libido (Ménard, 2004).

VII.3.2.4 Les gliflozines

Les inhibiteurs du SGLT2, constituent une nouvelle classe d'antidiabétiques oraux. Ces médicaments induisent une glycosurie en inhibant la réabsorption du glucose et du sodium dans le tubule contourné proximal rénal. L'essai clinique DAPA-HF réalisé sur 4744 patients IC à FE

altérée qui ont reçu soit la dapagliflozine (inhibiteur du SGLT2, 10 mg/jour) ou le placebo, en plus d'un traitement comprenant un IEC, un antagoniste des AT1-R ou du sacubitril-valsartan en combinaison avec un bêtabloquant pendant 18 mois. Le critère de jugement principal concernait l'aggravation de l'IC ou le décès cardiovasculaire. Les résultats ont montré une réduction de la mortalité cardiovasculaire et des hospitalisations pour une IC chez des patients atteints d'IC à FE inférieure ou égale à 40 %, qu'ils soient ou non diabétiques. Par la suite, l'essai clinique phase III, EMPEROR-Reduced a montré que l'empagliflozine réduisait de 25% les décès cardiovasculaires et hospitalisations pour une aggravation de l'IC (Packer et al., 2020). Comme attendu, on ne retrouve pas les effets indésirables classiques des traitements de l'IC (hypotension, dysfonction rénale, déshydratation, bradycardie, hyperkaliémie). De plus, les propriétés diurétiques/natriurétiques des inhibiteurs du SGLT2 peuvent offrir des avantages supplémentaires en réduisant le volémie et peuvent permettre de réduire le besoin en diurétiques de l'anse (Jackson et al., 2020). Par conséquent, la dapagliflozine et l'empagliflozine sont recommandées dans l'IC à FE réduite, au même titre que les IEC/ARNI, les bêtabloquants et les ARM et ce, quel que soit le statut diabétique du patient.

VII.3.2.5 Autres médicaments

D'autres médicaments peuvent être recommandés ou envisagés chez certains patients atteints d'IC avec FE réduite, comme les diurétiques de l'anse, pour réduire les signes et/ou symptômes de rétention hydrique.

L'ivabradine, qui ralentit la FC par inhibition du canal If dans le nœud sinusal, est recommandé chez les patients dont la FC est constamment ≥ 75 bpm, en plus des bêtabloquants à la dose maximale tolérée (Swedberg et al., 2012). La digoxine est la plus ancienne molécule utilisée dans le traitement de l'IC, elle peut améliorer les symptômes des patients, mais n'a aucun effet sur la survie. De plus, sa faible marge thérapeutique et le risque de surdosage, notamment en cas d'insuffisance rénale associée et ses effets potentiellement pro-arythmogènes en font un traitement de seconde intention.

VII.3.3 Nouveaux types de traitements de l'insuffisance cardiaque

Deux études cliniques sur l'IC avec FE réduite ont récemment été publiées. L'étude VICTORIA a évalué l'efficacité et la sécurité d'emploi du vériciguat, un stimulateur des récepteurs solubles de la guanylate cyclase, chez des patients présentant une IC avec une FE réduite ou une IC congestive récemment décompensée. Les décès d'origine cardiovasculaire ou les hospitalisations

pour IC étaient plus faibles chez les patients ayant reçu du véricigat que chez ceux ayant reçu un placebo (Armstrong et al., 2020).

L'étude GALACTIC-HF a évalué l'efficacité et la sécurité d'emploi de l'activateur de la myosine cardiaque, l'omecactiv mecarbil, chez des patients atteints d'IC avec une FE réduite. Cette étude montre, pour la première fois, qu'une thérapie qui augmente spécifiquement la contractilité cardiaque peut se traduire par un bénéfice clinique dans l'IC à FE réduite (Teerlink et al., 2021).

L'ensemble de ces traitements, couramment utilisés pour traiter les patients atteints d'IC, permettent d'améliorer la survie et la fonction cardiaque mais présentent des limitations d'utilisation et/ou des effets secondaires indésirables. La recherche de nouveaux traitements est donc, encore et toujours, une nécessité.

VII.4 L'apéline dans l'insuffisance cardiaque

Dans l'IC, une variation de l'expression de l'apéline ainsi que de l'Apéline-R a été observée. Elles restent inchangées ou régulées à la hausse si l'IC est compensée, ou alors régulées à la baisse si l'IC est décompensée (Chong et al., 2006; Japp and Newby, 2008). Chez le rat *in vivo*, 24 heures après un IM, une augmentation de l'expression des ARNms codant pour l'apéline est observée dans le ventricule lésé (Ronkainen et al., 2007). De plus, dans des cultures de cardiomyocytes, l'activation pharmacologique de l'HIF-1 (facteur-1 inductible par l'hypoxie dont l'expression est augmenté après IM) par la desferrioxamine, ou l'expression d'une forme constitutivement active de HIF-1 α , augmente l'expression de l'apéline (Ronkainen et al., 2007). Chez l'homme, une carence en apéline aggrave les dommages induits par l'ischémie/reperfusion (I/R), y compris l'extension de la taille de l'infarctus, l'inflammation associée et la mortalité (Wang et al., 2013b). En effet, la production d'apéline chute lorsque l'IC devient chronique ou plus sévère (Ronkainen et al., 2007), l'exemple le plus marquant de cette chute est la réduction du niveau d'apéline myocardique observée chez le chien souffrant d'une IC avancée induite par la microembolisation d'une artère coronaire (Wang et al., 2013a). L'administration par voie *i.v.* de pE13F (300 nmol/min, 15 min) à des patients souffrant d'IC a montré son efficacité pour diminuer les résistances vasculaires et augmenter le débit cardiaque (Japp et al., 2010).

VII.4.1 Rôle cardioprotecteur

Le cœur peut être protégé par l'apéline contre les lésions dues à l'I/R. En effet, il a été observé dans un système de cœur de rat isolé (Langendorff), que la taille d'un infarctus suite à une

occlusion de l'artère coronaire était considérablement réduite par la perfusion de pE13F exogène délivrée avant le début de la reperfusion (Kleinz and Baxter, 2008). Au contraire, aucune modification de la taille de l'infarctus n'a été observée lorsque la perfusion d'apéline était arrêtée avant la reperfusion. La perfusion d'apéline avant l'ischémie n'a induit aucune protection, alors que des réductions significatives de la taille de l'infarctus ainsi qu'une amélioration de la récupération mécanique post-ischémique ont été observées lorsque l'apéline était administrée en début de reperfusion (Rastaldo et al., 2011). L'apéline pourrait donc jouer un rôle d'autoprotection du myocarde lors d'une ischémie.

L'effet de différents fragments de l'apéline a aussi été évalué sur des cœurs de souris. Une réduction de la taille de l'infarctus a été observée avec l'apéline-13 et dans une moindre mesure avec l'apéline-36 (Simpkin et al., 2007). De plus, dans ce même modèle, une autre étude a démontré qu'une perfusion de pE13F ou K17F lors de la reperfusion entraînait une cardioprotection similaire en réponse à une I/R, en revanche la pyr-apéline-12 et l'apéline-16 n'ont pas permis d'obtenir une amélioration fonctionnelle significative avec une lésion I/R myocardique (Wang et al., 2016).

Chez le rat *in vivo*, l'administration d'apéline-12 entraîne un effet cardioprotecteur contre l'I/R en limitant la taille de l'infarctus mais ne permettant pas une amélioration des fonctions cardiaques (Pisarenko et al., 2014). La protection apportée par l'apéline contre les lésions à la suite d'une I/R porterait sur la réduction de la taille de l'infarctus et sur l'amélioration de la récupération mécanique post-ischémique.

VII.4.2 Rôle anti-apoptotique

L'apoptose est un processus complexe de mort cellulaire programmée qui se produit dans tous les organismes multicellulaires. Il est aujourd'hui bien établi que le système apélinergique peut réguler l'apoptose dans différents types cellulaires. Plusieurs études *in vitro* ont suggéré que l'activation de l'Apéline-R par l'apéline supprime l'apoptose dans différents types de culture cellulaire, telles que les cellules endothéliales (Zeng et al., 2014), les cardiomyocytes (Ustunel et al., 2014), les cellules LoVo (Picault et al., 2014), les cellules gliales de Muller de la rétine (Lu et al., 2013) et les cellules musculaires lisses (Andersen et al., 2011). Bien qu'il existe des controverses sur l'effet bénéfique ou néfaste de l'apoptose, son atténuation dans des organes à faible potentiel de régénération, comme le cœur, pourrait lui être protecteur. En effet, l'apéline-13 inhibe l'apoptose et les dommages mitochondriaux dans la lignée cellulaire de cardiomyoblastes H9C2 et dans des cardiomyocytes isolés de souris obèses soumises à un régime HFD (Boal et al., 2016).

De plus, l'effet anti-apoptotique de l'apéline a également été observé *in vivo* au niveau cardiaque, en diminuant la taille de l'IM et en atténuant les lésions I/R du myocarde, en diminuant l'apoptose des cardiomyocytes (Zeng et al., 2009; Tao et al., 2011; Liu et al., 2017). En effet, dans des cœurs de rat *in vivo* exposés à une ischémie de 30 minutes suivie d'une reperfusion, l'administration de 1 µg/kg d'apéline a atténué l'apoptose dépendante du stress du réticulum endoplasmique (RE) (Tao et al., 2011). L'équipe de Li *et coll.*, a démontré que, chez les souris ayant subi un IM par ligature de l'artère coronaire, l'injection quotidienne d'apéline-13 (1 mg/kg/jour) par voie *i.p.* pendant 14 jours a favorisé considérablement le recrutement de cellules progénitrices myocardiques et le recrutement des cellules de la moelle osseuse et a favorisé la réparation cardiaque après infarctus, tout en supprimant l'apoptose induite par le stress (Li et al., 2012a, 2013).

L'inhibition de l'apoptose par le système apélinergique implique plusieurs voies de signalisation. La stimulation de la voie PI3K/Akt joue un rôle central dans l'effet bénéfique de l'apéline pour lutter contre l'apoptose. En effet, l'effet anti-apoptotique de l'apéline est diminué par un inhibiteur de PI3K, le LY294002. La PI3K est nécessaire à la translocation d'Akt vers la membrane plasmique en tant que second messenger. La PI3K phosphoryle une variété de substrats et active Akt, qui joue un rôle crucial dans les fonctions cellulaires fondamentales telles que la prolifération, la survie des cellules et l'inhibition de la libération du cytochrome c mitochondrial pour protéger contre l'apoptose (Gibson et al., 2002). De plus, le prétraitement des cardiomyocytes avec l'apéline-13 inhibe efficacement l'apoptose induite par la privation de glucose et pourrait augmenter significativement la phosphorylation d'Akt et de mTOR avec une régulation positive de la protéine Bcl-2 et une régulation négative de Bax et de la caspase-3 (Zhang et al., 2009). *In vivo*, chez les rats obèses soumis à un régime HFD, le système apélinergique protège contre l'apoptose induite par l'IM par l'intermédiaire de la voie FoxO1, phosphorylée par Akt (Boal et al., 2016).

Le système apélinergique peut aussi réguler l'apoptose par d'autres voies comme la voie de signalisation MAPK/ERK1/2. Les protéines ERK1/2 sont activées par des agents mitogènes qui jouent un rôle dans la régulation d'une grande variété d'activités cellulaires, notamment la migration, la prolifération et la différenciation cellulaires (Zsarnovszky and Belcher, 2004). Dans des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse, l'apoptose induite par la privation de sérum est significativement réduite par pE13F de façon concentration-dépendante, effet bloqué par l'inhibition des voies de signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt (Zeng et al., 2012). L'apoptose des cardiomyocytes induite lors d'un stress du RE dans un modèle d'I/R chez

le rat, est atténuée par l'activation des voies MAPK/ERK1/2 et PI3K/Akt (Tao et al., 2011), Des résultats similaires ont également été rapportés par Zeng *et coll.* (Zeng et al., 2009) qui ont montré que l'apéline inhibe l'apoptose et diminue les lésions I/R du myocarde en augmentant la phosphorylation de ERK1/2 et Akt. Ainsi le système apélinergique a des effets protecteurs dans les cardiopathies ischémiques et pourrait constituer une cible thérapeutique importante pour la protection du myocarde post-infarctus. Une exploration plus approfondie de la relation entre le système apélinergique et l'apoptose est nécessaire pour améliorer notre compréhension et permettre la découverte de nouveaux traitements.

VII.4.3 Rôles anti-hypertrophique et anti-fibrotique

L'apéline en traitement chronique améliore la performance cardiaque, avec une réduction de la pré-charge et de la post-charge du VG et une augmentation de la fonction contractile sans signe d'hypertrophie (Ashley et al., 2005). La stimulation chronique de l'Apéline-R par l'apéline augmente, non seulement la performance cardiaque, mais atténue également le développement de l'IC due à la surcharge de pression par l'inhibition du facteur de croissance transformant- β (TGF- β) (Pchejetski et al., 2012) et à la production d'espèces réactives à l'oxygène dérivées de NOX2 (Koguchi et al., 2012). *In vitro*, le prétraitement des fibroblastes de souris par l'apéline empêche le TGF- β d'induire à la fois l'expression du marqueur alpha-smooth muscle actin (α -SMA) et la production de collagène (Pchejetski et al., 2012). En effet, le TGF- β stimule la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes *via* l'intervention d'une sphingosine kinase 1 (Sphk1). Ainsi, la réduction de l'activité de Sphk1 serait le point de départ de la cascade de l'apéline dans la protection du cœur contre la fibrose et le remodelage. Une fois que Sphk1 est inhibée, l'absence d'expression de α -SMA et de production de collagène est cohérente avec l'impossibilité pour les fibroblastes de se différencier en myofibroblastes (Pchejetski et al., 2012).

Récemment, une autre étude a montré que l'apéline pourrait également diminuer la fibrose, par d'autres mécanismes, comme l'inhibition de la voie TGF- β /smad 2/ α -SMA (Lv et al., 2020) ou de la voie PI3K/Akt, afin d'atténuer le stress oxydatif chez des rats souffrant d'IC induite par un IM (Zhong et al., 2020).

Chez les souris déficientes en préproapéline, la réponse hypertrophique à la surcharge de pression est inchangée, mais une altération progressive de la fonction systolique est observée (Kuba et al., 2007). Suite à un IM chez des souris déficientes en préproapéline, le cœur présente un remodelage post-infarctus exacerbé et une récupération fonctionnelle altérée avec une réduction

significative des voies de signalisation ERK1/2 et PI3K/AKT, dans les régions de l'infarctus et péri-infarctus. Ces études démontrent clairement les effets inotropes et anti-hypertrophiques simultanés de l'apéline dans l'ischémie et la surcharge de pression.

A l'inverse, la surexpression de l'Apéline-R dans les cardiomyocytes de souris provoque une hypertrophie cardiaque et une dysfonction contractile (Murata et al., 2016). De plus, les cardiomyocytes fraîchement isolés dépourvus de l'Apéline-R présentent une réponse atténuée à l'étirement, ce qui indique que l'Apéline-R est un mécanosenseur. L'activation de l'Apéline-R par l'étirement augmente la taille des cellules des cardiomyocytes et induit des marqueurs moléculaires d'hypertrophie. En résumé, l'Apéline-R peut être activé par ses ligands endogènes (apéline, elabela) mais aussi par des stimuli mécaniques (étirements) et les traduire en réponses biologiques opposées au niveau cardiaque. Ces réponses biologiques peuvent être médiées par différentes voies de signalisation (Scimia et al., 2012).

Il a été montré *in vivo* que l'Apéline-R pouvait être activé par un stress mécanique (étirement) dans un modèle de surcharge de pression ou la délétion de l'Apéline-R entraînait un effet protecteur contre l'hypertrophie (Scimia et al., 2012). L'hypertrophie médiée par l'étirement dans un modèle de surcharge de pression est inhibée par l'inactivation de la voie β -arrestine ou par l'activation de la voie G α i suite à la stimulation de l'Apéline-R par l'apéline exogène (Scimia et al., 2012). L'activité pro-hypertrophique médiée par l'étirement serait spécifique à l'Apéline-R myocardique (Parikh et al., 2018).

VII.4.4 Rôle pro-angiogénique

Des études menées sur plusieurs modèles précliniques ont démontré que l'apéline protège contre les lésions myocardiques d'origine ischémique. En effet, l'administration d'apéline ou d'un analogue de l'apéline a eu des effets protecteurs dans des modèles d'IM, notamment une meilleure récupération fonctionnelle et une réduction de la taille de l'infarctus (Wang et al., 2013b). Ces effets sont très probablement liés à la libération de NO et à l'angiogenèse (Azizi et al., 2013; Wang et al., 2013b). De plus, après une lésion ischémique, l'angiogenèse va être stimulée pour favoriser l'oxygénation des tissus. Dans un modèle d'IM chez la souris, il a été observé que la surexpression du facteur inductible par l'hypoxie 1-alpha (HIF1- α) chez des souris transgéniques réduit la taille de l'infarctus et le développement de l'IC (Kido et al., 2005). Comme indiqué précédemment, la signalisation de l'Apéline-R joue un rôle important dans l'angiogenèse. Le gène de l'apéline pouvant être régulé à la hausse par HIF1- α , les animaux apéline KO présentent des réponses angiogéniques altérées suites aux lésions d'I/R (Ronkainen et al., 2007; Wang et al., 2013b).

In vivo, l'administration intra-myocardique de cellules de moelle osseuse surexprimant l'apéline à des souris ischémiques a augmenté la localisation des cellules progénitrices dérivés de la moelle osseuse dans le cœur post-infarctus, ce qui a entraîné une néovascularisation (Li et al., 2013). L'expression de l'apéline peut être induite par l'hypoxie à la fois *in vitro* et *in vivo* par HIF1- α qui augmente la transcription du gène de l'apéline (Cox et al., 2006; Ronkainen et al., 2007; Eyries et al., 2008). Dans les cellules endothéliales en culture, la prolifération stimulée par l'hypoxie est inhibée par l'inactivation de l'Apéline-R, Ces données suggèrent que l'expression de l'apéline induite par l'hypoxie peut constituer un nouveau mécanisme impliqué dans la réponse physiologique et physiopathologique adaptative des cellules vasculaires à un faible niveau d'oxygène (Eyries et al., 2008).

Considérant les rôles cardioprotecteur, anti-apoptotique, anti-hypertrophique, anti-fibrotique et pro-angiogénique de l'apéline, son récepteur constitue une cible thérapeutique de choix justifiant développement d'agonistes de l'Apéline-R résistants à la dégradation enzymatique, comme nouvelle approche pharmacologique du traitement de l'IC.

A l'heure actuelle, l'utilisation de l'apéline dans l'IC est limitée par l'absence de composés à durée d'action prolongée, mais de nombreux composés sont en cours de développement.

VIII Développement d'agonistes de l'Apéline-R

Dans le plasma de souris, Gerbier *et coll.* ont montré que K17F et pE13F ont une demi-vie (*ex vivo*) de 4,6 et 7,2 minutes respectivement (Gerbier et al., 2017) et Murza *et coll.* ont montré que pE13F a une demi-vie de 14 minutes dans le plasma de rat (Murza et al., 2014). Concernant l'apéline-36, Japp *et coll.* ont montré à partir d'expériences réalisées sur des sujets humains en bonne santé que la demi-vie de l'apéline-36 est inférieure à 5 minutes (Japp et al., 2010). Ces demi-vies courtes sont dues au métabolisme rapide des apélines par des enzymes telles que l'ECA-2 ou la NEP. Le métabolisme rapide de l'apéline a encouragé le développement d'analogues de l'apéline métaboliquement stables pour des applications thérapeutiques potentielles. De nombreuses approches (Table 1), telles que la PEGylation (Jia et al., 2012; Galon-Tilleman et al., 2017; Fischer et al., 2020), les modifications synthétiques au sein du motif RPRL de l'apéline (Choe et al., 2000), la palmitoylation et l'utilisation d'acides aminés non naturels (O'Harte and Flatt, 2015; Juhl et al., 2016; Fischer et al., 2019) ou les modifications de la chaîne principale (cyclisation) (Brame et al., 2015; Murza et al., 2017; Trân et al., 2018) ont été utilisées pour augmenter la demi-vie de l'apéline. Des études récentes ont rapporté le développement d'agonistes non peptidiques de l'Apéline-R qui possèdent des propriétés

pharmacologiques similaires à celles de l'apéline, certains d'entre eux sont actifs par voie orale (Read et al., 2016; Gargalovic et al., 2021).

La plupart des études visant à développer des analogues métaboliquement stables de l'apéline se sont concentrées sur pE13F (Brame et al., 2015; Murza et al., 2015, 2017; Juhl et al., 2016; Gerbier et al., 2017; Tràn et al., 2018) et l'apéline-36 (Jia et al., 2012; Galon-Tilleman et al., 2017). Cependant, K17F, a une affinité 10 fois supérieure à celle de pE13F pour l'Apéline-R humain, et est plus efficace pour induire la mobilisation de la β -arrestine (20 fois) et l'internalisation du récepteur de l'apéline de rat (10 à 30 fois) que pE13F (Gerbier et al., 2017) et est également plus active pour diminuer la PA que pE13F (El Messari et al., 2004). Compte tenu de ces données, des analogues de K17F métaboliquement stables ont été récemment développés (Gerbier et al., 2017; Fischer et al., 2019). (Table 1)

Table 1: Développement d'agonistes de l'Apéline-R

	Affinité (K _i , nM)	inhibition de la production d'AMPC (IC ₅₀ , nM)	β-arrestine (EC ₅₀ , nM)	Ex vivo ½ vie dans le plasma (min)	In vivo ½ vie dans la circulation (min)	Diurèse
AGONISTES PEPTIDIQUES de l'Apéline-R						
Apéline-13/pE13F et analogues de pE13F						
pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F (Murza et al., 2014, 2016; Gerbier et al., 2017; Trân et al., 2021)	0.5	1.8	68 - 300	~ 10	<1 après injection iv	+ (Deng et al., 2015; Coquerel et al., 2017)
pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F(L-αCH ₃) (Murza et al., 2014, 2015)	0.3	0.07	-	> 120	-	-
MM07: Cyclo(1-6)C-R-P-R-L-C-H-K-G-P-M-P (Brame et al., 2015)	300	-	2130	-	17	-
pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-1Nal-D-□-Me-Y(OBn) (Trân et al., 2021)	0.08	3.8	36	438	26	-
Apéline-17 (K17F) et analogues de K17F						
K17F: K-F-R-R-Q-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F (Gerbier et al., 2017; Flahault et al., 2021)	0.06	0.30	15	4.6	<1 après injection iv	+ (Hus-Citharel et al., 2014)
Fmoc-(PEG) ₆ -NMeLeu-17A2 (107) (Fischer et al., 2019)	0.55	-	-	1620	-	-
P92: Ac-K-F-(D)R-R-(D)Q-R-P-R-(D)L-S-Aib-K-(D)A-P-Nle-P-4Br(F) (Gerbier et al., 2017)	0.09	0.56	4	24	-	++ (Gerbier et al., 2017)
LIT01-196: CF ₃ (CF ₂) ₇ (CH ₂) ₂ C(O)-K-F-R-R-Q-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F (Gerbier et al., 2017; Flahault et al., 2021)	0.08	1.71	16	> 1440	156 après injection sc	++ (Gerbier et al., 2017; Flahault et al., 2021)
Apéline-36 et analogues de l'apéline-36						
Apéline-36: L-V-Q-P-R-G-S-R-N-G-P-G-P-W-Q-G-G-R-R-K-F-R-R-Q-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F (Habata et al., 1999; Hosoya et al., 2000; Medhurst et al., 2003; Japp et al., 2010)	2.4	0.5	-	-	< 5	-
40kDa-PEG-Apéline-36 (Jia et al., 2012; Nyimanu et al., 2019)	0.3	1.7	2	-	~ 20	-
AGONISTES NON-PEPTIDIQUES de l'Apéline-R						
CMF-019 (Read et al., 2016)	2.6	0.1	224	38	-	-
AMG 986 (Ason et al., 2020)	-	0.23	0.25	-	144 après injection iv Actif oralement	-
BMS-986224 (Gargalovic et al., 2021)	0.07	0.02	7.9	-	Actif oralement	-

-, non déterminé; G, glycine; P, proline; A, alanine; V, valine; L, leucine; I, isoleucine; M, méthionine; C, cysteine; F, phénylalanine; Y, tyrosine; W, tryptophane; H, histidine; K, lysine; R, arginine; Q, glutamine; N, asparagine; E, acid glutamique; D, acid aspartique; S, sérine; T, thréonine; Aib, acid aminoisobutyrique; Y(OBn), tyrosine(Obenzyl); Nle, norleucine; 1Nal, 1-naphthylalanine; 4Br(F), 4-bromo-phénylalanine; PEG, polyéthylène glycol; Fmoc, 9-fluorenylméthoxy carbonyle. Adapté de (Girault-Sotias et al., 2021)

Dans les travaux de Gerbier *et al* (Gerbier et al., 2017), une stratégie originale pour améliorer la protection des peptides endogènes vis-à-vis de la dégradation enzymatique a été utilisée, basée

sur l'introduction d'une chaîne fluorocarbonée directement à l'extrémité N-terminale de K17F, générant le LIT01-196.

Ce composé présente une forte affinité pour l'Apéline-R de rat ($K_i = 0,08$ nM) et est beaucoup plus stable dans le plasma (demi-vie >24 h) que K17F (4,6 min). Le LIT01-196 a montré une résistance remarquable aux enzymes de dégradation du plasma, puisque > 90 % du composé est resté intact après 24 heures d'incubation dans le plasma de souris à 37 °C. Le LIT01-196 présente un profil d'agoniste complet pour l'Apéline-R, que ce soit pour la production d'AMPc, la phosphorylation d'ERK1/2 (nanomolaire), le recrutement de la β -arrestine ou l'internalisation de l'Apéline-R (efficacité subnanomolaire) (Gerbier et al., 2017).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Les objectifs de ce travail de thèse ont été de définir les caractéristiques pharmacologiques et les effets en physiopathologie d'un analogue métaboliquement stable de K17F, le LIT01-196. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Dominique Bonnet (Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, CNRS UMR7200, Illkirch).

Le premier objectif a été de caractériser pharmacologiquement le LIT01-196. Nous avons tout d'abord défini sa capacité à se lier à l'Apéline-R, à inhiber la production d'AMPc induite par la FSK et à induire l'internalisation de l'Apéline-R dans des cellules CHO surexprimant ce récepteur. Nous avons ensuite évalué et comparé à K17F, la capacité de ce composé à inhiber la production d'AMPc induite par un agoniste du V2-R, la dDAVP, dans des cellules immortalisées de canal collecteur, les cellules mpkCCD qui expriment le V2-R, l'Apéline-R et les canaux à eau, les AQP2. Cet effet sur la production d'AMPc a aussi été étudié dans une préparation plus physiologique, des canaux collecteurs microdisséqués. Par la suite, nous avons évalué dans les cellules mpkCCD, l'habilité du LIT01-196 à inhiber la mobilisation des AQP2, à la membrane apicale induite par la dDAVP.

Le deuxième objectif a été de définir et de comparer *in vivo* la demi-vie de LIT01-196 et de K17F dans la circulation sanguine après administration par voie *i.v.* et *s.c.*, chez le rat et la souris. Afin de comprendre pourquoi la demi-vie du LIT01-196 était augmentée (plusieurs heures) par rapport à celle de K17F, nous avons évalué la liaison du LIT01-196 aux protéines plasmatiques. Nous avons dans le même temps évalué les effets d'une administration aiguë de LIT01-196 sur la diurèse et sur la FC chez le rat et la souris contrôles respectivement.

Le troisième objectif a été de déterminer si le traitement par ce composé administré *in vivo* dans deux modèles expérimentaux, le premier d'hyponatrémie (du fait de son effet aquarétique), le deuxième d'IC (du fait de son effet inotrope positif) pouvait avoir des effets bénéfiques pour augmenter la natrémie dans le premier modèle et améliorer la fonction et le remodelage cardiaques dans le deuxième modèle.

J'ai ainsi cherché à déterminer si le LIT01-196 est capable, au-delà d'induire un effet aquarétique, de contrecarrer l'effet antidiurétique de l'AVP. Pour cela, nous avons mis au point au laboratoire un modèle d'hyponatrémie induite par l'AVP (modèle de SIAD). Dans ce modèle, j'ai déterminé et comparé au tolvaptan, un antagoniste du V2-R, les effets d'une administration aiguë du LIT01-196 par voie *s.c.* sur la diurèse, l'osmolalité urinaire et la concentration plasmatique de sodium.

J'ai ensuite étudié les effets d'un traitement chronique par le LIT01-196, administré par voie *s.c.* pendant 4 semaines chez la souris après un IM sur la fonction cardiaque, la taille de l'infarctus, l'épaisseur des parois du VG et la fibrose.

RESULTATS

IX Article 1. “A metabolically stable apelin-17 analog decreases AVP-induced antidiuresis and improves Hyponatremia” (*Nature Communications*)

IX.1 Introduction

Il a été montré précédemment au laboratoire que l'apéline exerce une action opposée à celle de l'AVP, non seulement au niveau cérébral, mais également au niveau rénal. En effet, l'Apéline-R est exprimé le long du néphron avec un gradient d'expression dans le canal collecteur du rein, s'exprimant davantage dans la partie distale, là où est présent le V2-R. La stimulation du V2-R par l'AVP entraîne un effet anti-diurétique en augmentant la production de l'AMPc et l'insertion de canaux perméables à eau, les AQP2, à la membrane apicale des cellules principales du canal collecteur. Cette translocation permet la réabsorption de l'eau à partir de l'urine primitive et par conséquent, la concentration et la réduction du volume urinaire. De plus, il a été aussi montré que l'administration de K17F par voie *i.v.* chez la rate en lactation, qui présente des taux plasmatiques d'AVP élevés, induit un effet aquarétique significatif en inhibant la production d'AMPc induite par l'AVP et en diminuant l'expression des AQP2 à la membrane apicale. Ce n'est toutefois pas le cas chez la rate non lactante. Dans ce contexte l'Apéline-R pourrait représenter une cible intéressante dans le traitement de l'hyponatrémie.

L'hyponatrémie est un trouble électrolytique qui se caractérise par un excès d'eau corporelle par rapport au sodium corporel total. On parle d'hyponatrémie lorsque la natrémie se situe en dessous de 135 mmol/L de plasma. Cette anomalie est fréquente et représente une cause importante d'hospitalisation. Elle est associée à différentes pathologies comme l'IC, la cirrhose hépatique ou encore l'insuffisance rénale, à la prise de certains médicaments comme les diurétiques ou les antidépresseurs et peut être également due au syndrome d'antidiurèse inappropriée (SIAD), situation dans laquelle les taux plasmatiques d'AVP augmentent d'une manière inappropriée par rapport à l'osmolalité plasmatique.





Comme nous l'avons vu plus haut, l'AVP exerce son effet antidiurétique *via* le V2-R localisé dans le canal collecteur du rein. Cela conduit à une réduction de la diurèse, une élévation de l'osmolalité urinaire et une diminution de la concentration de sodium dans le plasma (hyponatrémie). Il a été clairement démontré dans le laboratoire que l'apéline et l'AVP représentent le Yin et le Yang de l'équilibre hydrique. Nous avons émis l'hypothèse que pour contrebalancer l'augmentation des taux circulants de l'AVP observés dans l'hyponatrémie, il

serait intéressant de compenser, en administrant un traitement par l'apéline et ainsi rétablir la balance apéline/AVP. Cependant, l'apéline ayant une demi-vie *in vivo* inférieure à la minute, nous avons développé un analogue métaboliquement stable de K17F, le LIT01-196. Ce dernier présente les mêmes caractéristiques pharmacologiques que K17F avec une demi-vie *ex vivo* dans le plasma supérieure à 24 heures. Cet analogue présente un effet aquarétique chez la rate vierge anesthésiée et chez le rat normotendu 24 heures après administration par voie *i.v.* ou *s.c.*

L'objectif de mon travail a été dans un premier temps de montrer que le LIT01-196, comme K17F, inhibait la production d'AMPc induite par l'AVP ou la dDAVP (un agoniste spécifique du V2-R) dans une lignée cellulaire immortalisée issue des cellules principales du canal collecteur de souris, les mpkCCD (qui expriment le V2-R, l'Apéline-R et l'AQP2) ainsi que dans une préparation plus physiologique de canaux collecteurs microdisséqués. J'ai ensuite examiné dans les cellules mpkCCD traitées par l'AVP, si le LIT01-196 inhibait la mobilisation des AQP2 à la membrane apicale. Nous avons ensuite comparé les effets aquarétiques du LIT01-196 et du tolvaptan, un antagoniste sélectif du V2-R, tout d'abord chez des rats normo-natrémiques, puis dans un modèle expérimental d'hyponatrémie. Le tolvaptan est utilisé en pratique clinique pour traiter l'hyponatrémie. Il présente plusieurs effets secondaires (syndrome polyuro-polydipsique, toxicité hépatique, intolérance au glucose) et peut conduire à une correction trop rapide de l'hyponatrémie pouvant entraîner une complication neurologique grave due à la démyélinisation osmotique des axones. Bien que le tolvaptan ait montré son efficacité pour corriger l'hyponatrémie dans le SIAD, il ne s'est pas révélé efficace pour diminuer la surmortalité chez les patients hyponatrémiques. Le tolvaptan reste néanmoins le seul traitement de l'hyponatrémie ayant fait l'objet d'une validation clinique. Nous avons utilisé le tolvaptan dans notre étude comme traitement de référence et témoin positif.

Pour réaliser cette étude nous avons mis au point un modèle d'hyponatrémie induite par l'AVP, qui s'apparente au SIAD. Nous avons ensuite évalué dans ce modèle l'efficacité d'administrations répétées par voie *s.c.* de LIT01-196 ou de tolvaptan, à corriger l'hyponatrémie induite par l'AVP.

A metabolically stable apelin-17 analog decreases AVP-induced antidiuresis and improves hyponatremia

Adrien Flahault ^{1,3}, Pierre-Emmanuel Girault-Sotias ^{1,3}, Mathilde Keck¹, Rodrigo Alvear-Perez¹, Nadia De Mota¹, Lucie Estéouille², Sridévi M. Ramanoudjame², Xavier Iturriz¹, Dominique Bonnet ²✉ & Catherine Llorens-Cortes ¹✉

Apelin and arginine-vasopressin (AVP) are conversely regulated by osmotic stimuli. We therefore hypothesized that activating the apelin receptor (apelin-R) with LIT01-196, a metabolically stable apelin-17 analog, may be beneficial for treating the Syndrome of Inappropriate Antidiuresis, in which AVP hypersecretion leads to hyponatremia. We show that LIT01-196, which behaves as a potent full agonist for the apelin-R, has an in vivo half-life of 156 minutes in the bloodstream after subcutaneous administration in control rats. In collecting ducts, LIT01-196 decreases dDAVP-induced cAMP production and apical cell surface expression of phosphorylated aquaporin 2 via AVP type 2 receptors, leading to an increase in aqueous diuresis. In a rat experimental model of AVP-induced hyponatremia, LIT01-196 subcutaneously administered blocks the antidiuretic effect of AVP and the AVP-induced increase in urinary osmolality and induces a progressive improvement of hyponatremia. Our data suggest that apelin-R activation constitutes an original approach for hyponatremia treatment.

¹Laboratory of Central Neuropeptides in the Regulation of Body Fluid Homeostasis and Cardiovascular Functions, Center for Interdisciplinary Research in Biology, INSERM, Unit U1050, Centre National de la Recherche Scientifique, Unite Mixte de Recherche 7241, Collège de France, Paris, France. ²Laboratory of Therapeutic Innovation, Unité Mixte de Recherche 7200, Centre National de la Recherche Scientifique, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France. ³These authors contributed equally: Adrien Flahault, Pierre-Emmanuel Girault-Sotias. ✉email: dbonnet@unistra.fr; c.llorens-cortes@college-de-france.fr

Hyponatremia, defined in humans as a plasma sodium concentration below 135 mmol/l, is associated with various diseases, including chronic heart failure (CHF), liver cirrhosis, diuretic treatment, and the syndrome of inappropriate antidiuresis (SIAD)¹. Hyponatremia is also associated with high mortality rates² in patients with liver failure³, CHF⁴, and chronic kidney disease⁵.

Arginine-vasopressin (AVP or antidiuretic hormone, ADH) type 2 receptors (V₂-R) are expressed in the kidney collecting ducts (CDs). By acting on these receptors, AVP increases cAMP production, leading to the insertion of aquaporin-2 (AQP-2) into the apical membrane of CD, allowing water reabsorption and decreasing urine output (Fig. 1)⁶. In SIAD, plasma AVP levels are inappropriately increased with respect to plasma osmolality¹. V₂-R antagonists, such as tolvaptan, block the stimulation of V₂-R by AVP, and have been shown to correct hyponatremia efficiently in rodents⁷ as well as in humans with SIAD^{8–10}. Expected effects of aquaretic agents such as intense thirst, polyuria (24 h diuresis up to 6 L per day) and nocturia were observed¹¹. Tolvaptan at the dose of 7.5 mg per day was also reported to carry a significant risk of overly rapid sodium correction in 23% of hyponatremia patients having baseline serum sodium concentration <125 mmol/l¹². These patients exhibit the highest risk of developing osmotic demyelination syndrome when overly rapid correction of hyponatremia occurs^{13,14}. Chronic treatment with V₂-R antagonists has also shown efficacy in autosomal dominant polycystic

kidney disease (ADPKD)¹⁵. However, aquaresis-related events led 8% of patients with ADPKD receiving tolvaptan to discontinue treatment^{15–17}. Therefore, the development of therapeutic agents acting on different targets with a different mode of action could be useful for the treatment of disorders linked to excessive AVP secretion such hyponatremia and ADPKD.

Apelin is a neuro-vasoactive peptide identified as the endogenous ligand of the human orphan G protein-coupled receptor, APJ^{18,19}. Following the identification of its endogenous ligand, this receptor was renamed the apelin receptor (apelin-R). Three molecular forms of apelin have been identified in vivo as follows: apelin-36, apelin-17 (K17F), and the pyroglutamyl form of apelin-13 (pE13F)^{20,21}. K17F has an affinity 16 times higher than that of pE13F for apelin-R (K_i , 0.05 versus 0.8 nmol/l), but both peptides inhibit similarly forskolin-induced cAMP production in cells expressing the apelin-R. K17F is, however, 20 times more efficient than pE13F for inducing rat apelin-R internalization and β -arrestin mobilization^{22,23}. Apelin and apelin-R^{24,25} are strongly expressed in the supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei, in which double-labeling studies have shown them to colocalize with AVP in magnocellular vasopressinergic neurons^{20,24–26}. The central administration of K17F in lactating rats, which display an increased phasic electrical activity of magnocellular vasopressinergic neurons and an increased AVP release from the posterior pituitary into the bloodstream, inhibits the activity of these neurons, leading to a decrease in circulating

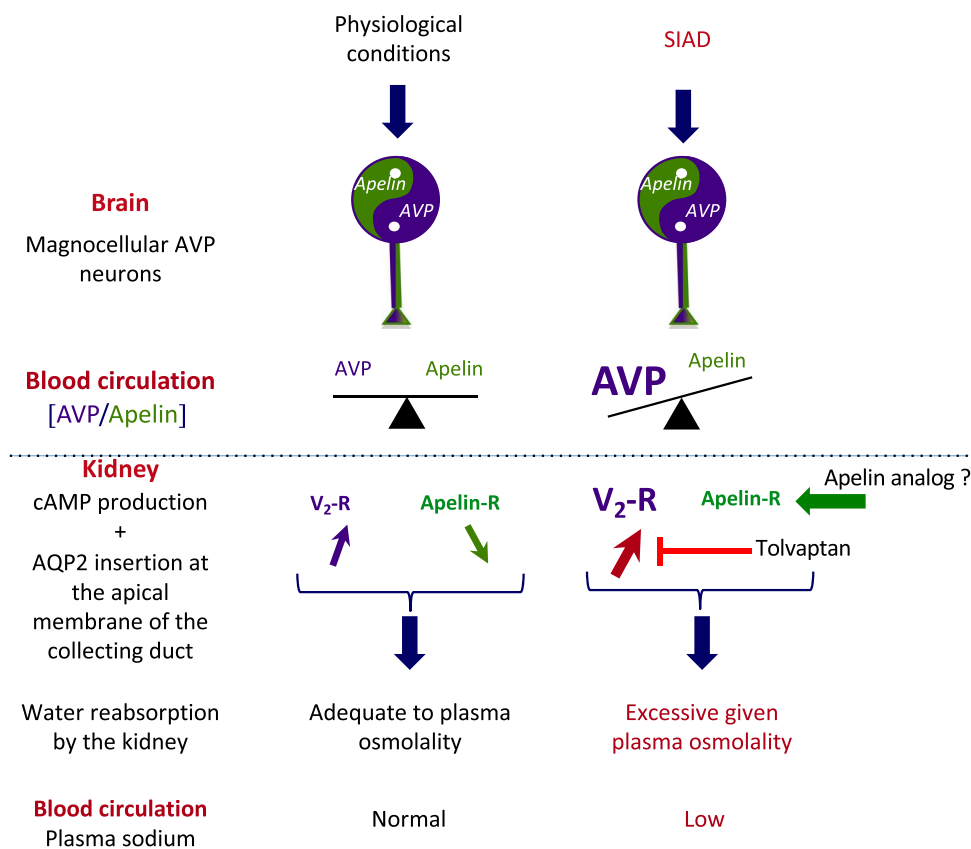


Fig. 1 Apelin and vasopressin regulation in physiological conditions and in SIAD. In physiological conditions, apelin and AVP are released in balanced proportions from the magnocellular AVP neurons at levels appropriate for plasma osmolality. In the collecting duct of the kidney, AVP acts on V₂-R to increase cAMP production and aquaporin-2 (AQP-2) insertion, leading to water reabsorption. Conversely, apelin, through its action on apelin-R, has the opposite effect. In physiological conditions, water reabsorption is adequate and plasma sodium concentrations are normal. In SIAD, AVP release is excessive relative to plasma osmolality, leading to excessive water reabsorption by the kidney and hyponatremia. Tolvaptan blocks the effect of AVP on V₂-R and corrects hyponatremia in SIAD. We hypothesize that the activation of apelin-R with a metabolically stable K17F analog, LIT01-196, would also correct water homeostasis in this disease. This figure was modified with authorization from Llorens-Cortes and Moos⁵⁴, available at https://www.neuroendo.org.uk/doc/briefing_43.pdf.

AVP levels and an increase in aqueous diuresis²⁰. Apelin-R is also expressed in the kidney, both in the glomeruli and in all nephron segments, including CD-expressing AVP V2-Rs²⁷. The intravenous (i.v.) injection of K17F into lactating rats, by decreasing AVP-induced cAMP production, inhibits the AVP-induced AQP-2 insertion into the apical membrane of CD and increases aqueous diuresis²⁸. These data were recently strengthened by the observation in a highly differentiated mouse cortical CD cell line (mpkCCD) expressing the V2-R and the apelin-R that apelin-13 decreases the (Deamino-Cys^{1,D}-Arg⁸)-vasopressin (dDAVP)-induced phosphorylation and apical membrane expression of AQP-2 after 30–60 min of treatment, and decreases dDAVP-induced AQP-2 mRNA and protein expression after 8–24 h of treatment²⁹. This suggests that the aquaretic effect of apelin is not only due to a central effect involving an inhibition of AVP release into the bloodstream, but also to a direct effect in the CD of the kidney, counteracting the antidiuretic effect of AVP mediated by V2-Rs (Fig. 1)^{30,31}. Furthermore, plasma AVP and apelin levels are conversely regulated by osmotic stimuli as well in rodents as in humans to maintain body fluid homeostasis^{20,21,32}. In hyponatremia patients with SIAD³³, plasma copeptin levels (a biomarker of AVP release into the bloodstream in humans) are high and inappropriate for plasma sodium levels³³. In addition, sex- and age-adjusted, plasma apelin concentrations were 26% higher in SIAD patients than in healthy subjects. Consequently, the balance between plasma apelin and AVP levels is not reached, as shown by the apelin to copeptin ratio as a function of natremia that was outside the 95% predicted physiological limits for plasma sodium in 86% of SIAD patients³³. This imbalance contributes to the corresponding water metabolism defect in hyponatremia patients with SIAD (Fig. 1).

We therefore hypothesized that the supplementary activation of the apelin-R by a metabolically stable K17F analog could counteract AVP-induced water reabsorption and correct hyponatremia. Because the half-life of K17F is short (in the minute range in vivo), we generated LIT01-196 (Fig. 2a), a metabolically stable K17F analog, by adding a fluorocarbon chain to the N-terminal part of K17F, to increase its plasma half-life (>24 h versus 4.6 min for K17F)²². LIT01-196 has a subnanomolar affinity for apelin-R and in vitro pharmacological profile similar to that of K17F²².

In this study, we aimed (1) to determine the in vivo half-life of LIT01-196 in the blood circulation and its capacity to enter the brain following systemic administration, (2) to verify the efficiency of LIT01-196, as compared to K17F, to inhibit dDAVP-induced cAMP production in freshly microdissected CD, (3) to define if LIT01-196 decreases the apical cell surface expression of phosphorylated AQP-2 in mpkCCD cells, (4) to determine the metabolic effects of LIT01-196 administered subcutaneously (s.c.) in alert rats, and (5) to assess whether the activation of the apelin-R by LIT01-196 decreases AVP-induced antidiuresis and improves hyponatremia in a rodent hyponatremic model, using tolvaptan as a reference aquaretic agent. Here, we show in a rat experimental model of AVP-induced hyponatremia that the s.c. administration of LIT01-196 for 2 days blocks the AVP-induced decrease in urine output and increase in urinary osmolality, leading to a progressive improvement of hyponatremia. These results provide evidence for a major role of apelin, together with AVP, in the regulation of body fluid homeostasis and suggest that the use of apelin-R agonists represents an original approach for the treatment of hyponatremia.

Results

Ability of LIT01-196 to bind and activate apelin-R. We first evaluated the ability of the new batch of LIT01-196 (300 mg),

synthesized in large quantities for in vivo experiments, to bind to apelin-R and to inhibit forskolin-induced cAMP production in Chinese hamster ovary (CHO) cells stably expressing rat apelin-R-EGFP. As previously reported²², LIT01-196, like K17F, bound to rat apelin-R with an affinity in the subnanomolar range (K_i values for K17F and LIT01-196 of 0.14 ± 0.02 and 0.34 ± 0.05 nmol/l, respectively) (Fig. S1a). In CHO cells stably expressing apelin-R-EGFP, LIT01-196 inhibited the cAMP production induced by 5 μ mol/l forskolin with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 1.7 ± 0.5 nmol/l, whereas the IC_{50} for K17F was 0.6 ± 0.2 nmol/l (Fig. S1b), as previously described²².

To ensure the selectivity of action of LIT01-196 on the apelin-R and not on the V2-R, we assessed whether LIT01-196 modified cAMP production induced by V2-R stimulation. In HEK-293 T cells expressing the human V2-R, we observed that both LIT01-196 and K17F at a supramaximal concentration of 1 μ mol/l did not modify cAMP production induced by 1 μ mol/l AVP. Furthermore, K17F or LIT01-196 alone at 1 μ mol/l did not modify basal cAMP production in these cells (Fig. 2b). We also verified that K17F and LIT01-196 were able to inhibit forskolin-induced cAMP production in a highly differentiated murine renal cortical CD principal cell line (mpkCCD cells). We found in these cells that K17F (1 μ mol/l) and LIT01-196 (1 μ mol/l) significantly inhibit cAMP production induced by forskolin (1 μ mol/l) by 33% and 32%, respectively (Fig. 2c). Finally, we checked whether K17F and LIT01-196 were able to inhibit dDAVP-induced cAMP production in mpkCCD cells. We observed that K17F (10 μ mol/l) and LIT01-196 (10 μ mol/l) inhibit dDAVP-induced cAMP production by 75% and 79%, respectively (Fig. 2d).

Effects of K17F and LIT01-196 on dDAVP-induced cAMP production in microdissected rat outer medullary collecting ducts. We previously showed that dDAVP, a specific and selective V2-R agonist, induced a maximal increase in cAMP production in rat outer medullary collecting ducts (OMCDs) at a concentration of 0.1 nmol/l, and the half-maximal effective concentration was 35 pmol/l²⁸. We show here, in the same experimental conditions, that applying dDAVP (0.1 nmol/l) to microdissected rat OMCDs increased cAMP production (92.6 ± 3.6 versus 19.3 ± 0.8 fmol cAMP/mm tubular length/10 min for dDAVP and baseline cAMP values, respectively, $p < 0.001$, $n = 6$). The co-application of dDAVP (0.1 nmol/l) with K17F or LIT01-196 in increasing concentrations (from 50 nmol/l to 50 μ mol/l) progressively and significantly inhibited dDAVP-induced cAMP production by 45% and 41%, respectively, in the OMCDs (Fig. 2e).

Effects of K17F and LIT01-196 on dDAVP-induced phosphorylation of AQP-2 in mpkCCD cells. As expected from the literature^{29,34}, we observed an increase in the phosphorylation of AQP-2 at the apical membrane of the mpkCCD cells treated with 10 nmol/l of dDAVP for 1 h. When mpkCCD cells were co-treated with K17F (10 μ mol/l) or LIT01-196 (10 μ mol/l), we observed a decrease in the phosphorylation of AQP-2 as shown by the decrease of the immunolabelling of the phospho-AQP-2 (Fig. 3). Intact cell polarity in mpkCCD cells was shown by the tight junction labeling with occludin antibody^{35,36}.

In vivo half-lives of K17F and LIT01-196. Plasma apelin levels were measured by radioimmunoassay (RIA), with the K17F antiserum that we produced and characterized in a previous study²⁰. The antibody directed against K17F recognized K17F, pE13F, and LIT01-196 with a similar affinity (IC_{50} : 0.11 ± 0.01 nmol/l for K17F, 0.26 ± 0.03 nmol/l for pE13F, 0.56 ± 0.04 nmol/l for LIT01-196; Fig. 4a). It does not recognize K16P²⁰ or Fluoro-

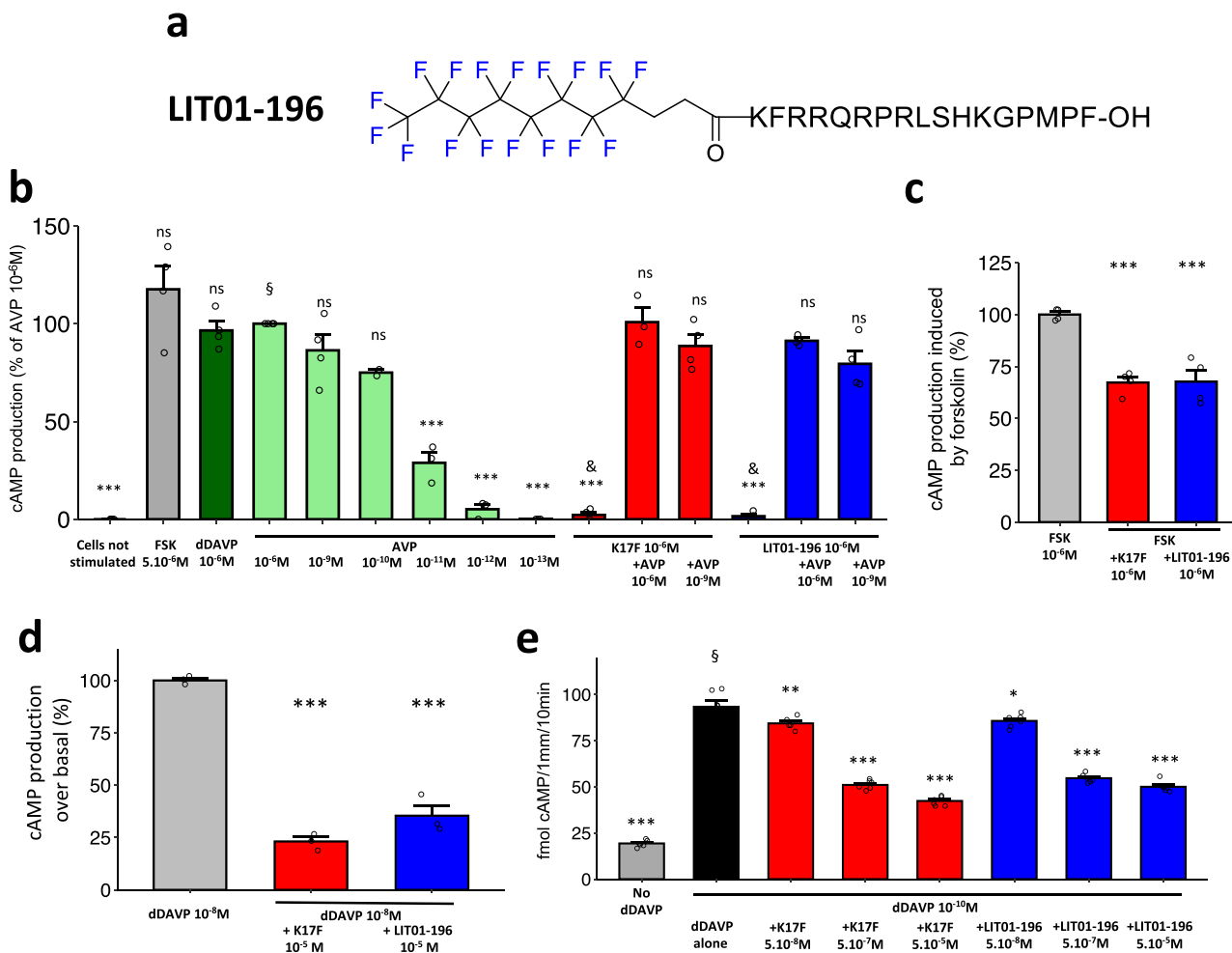


Fig. 2 In vitro and ex vivo effects of LIT01-196 on forskolin- or dDAVP-induced cAMP production. **a** Chemical structure of LIT01-196. **b** Effects of forskolin (FSK, gray bar, 5 $\mu\text{mol/l}$), dDAVP (dark green bar, 1 $\mu\text{mol/l}$), AVP (light green bars, different concentrations), K17F (red bars, 1 $\mu\text{mol/l}$) and LIT01-196 (blue bars, 1 $\mu\text{mol/l}$), and of the combination of either K17F (1 $\mu\text{mol/l}$) or LIT01-196 (1 $\mu\text{mol/l}$) with AVP (1 $\mu\text{mol/l}$ and 1 nmol/l) on cAMP production in HEK-293 T cells expressing the human V2-R. Results are expressed as the percentage of increase from basal levels (cells not stimulated) induced by AVP (1 $\mu\text{mol/l}$). Four individual determinations were performed, expressed as the mean \pm SEM. Each point was compared to AVP (1 $\mu\text{mol/l}$); & denotes the absence of statistical difference with basal levels (cells not stimulated). **c** Effects of K17F (red bars, 1 $\mu\text{mol/l}$) and LIT01-196 (blue bars, 1 $\mu\text{mol/l}$) on forskolin (1 $\mu\text{mol/l}$)-induced cAMP production in mpkCCD cells for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. Data points represent four independent experiments performed in quadruplicate and are expressed as the mean \pm SEM. $**P < 0.01$ when compared to forskolin alone. **d** Effect of K17F and LIT01-196 treatment on dDAVP-induced cAMP production. mpkCCD cells grown on permeable inserts were treated with depletion medium containing 10 nmol/l of dDAVP (gray bar) or in combination of dDAVP and 10 $\mu\text{mol/l}$ K17F (red bar) or LIT01-196 (blue bar) for 60 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. Data points represent three independent experiments performed in quadruplicate and are expressed as the mean \pm SEM. $***P < 0.001$ when compared to dDAVP alone. **e** Effects of 0.1 nmol/l dDAVP on cAMP production in microdissected rat outer medullary collecting ducts in the presence or absence of different concentrations (50 nmol/l, 500 nmol/l, and 50 $\mu\text{mol/l}$) of K17F (red bars) or LIT01-196 (blue bars). Six individual determinations were performed. Each point was compared to dDAVP (10⁻⁶ mol/l). § denotes a statistical difference ($p < 0.001$) with basal levels (No dDAVP). Groups were compared using ANOVA with Tukey's adjustment for multiple comparisons for figures (b–e). n.s. Not significant.

K16P ($\text{IC}_{50} > 1.0 \mu\text{mol/l}$ for Fluoro-K16P). We determined plasma apelin concentrations at baseline and at different times after the i.v. administration of K17F (250 nmol/kg, i.v.) or LIT01-196 (15 nmol/kg, i.v. or 900 nmol/kg, s.c.) to Sprague–Dawley rats and mice. Plasma apelin concentrations correspond to apelin levels at baseline or to apelin plus LIT01-196-immunoreactive (IR) material after LIT01-196 injection in alert control animals, thus enabling to estimate the in vivo half-life of LIT01-196. We estimated the in vivo half-life of K17F in the rat blood circulation at 50 s (Fig. 4b), accounting for the very brief (2 min) decrease in blood pressure and increase in heart rate observed in rats following the i.v. injection of K17F³⁷. In conscious mice, basal plasma apelin levels were $0.98 \pm 0.09 \text{ pmol/ml}$. Five seconds after the i.v. injection of K17F (250 nmol/kg), plasma apelin levels had

risen to $49.2 \pm 7.95 \text{ pmol/ml}$, 50 times basal levels. Plasma apelin concentration decreased rapidly after 60 s, reaching 2.8 times the basal level after 300 s (Fig. S2a). The in vivo half-life of K17F in the mouse blood circulation has been estimated at 44 s, very similar to that obtained in rats (50 s). Both i.v. and s.c. administrations of LIT01-196 to alert rats and mice led to a large increase in plasma apelin-IR levels. We estimated that the in vivo half-life of LIT01-196 in the blood circulation in alert rats was 28 min after i.v. administration (Fig. 4c) and 156 min after a s.c. administration (Fig. 4d). Using mass spectrometry, we evaluated the half-life of LIT01-196 after its injection by i.v. route at the dose of 300 nmol/kg in mice (Fig. 4e), which was estimated at 29 min, close to that obtained in rats after i.v. administration (28 min) using the RIA technique. To explain the higher plasma

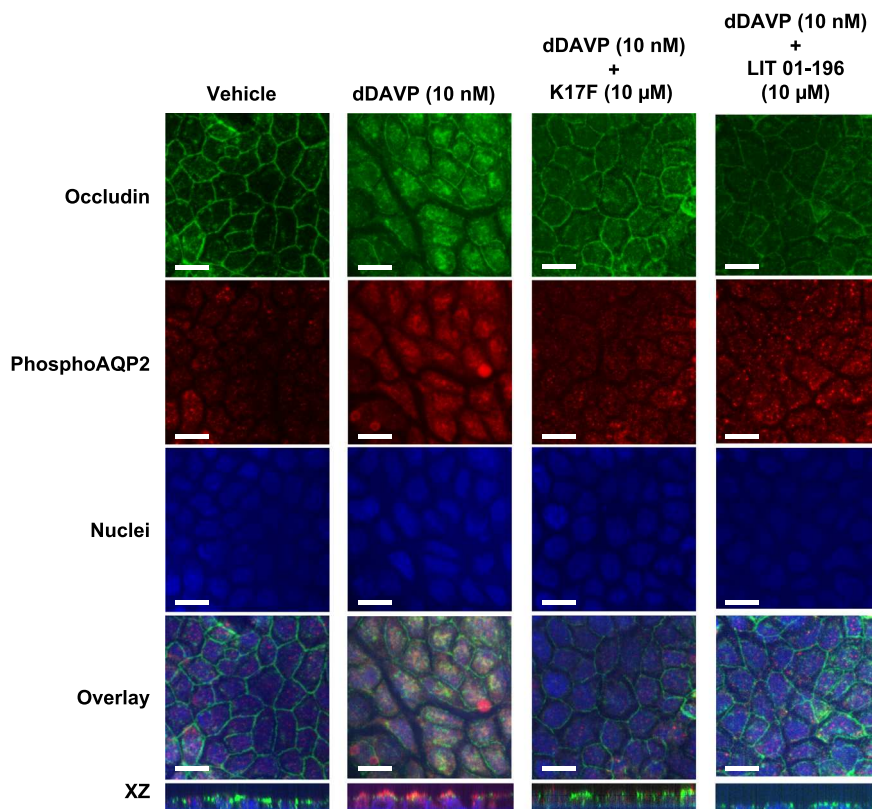


Fig. 3 Effect of K17F and LIT01-196 treatment on dDAVP-induced phosphorylation of aquaporin 2. mpkCCD cells were grown on transwell filters for 5 days. After 24 h of starvation, cells were treated with vehicle or 10 nmol/l of dDAVP with or without 10 μ mol/l of K17F or LIT01-196. Representative immunofluorescence images of three independent experiments are shown in XY and XZ plans and represent the immunofluorescence staining with an anti-occluding (green) and an anti-phospho-AQP-2 (red) and the staining of the nuclei with DAPI (blue). Bar scale = 20 μ m.

stability of LIT01-196 as compared to apelin, we explored the possibility that the fluorocarbon chain could bind to plasma proteins, resulting in the protection of the peptide from enzymatic degradation by steric hindrance. By the classical Diamon equilibrium dialysis chamber analysis³⁸, we showed that the bound fraction of LIT01-196 to plasma proteins was $69 \pm 7\%$ (value reached at equilibrium).

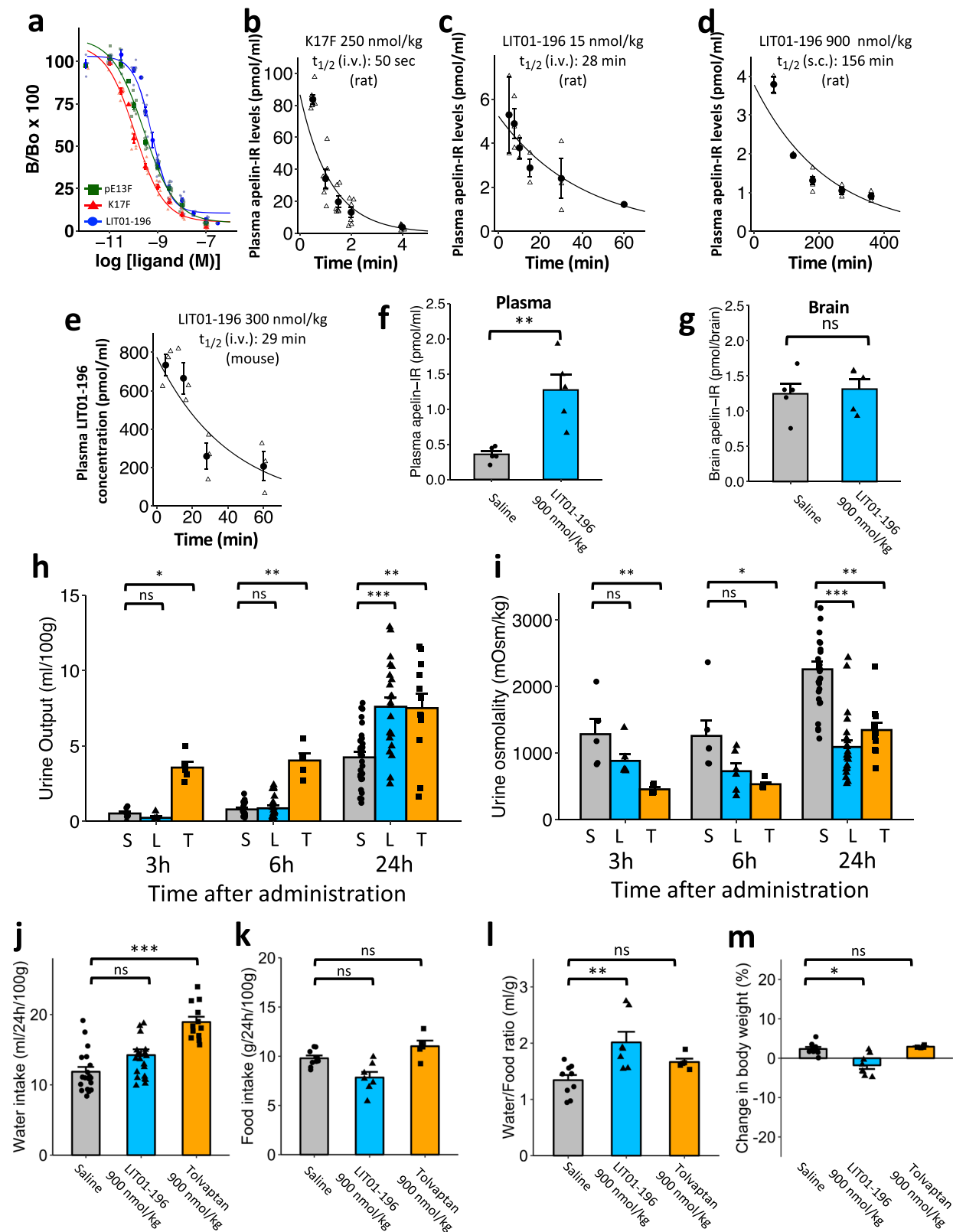
Plasma apelin levels 30 min after s.c. administration of LIT01-196 (900 nmol/kg; Fig. 4f) to Sprague–Dawley rats were 1.3 ± 0.22 pmol/ml, 3.6 times higher than basal levels (0.36 ± 0.05 pmol/ml, $p = 0.008$). Conversely, no change was observed in apelin-IR levels measured in the brain of rats treated with LIT01-196 (1.3 ± 0.14 pmol/brain) compared to basal values obtained in rats treated with saline (1.2 ± 0.15 pmol/brain, $p = 0.84$; Fig. 4g). The increase in plasma apelin-IR was also observed in mice 30 min after s.c. administration of LIT01-196 (900 nmol/kg; Fig. S2b). Plasma apelin-IR levels had risen to 12.4 ± 2.5 pmol/ml, 9.7 times basal levels (1.3 ± 0.073 pmol/ml, $p = 0.01$). At the opposite, no change was observed in apelin-IR levels measured in the brain of mice treated with LIT01-196 (0.440 ± 0.073 pmol/brain) compared to basal values obtained in mice treated with saline (0.391 ± 0.045 pmol/brain, $p = 0.8$; Fig. S2c).

Effects of K17F and LIT01-196 given by i.v. route on urine output in normonatremic rats. We evaluated the effects on urine output of an i.v. administration of K17F and LIT01-196 in control Sprague–Dawley rats. The i.v. injection of K17F (400 nmol/kg, 855 μ g/kg) induced no significant change in 24-h urine output or in urine osmolality in control rats. By contrast, the i.v. administration of LIT01-196 at a dose 27 times lower (15 nmol/kg, 51 μ g/kg) induced a 95% increase in urine output ($p < 0.05$) (Fig. S2d)

and a 38% decrease in urine osmolality ($p < 0.05$) relative to the values obtained for rats receiving saline i.v. (Fig. S2e). The i.v. administration of K17F or of LIT01-196 did not induce a significant change in water intake (Fig. S2f).

Effects of LIT01-196 and tolvaptan given by s.c. route on metabolic parameters in normonatremic rats. We first determined in normonatremic rats the optimal dose of LIT01-196 to induce aqueous diuresis. Subcutaneous LIT01-196 from 300 to 900 nmol/kg induced a progressive increase in diuresis and a decrease in urine osmolality. The maximal effect was observed for doses comprised between 900 and 2400 nmol/kg. The effects of LIT01-196 and tolvaptan on urine output and osmolality were similar at an equimolar dose of 900 nmol/kg. However, increasing the dose of tolvaptan to 6700 nmol/kg was associated with an increased effect on urine output and urine osmolality, while increasing the dose of LIT01-196 to 2400 nmol/kg did not significantly increase its aquaretic effect (Fig. S3a, b). We thus used the dose of 900 nmol/kg to study the effects LIT01-196, and compared them to both the equimolar dose of tolvaptan and to a higher dose.

In addition, we compared the kinetics of the effects of LIT01-196 and tolvaptan on metabolic parameters in alert normonatremic Sprague–Dawley rats. Relative to saline ($n = 29$), LIT01-196 (900 nmol/kg, $n = 23$), and tolvaptan (900 nmol/kg, $n = 12$) significantly increased 24-h urine output by 79% and 77%, respectively. Urine osmolality decreased similarly in the two groups, by 52% in animals receiving LIT01-196 and 40% in animals receiving tolvaptan. Although the aquaretic effect of tolvaptan was significant at 3, 6, and 24 h after s.c. administration, the aquaretic effect of LIT01-196 was only significant 12 and 24 h after s.c. administration, showing an effect occurring later with



this compound (Fig. 4h, i and Fig. S3c, d). Timing of the aquaretic effect of LIT01-196 depends on its mode of administration since its i.v. administration was previously shown to increase urine output in anesthetized female rats, 2 h after administration²².

In order to assess the possibility of diurnal fluctuations of the aquaretic effect of LIT01-196, we compared the effects on urine

output and urine osmolality of the s.c. administration of LIT01-196 (900 nmol/kg) administered at 8 a.m. and at 8 p.m. We found that the aquaretic effect of LIT01-196 was independent of the time of administration (Fig. S3c, d).

Increasing the dose of LIT01-196 to 2400 nmol/kg did not result in an earlier effect on aqueous diuresis (Fig. S3e, f). The increase

Fig. 4 In vivo half-life of K17F and LIT01-196 and effects of s.c. saline, tolvaptan, LIT01-196 on water metabolism, food intake, body weight, and plasma electrolytes in control rats. **a** Inhibition of [¹²⁵I]-pE13F binding to anti-K17F serum (1/4500 final dilution) by unlabeled K17F (six independent experiments, red triangles), pE13F (seven independent experiments, green squares), or LIT01-196 (eight independent experiments, blue circles). Data are expressed as a percentage of the maximal binding of [¹²⁵I]-pE13F in the absence of non-radiolabeled ligand. **b** In vivo half-life of K17F following i.v. administration in rats. K17F (250 nmol/kg i.v.) was injected in alert rats. **c** In vivo half-life of LIT01-196 following i.v. administration in rats. LIT01-196 (15 nmol/kg i.v.) was administered to alert rats. **d** In vivo half-life of LIT01-196 following s.c. administration (900 nmol/kg) in rats. In figures (**b**)–(**d**), animals (*n* provided in Supplementary Table 1) were killed at various times following injection, trunk blood was collected, and plasma apelin-immunoreactive levels were determined in a radioimmunoassay. **e** In vivo half-life of LIT01-196 following i.v. administration in mice (three animals per time point). LIT01-196 (300 nmol/kg i.v.) was administered to alert mice and plasma LIT01-196 concentration was determined by mass spectrometry analysis. **f** Plasma and **g** brain apelin-immunoreactive levels in rats (*n* = 5 animals per group) 30 min after subcutaneous administration of saline (gray bars, circles) or of LIT01-196 (900 nmol/kg, blue bars, triangles). **h–m** In vivo effects of s.c. saline, tolvaptan, and LIT01-196. Evaluation of the effect of saline (1 ml/kg, *n* = 29 animals); LIT01-196 (900 nmol/kg, *n* = 23 animals) and tolvaptan (900 nmol/kg, *n* = 12 animals) in alert male Sprague–Dawley (SD) rats given normal chow on (**h**) urine output and (**i**) urine osmolality measured 3, 6, and 24 h after saline (S, gray bars, circles), LIT01-196 (L, blue bars, triangles), and tolvaptan (T, orange bars, squares). Metabolic parameters were measured 24 h after the s.c. administration of saline, LIT01-196, or tolvaptan (**j**, water intake; **k**, food intake; **l**, water to food intake ratio; **m**, body weight change). Data are shown as mean ± SEM. Multiple comparisons performed by Kruskal–Wallis, followed by post hoc Dunn's tests with Holm's adjustment. n.s.: *P* > 0.05, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001.

in urine output was associated with a significant increase in water intake (Fig. 4j) in the tolvaptan group (+37%) and a slight increase in the LIT01-196 group (+11%). Food (normal chow) intake (Fig. 4k) was similar in the saline and the tolvaptan groups, but slightly and non-significantly lower in animals receiving LIT01-196 (20% decrease). Water intake to food intake ratio was significantly increased by 50% in the LIT01-196 group and non-significantly increased by 24% in the tolvaptan group (Fig. 4l). A slight weight loss (−1.8%) (Fig. 4m) was observed in the LIT01-196 group.

Tolvaptan at a higher dose (6700 nmol/kg, *n* = 13) induced a larger aquaretic effect than LIT01-196 at both 900 and 2400 nmol/kg (Fig. S4a, b), which occurred more rapidly than with LIT01-196 (Fig. S3e, f). LIT01-196 (900 nmol/kg) significantly increased free water excretion fraction by 86%, while tolvaptan (6700 nmol/kg) induced a similar but non-significant increase (Fig. S4c). Sodium excretion fraction (Fig. S4d) was not changed by the administration of LIT01-196 (900 nmol/kg) or tolvaptan (6700 nmol/kg).

Effects of LIT01-196 and tolvaptan on plasma AVP and apelin levels in control rats. Plasma AVP and apelin (apelin-IR material) levels were measured 3 h after the s.c. administration of saline (*n* = 7), tolvaptan (6700 nmol/kg s.c., *n* = 6), and LIT01-196 (900 nmol/kg s.c., *n* = 7) into alert rats (Fig. S4e–g). Rats receiving tolvaptan had significantly higher plasma AVP levels (147% higher; *P* < 0.001) than control animals receiving saline, while only a modest increase in plasma AVP levels was observed in rats receiving LIT01-196 (37% higher; *P* = 0.021).

Plasma apelin-IR levels in control rats (receiving saline) and in rats receiving tolvaptan were similar. Plasma apelin-IR levels in rats receiving LIT01-196 were significantly higher (185%) than those in control rats (*p* < 0.001). Plasma apelin/AVP ratio was similar in rats receiving tolvaptan or saline, but was higher in rats receiving LIT01-196 (105% higher than in control rats; *p* = 0.038).

Effects of LIT01-196 on blood pressure, cardiac contractility, kidney function, and blood glucose. Following s.c. injection of LIT01-196 (900 nmol/kg) in alert Sprague–Dawley rats, mean arterial blood pressure (MABP) decreased slightly 3 h after administration, and this change did not reach statistical significance (baseline MABP, 106 ± 2 mmHg, MABP 3 h after LIT01-196 administration, 94 ± 2 mmHg, *p* = 0.063, *n* = 5). MABP measured 24 h after administration of LIT01-196 did not significantly differ from baseline (*p* = 0.88) (Fig. S5a). We also evaluated the effects of s.c. LIT01-196 administration on left

ventricular ejection fraction (LVEF) estimated by echocardiography in mice (*n* = 5) and did not observe any significant effect at the slightly higher dose of 1200 nmol/kg (LVEF 3 h after administration, 57.1 ± 0.7 versus 52.6 ± 3.0% before administration, *p* = 0.31) (Fig. S5b). Following the s.c. administration of LIT01-196 at the dose of 900 nmol/kg for 4 consecutive days, we performed histological analysis of the kidneys that did not reveal any abnormality (Fig. S5c–f). Blood creatinine, urea nitrogen, sodium, and potassium levels (Fig. S5g–j) were not changed by LIT01-196 treatment. Repeated administration of LIT01-196 (900 nmol/kg, s.c.) to normonatremic Sprague–Dawley rats was not associated with a change in plasma or urine glucose levels (Fig. S5k, l).

Establishment of a rodent model of AVP-induced hyponatremia.

We established a rodent model of AVP-induced hyponatremia by administering AVP subcutaneously and continuously via an osmotic minipump in male Sprague–Dawley rats placed in metabolic cages and fed a liquid diet. The effects of different doses of AVP on urine output, urine osmolality and plasma sodium, water, and food intake were evaluated. For a dose of 30 or 50 ng AVP/h, urine output decreased during the 4 days following insertion of the osmotic minipump (mean decrease of 61% in rats receiving AVP at a dose of 30 ng/h relative to rats receiving saline), urine osmolality increased by 455%, and plasma sodium concentration decreased by 26% (*p* < 0.001 for urine output, urine osmolality, and plasma sodium). Animals treated with AVP at a dose of 30 ng/h or higher also decreased their food and water intake (*p* < 0.001) (Fig. S6). Little or no effect was observed with a lower dose of AVP (20 ng AVP/h). A moderate decrease in body weight was observed during the experiment in both hyponatremic and normonatremic animals, even in the absence of AVP administration, but weight loss was significantly greater in animals receiving 30 ng/h AVP or more (Fig. S6d). The experiment was stopped after 5 days because some of the animals had lost >20% of their body weight, the acceptable limit established with the ethics committee. The minimum effective dose of AVP (30 ng/h) was therefore used to study the effects of aquaretic agents on AVP-induced hyponatremia.

Determination of the optimal dose of LIT01-196 in hyponatremic rats.

We then determined that the administration of both LIT01-196 and tolvaptan, at the dose of 900 nmol/kg, induced a similar increase in diuresis in the 24 h following s.c. administration in rats receiving 30 ng/h AVP and a liquid diet (increase of 11.7 ± 2.3 and 9.5 ± 2.9 ml/24 h/100 g, respectively). In contrast,

urine output did not change 24 h after administration of saline. The use of a lower dose of LIT01-196 (180 nmol/kg s.c.) was associated with a smaller increase of urine output (increase of 1.5 ± 2.0 ml/24 h/100 g), while increasing the dose of LIT01-196 to 2400 nmol/kg did not increase the effect of the compound on urine output (increase of 9.2 ± 4.1 ml/24 h/100 g). In contrast, increasing the dose of tolvaptan to 6700 nmol/kg led to an even greater increase in urine output (increase of 27 ± 9.0 ml/24 h/100 g). Given these results, we used the identical dose of 900 nmol/kg to compare the metabolic effects of LIT01-196 and tolvaptan in a model of AVP-induced hyponatremia.

Evaluation of the effects of LIT01-196 and tolvaptan in a model of AVP-induced hyponatremia. As described above, a mini-pump administering 30 ng AVP/h s.c. was implanted 2 days before the administration of an aquaretic treatment (tolvaptan or LIT01-196) or saline, and all animals received a semi-liquid diet (50% water, 50% gel diet, as described in “Methods”). Water consumption included water mixed with the food as well as water consumed from the bottle (experimental protocol; Fig. 5a). Four experimental groups were studied: the control group (receiving no AVP, $n = 7$), the AVP + saline group (continuous s.c. infusion of 30 ng AVP/h + saline 1 ml/kg s.c. on days 0 and 1, $n = 13$), the AVP + tolvaptan group (30 ng AVP/h s.c. + tolvaptan 900 nmol/kg s.c. on days 0 and 1, $n = 12$), and the AVP + LIT01-196 group (30 ng AVP/h s.c. + LIT01-196 900 nmol/kg s.c. on days 0 and 1, $n = 9$). On day 0, before treatment administration, plasma sodium levels were low and similar in all animals receiving AVP (103 ± 1 , 103 ± 1 , and 101 ± 3 mmol/l, $p = 0.6$, for the AVP + saline, AVP + tolvaptan, and AVP + LIT01-196 groups, respectively). Animals receiving AVP + saline had significantly lower urine output than controls (49% lower on average between days 1 and 2, $P = 0.002$), higher urine osmolality (355% higher, $P < 0.001$), lower water intake (59% lower, $P < 0.001$), and lower plasma sodium levels (27% lower, $P < 0.001$). These parameters remained stable from days 0 to 2 (Fig. 5b–e).

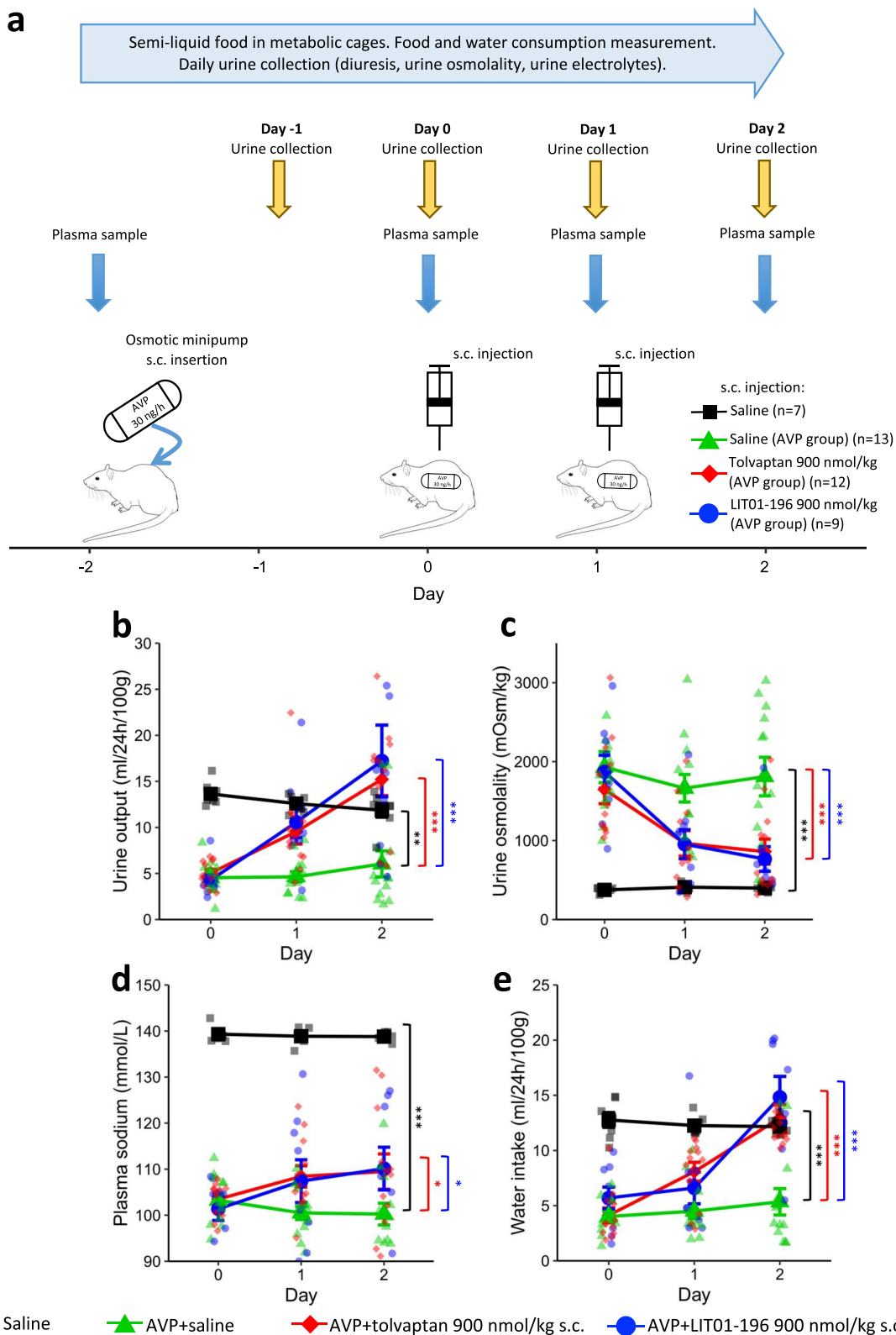
We then evaluated the effects of LIT01-196 in hyponatremic rats. The model was set up as described above, and LIT01-196 (900 nmol/kg s.c.) was administered on days 0 and 1. Relative to AVP-treated animals receiving saline, the LIT01-196-treated animals had significantly higher urine output (185% higher, on average, from days 1 to 2, relative to the AVP + saline group, $P < 0.001$), and lower urine osmolality (58% lower, $P < 0.001$). An increase in plasma sodium concentration was observed on day 1, 24 h after the first administration of LIT01-196, relative to animals receiving saline (109 ± 5 versus 100 ± 2 mmol/l), and on day 2 (110 ± 5 versus 100 ± 2 mmol/l), and plasma sodium concentration after LIT01-196 administration were significantly higher than in the AVP + saline group ($P = 0.042$). Following treatment with LIT01-196, AVP-treated animals had 177% higher levels of water consumption (including water in diet), on average, from days 1 to 2 ($P < 0.001$, versus the AVP + saline group) (Fig. 5b–e). LIT01-196 treatment was associated with a significant increase in food consumption, and thereby a significant increase in sodium intake. Body weight change from baseline was similar in AVP-treated animals receiving LIT01-196 and saline (Fig. S7). Subcutaneous administration of tolvaptan at the same dose (900 nmol/kg) on days 0 and 1 was associated with a similar effect on urine output, urine osmolality, plasma sodium, and water intake (Fig. 5b–e).

Plasma AVP and apelin levels following the administration of LIT01-196 or tolvaptan in hyponatremic rats. Plasma AVP and apelin-IR levels were measured after the continuous administration of AVP (30 ng/h) for 48 h in male Sprague–Dawley rats receiving a semi-liquid diet, 3 h after the administration of saline

(AVP + saline), LIT01-196 (900 nmol/kg, AVP + LIT01-196), or tolvaptan (6700 nmol/kg, AVP + tolvaptan) and in rats receiving the same diet but no AVP (Fig. 6). The continuous administration of AVP (30 ng/h) for 48 h significantly increased plasma AVP levels by 120% in animals receiving AVP + saline (Fig. 6a). No significant difference in AVP levels was observed between AVP-treated rats receiving saline or LIT01-196. Plasma apelin levels were similar in animals receiving no AVP and in those receiving AVP + saline, but plasma apelin-IR material levels were 372% higher in rats receiving AVP + LIT01-196 than in rats receiving AVP + saline, because the antibody against K17F recognizes K17F and LIT01-196 with similar affinity (Fig. 6b). In hyponatremic rats, LIT01-196 treatment increased plasma apelin-IR/AVP ratio by 518% relative to rats receiving saline (Fig. 6c). Plasma AVP and apelin levels in rats receiving AVP + tolvaptan were similar to those in animals receiving AVP + saline.

Discussion

LIT01-196 was previously shown to display, like K17F, full agonist activity for the apelin-R stably expressed in CHO cells, for inhibiting forskolin-induced cAMP production, inducing ERK1/2 phosphorylation, apelin-R internalization, and β -arrestin recruitment²². In addition, LIT01-196 has a plasma half-life superior to 24 h versus 4.6 min for K17F²². In the present study, we show that LIT01-196, similarly to K17F, dose-dependently inhibits dDAVP-induced cAMP production in CHO cells stably expressing both the apelin-R and the V2-R. In contrast, LIT01-196, even at a supramaximal concentration of 1 μ mol/l, does not inhibit AVP-induced cAMP production in HEK-293 T cells, that overexpress V2-R but not apelin-R. This indicates that LIT01-196 does not inhibit dDAVP- or AVP-induced cAMP production by binding to the V2-R and acting as a V2-R antagonist. Hence, LIT01-196 by binding to the apelin-R activates Gi protein coupling, counteracting the increase in cAMP production induced by dDAVP or AVP via Gs protein coupling of the V2-R. Additional evidence that the inhibitory effect of LIT01-196 on dDAVP-induced cAMP production occurs via a non-V2-mediated mechanism is provided by the fact that LIT01-196, like K17F, inhibits forskolin-induced cAMP production in mpkCCD cells, a collecting duct principal cell line expressing both the V2-R and the apelin-R^{29,34}. We also show that LIT01-196, similarly to K17F²⁸, inhibits the increase in cAMP production induced by dDAVP both in mpkCCD cells and in freshly microdissected rat OMCD, a more physiological preparation. To investigate if the inhibition by LIT01-196 of the cAMP production induced by dDAVP results in a decrease in AQP-2 translocation to the apical membrane, we show in mpkCCD cells that LIT01-196 greatly reduces dDAVP-induced apical cell surface expression of phosphorylated AQP-2. These data are in agreement with previous studies showing that i.v. administration of K17F into lactating rats inhibited the AVP-induced AQP-2 insertion into the apical membrane of the CD and increased aqueous diuresis by decreasing AVP-induced cAMP production in the CD²⁸. These data suggested that systemic LIT01-196 administration in rats could induce an increase in aqueous diuresis. Before assessing the in vivo metabolic effects of LIT01-196, we first investigated the in vivo half-life of LIT01-196 in the blood circulation after i.v. administration in alert control mice and rats, by using two methods, mass spectrometry analysis and RIA. Both yielded similar results, 29 and 28 min, respectively, for LIT01-196 versus only 44 and 50 s for K17F after i.v. administration in mice and rats, respectively. We then showed in alert control rats that LIT01-196 had an in vivo half-life in the bloodstream of 156 min after s.c. administration. The increase of the in vivo half-life of LIT01-196 in the blood circulation is probably due to the binding



of LIT01-196 to plasma proteins leading to the protection from enzymatic degradation and the reduction of renal clearance, as LIT01-196 has a 69% binding to plasma proteins. This led to evaluate the effects of LIT01-196 on water metabolism.

The s.c. administration of LIT01-196 (900 nmol/kg) in control rats increases urine output, decreases urine osmolality, modestly increases water intake, water intake/food intake ratio, and

increases free water clearance while fractional sodium excretion is unchanged, demonstrating an aquaretic effect. This effect of LIT01-196 is independent of the circadian rhythm since similar aqueous diuresis is observed following administration of LIT01-196 at 8 a.m. or 8 p.m. These data are similar to those obtained with tolvaptan, used as a positive control, and administered at an equimolar dose, except for the increase in water intake, which is

Fig. 5 Effects of saline, tolvaptan, and LIT01-196 on water metabolism and plasma electrolytes in hyponatremic rats. **a** Experimental protocol for generating hyponatremia. On day -2 , a plasma sample was collected from the tail vein of each animal (male SD rats). Except for the control group, which received no AVP, a subcutaneous osmotic minipump delivering AVP at a rate of 30 ng/h was then implanted into each animal. All the animals were given semi-liquid food. On day 0, a plasma sample was collected and each animal treated with AVP received a s.c. injection of saline (green curve and triangles, 1 ml/kg, $n = 13$ animals), tolvaptan (red curve and diamonds, 900 nmol/kg, $n = 12$ animals), or LIT01-196 (blue curve and circles, 900 nmol/kg, $n = 9$ animals). Animals not treated with AVP received a s.c. injection of saline (black curve and squares, $n = 7$ animals). On day 1, plasma samples were obtained and each animal received another administration of the same treatment. On day 2, a final plasma sample was collected and the animals were killed. Urine output was measured and analyzed every day from days -1 to 2, and water and food intake were also measured daily. Change in 24-h urine output (**b**), urine osmolality (**c**), plasma sodium concentration (**d**), and water intake (including water in the bottle and in the food) (**e**) in animals receiving continuous s.c. AVP at a rate of 30 ng/h from days -2 to 2, and a s.c. injection of saline, tolvaptan, or LIT01-196 on days 0 and 1. Data are shown as mean \pm SEM. Each group was compared with the AVP + saline group with a linear mixed-effects model, to take repeated measurements over time into account; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

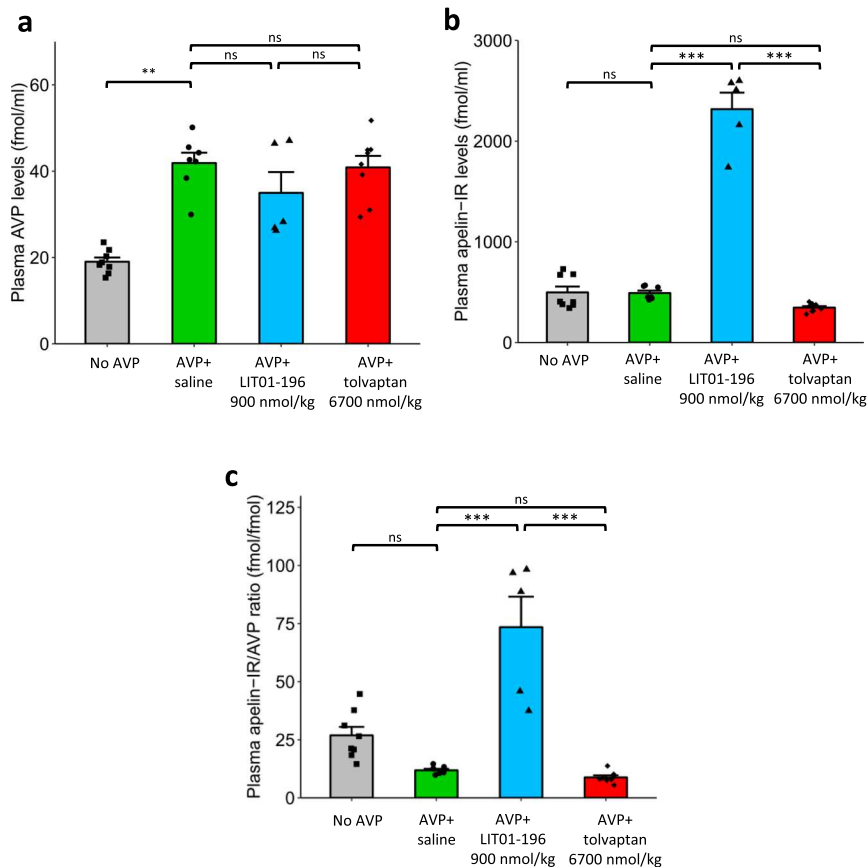


Fig. 6 Plasma AVP and apelin levels in hyponatremic rats receiving saline, LIT01-196, and tolvaptan, relative to normonatremic rats. Measurements of plasma AVP levels (**a**), plasma apelin-IR levels (**b**), and plasma apelin-IR/AVP ratios (**c**) in alert male Sprague-Dawley rats receiving a semi-liquid diet and no AVP (gray bars, squares, $n = 8$ animals), a 48-h s.c. infusion of AVP at a rate of 30 ng/h together with a s.c. injection of saline (green bars, circles, 1 ml/kg, $n = 7$ animals), LIT01-196 (blue bars, triangles, 900 nmol/kg, $n = 5$ animals) or tolvaptan (red bars, diamonds, 6700 nmol/kg, $n = 8$ animals) 3 h before blood collection. Data are shown as mean \pm SEM. Multiple comparisons performed by ANOVA with Tukey's adjustment for multiple comparisons. n.s.: $P > 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

higher with tolvaptan (+37%) than with LIT01-196 (+11%). The slight increase in water intake induced by LIT01-196 could be related to the fact that intracerebroventricular (i.c.v.) administration of apelin-13 in water-deprived rats reduces water intake²⁴, although it increases water intake in normally hydrated mice³⁹. Moreover, in patients with primary polydipsia, plasma apelin levels are lower than in healthy volunteers⁴⁰. Altogether, these results suggest that activation of the apelin receptor may limit water intake associated with aquaresis, without abnormally increasing plasma osmolality.

As we previously showed that i.c.v. administration of K17F, by reducing the release of AVP from the posterior pituitary into the

bloodstream, increased diuresis in lactating rats²⁰, it was important to determine whether LIT01-196 given by s.c. route acted through central and/or renal action. Especially, we wanted to determine if LIT01-196 could cross the blood-brain barrier (BBB) after systemic administration. Neuronal apelinergic fibers have been visualized in the lamina terminalis of rats, along the anteroventral third ventricle region, including the subfornical organ (SFO), the organum vasculosum and the median preoptic nucleus²⁵. These structures are all interconnected and project both excitatory and inhibitory signals to the SON and PVN⁴¹ to regulate the activity of AVP/apelin magnocellular neurons, which also express apelin-R^{20,24}. We show here in rats and in mice that 30 min after s.c. injection of LIT01-196

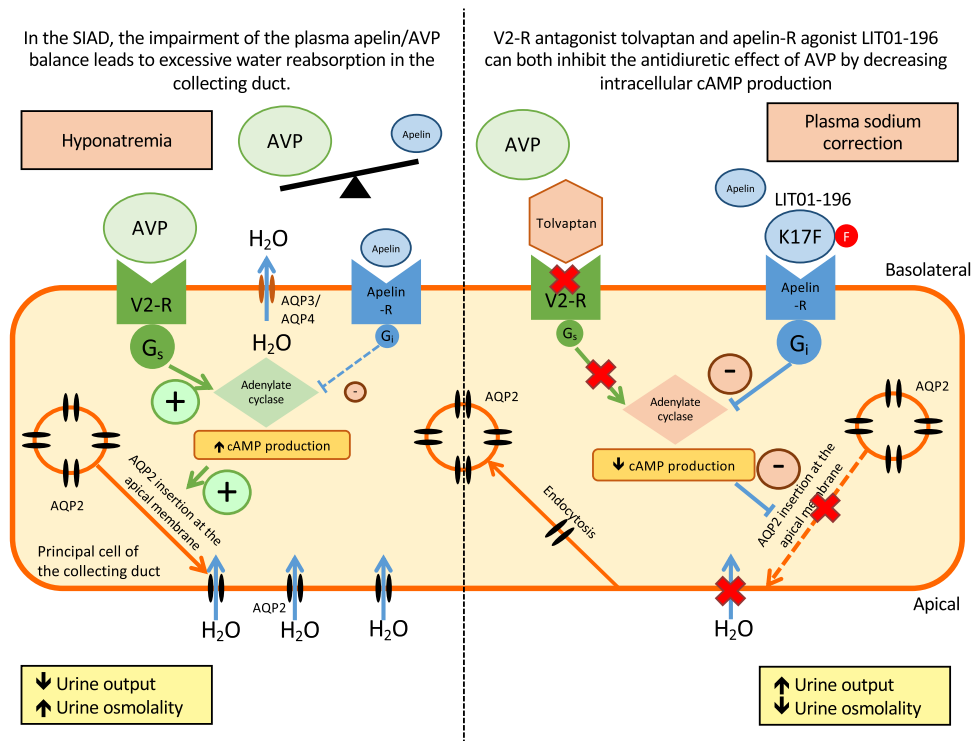


Fig. 7 Proposed model of the effects of LIT01-196 on the principal cell of the collecting duct in SIAD. This figure was modified from Flahault et al.³¹, available at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2017.00120/full>.

(900 nmol/kg), the compound is abundant in the blood circulation, but absent in the brain, showing that LIT01-196 does not cross the BBB and does not enter the brain. Furthermore, knowing that among the circumventricular organs, only the SFO expresses apelin-R mRNA⁴² and that the administration of LIT01-196 by s.c. route at the dose of 900 nmol/kg does not decrease AVP release in the blood circulation, our results suggest that LIT01-196 given by s.c. route at this dose does not act on the SFO to regulate magnocellular vasopressinergic neuron activity and systemic AVP release. Therefore, the observed effects of LIT01-196 administered s.c. on water metabolism result from the action of the compound at the kidney level.

As the s.c. administration of LIT01-196 increased aqueous diuresis, we investigated whether LIT01-196 could be used to reverse the antidiuretic effect of AVP in vivo. AVP infusion has been shown to induce hyponatremia efficiently^{43,44}, and did not induce excessive mortality⁴³. We therefore chose to use AVP to induce hyponatremia in rodents, to obtain an SIAD model resembling the disease observed in humans. We found that a continuous s.c. infusion of AVP (30 ng/h) for four days, together with a semi-liquid diet, led to a decrease in urine output and an increase in urine osmolality. We established that, at this dose, plasma AVP levels were 120% higher than those in rats receiving saline, and that plasma sodium levels were decreased and stable at ~100 mmol/l for 2–4 days after the initiation of AVP infusion. LIT01-196 administered in this rat hyponatremic model at the dose of 900 nmol/kg, for 2 days, via the s.c. route, inhibited the effects of AVP on urine output and urine osmolality efficiently, and induced a progressive correction of plasma sodium levels. Considering the ex vivo and in vivo data, this suggests that LIT01-196, by acting on apelin-R present in the CD, inhibits the AVP-induced cAMP production, thereby inhibiting the insertion of AQP-2 at the apical membrane of the CD, resulting in the inhibition of water reabsorption by the kidney and an increase in aqueous diuresis (Fig. 7).

As expected from the previous studies⁷, tolvaptan also inhibited the antidiuretic effects of AVP. However, while tolvaptan and LIT01-196 at the same dose of 900 nmol/kg resulted in similar aquaretic effects in both control and hyponatremic rats, increasing the dose of tolvaptan resulted in an even larger increase in urine output, while increasing the dose of LIT01-196 did not. Therefore, we cannot exclude a lower clinical efficacy of LIT01-196, as compared to tolvaptan, in the treatment of water metabolism disorders. However, activating the apelin-R and thus modifying the apelin/AVP balance in the collecting duct, rather than blocking the effects of AVP, results in less severe polyuria and may be better tolerated than V2-R antagonists.

The apelin-R is widely expressed, as opposed to the V2-R, which could result in unwanted effects following LIT01-196 administration. Apelin has been reported in rodents to induce a transient decrease in blood pressure⁴⁵, to increase cardiac contractility⁴⁶ and to improve glucose tolerance⁴⁷. However, LIT01-196 (900 nmol/kg) given by s.c. route in Sprague–Dawley rats did not significantly modify MABP, blood glucose levels, and kidney function. LIT01-196 (1200 nmol/kg s.c.) did not modify LVEF in mice. Repeated administrations of LIT01-196 were not associated with renal failure or histological alterations of the kidney, and plasma sodium, potassium, and glucose levels were not affected by LIT01-196 administration in control rats. The various physiological effects associated with the activation of the apelin-R result from the activation of different signaling pathways. Hence, the development of biased apelin-R agonists that specifically target the protein Gi signaling pathway may improve their specificity of action regarding water metabolism.

In conclusion, LIT01-196 is a potent metabolically stable K17F analog that acts as an aquaretic agent. Our model mimics a clinical situation in which the osmotic regulation of circulating AVP levels is impaired, causing SIAD. In this context, LIT01-196 can inhibit the antidiuretic effect of AVP, by increasing urine output, decreasing urine osmolality, moderately enhancing water

intake, and progressively correcting hyponatremia. Furthermore, our study constitutes a proof of concept that through the activation of apelin-R, metabolically stable apelin analogs represent promising candidates for the treatment of SIAD. Whether apelin-R agonists could also be beneficial in pathological situations where AVP secretion is in excess and plasma apelin levels are decreased, such as ADPKD⁴⁸, remain to be determined.

Methods

Study design. Sample size was determined before the study. For the hyponatremia study, the detection of a mean difference in plasma sodium concentration of 5 mmol/l (expected standard deviation of 3 mmol/l) between the treatment group and the control group would require the inclusion of at least eight animals in each treatment group. AVP-treated animals with an insufficient antidiuretic response (urinary osmolality <850 mOsm/kg) were excluded. The experimental design is described in Fig. 4a. AVP-treated animals were randomly assigned to treatment groups. Blinding was not feasible for treatment administration and sample collection, but the investigators were not aware of the treatment group during sample analysis. Each in vitro experiment was performed at least three times in triplicate.

Drugs, antibodies, and reagents. K17F was synthesized by PolyPeptide Laboratories (Strasbourg, France). AVP and dDAVP were obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Tolvaptan was obtained from Activate Scientific (Prien, Germany). LIT01-196 (300 mg) was synthesized by the Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (CNRS UMR7200, Illkirch, France) as previously described²². [¹²⁵I]-pE13F (monoiodinated on Lys⁸ with Bolton–Hunter reagent) and [¹²⁵I]-Tyr2Arg8-AVP were purchased from PerkinElmer (Wellesley, MA, USA). A specific AVP-[Arg8] antibody was obtained from Peninsula Laboratories International (San Carlo, CA, USA), and used with a 1/4.5 dilution. Rabbit polyclonal antibodies directed against the apelin fragment K17F were produced in the laboratory, as previously described, and used with a 1/4500 dilution²⁴. Sodium heparinate, lithium heparinate, and EDTA were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Isoflurane (Isovet) and meloxicam (Metacam) were obtained from Centravet (Nancy, France). Drugs administered s.c. were diluted in 0.9% NaCl (saline, 1 ml/kg) for injection, except for tolvaptan, which was administered in 100% dimethyl sulfoxide (0.2 ml/kg) due to its poor solubility in water. Drugs were administered in the morning (at ~8 a.m.) in all experiments, unless otherwise specified.

Animals. Male Swiss mice (25–30 g, 4–6 weeks) and male Sprague–Dawley rats (210–230 g, 6–8 weeks) were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). While housed in our animal facility, they were given free access to normal chow and water, and they were maintained under 12-h light/dark cycles throughout the study. Temperature was maintained between 18 and 22 °C, and humidity between 40 and 60%. When required for i.v. administration, a right femoral venous catheter was implanted in the rats, by tunneling under the skin, under isoflurane anesthesia (4% for induction, 2% for maintenance). Meloxicam (Metacam) was administered postoperatively (1 mg/kg s.c.) for analgesia. All experiments were carried out in accordance with current international guidelines for the care and use of experimental animals, and the experimental protocols were approved by the national animal ethics committee (CEEA, reference numbers 2016-10#3672, 2017-01 #7844 and 01966.02) and ethics regional committee for animal experimentation in Strasbourg (APAFIS reference number 1341#2015080309399690).

Cell line sources and culture conditions. CHO-K1 cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and were maintained in Ham's F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 0.5 mmol/l glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. HEK-293 T cells were obtained from Cancer Research UK, London Research Institute and were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) medium supplemented with 10% fetal calf serum, 0.5 mmol/l glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. A highly differentiated murine renal cortical collecting duct principal cell (CCD) line, mpkCCDcl³⁴, which had retained the main characteristics of the parental CCDs from which they were derived was used⁴⁹. This cell line was provided by Dr. Michel-Robert Popoff from the Pasteur Institute who previously performed studies on these cells⁵⁰. mpkCCD cells were grown in 1:1 (vol/vol) Ham's F12: DMEM medium supplemented with 2% fetal calf serum, 20 mmol/l D-glucose, 20 mmol/l HEPES, 1% penicillin/streptomycin, 5 µg/ml insulin, 50 nmol/l dexamethasone, 60 nmol/l sodium selenate, 1 nmol/l triiodothyronine, 10 ng/ml Epidermal Growth Factor, and 5 µg/ml transferrin.

Microdissection of rat OMCDs. The left kidney of male rats was prepared for nephron microdissection, as previously described⁵¹. Pieces of OMCDs were isolated under a stereomicroscope.

Membrane preparations and radioligand binding experiments. Membranes from CHO cells stably expressing rat apelin-R-EGFP were prepared as previously described²³. We compared the affinities of K17F and the new batch of LIT01-196 by performing classical binding studies with pE13F (Bolton–Hunter radiiodinated on the lysine residue in position 8) as the radioligand. Briefly, membrane preparations (0.5–1 µg total mass of membrane protein/assay) were incubated for 1 h at 20 °C with 20 nmol/l [¹²⁵I]-pE13F in binding buffer alone (50 mmol/l HEPES, 5 mmol/l MgCl₂, 1% bovine serum albumin (BSA), pH 7.4) or in the presence of pE13F, K17F, or LIT01-196 at various concentrations (0.01 pmol/l to 100 µmol/l). The reaction was stopped by adding ice-cold binding buffer and filtering through Whatman GF/C filters. The filters were washed and radioactivity was counted with a Wizard 1470 Wallac gamma counter (PerkinElmer, Turku, Finland).

cAMP assay. cAMP assays are described in the Supplementary Information and methods.

Measurement of phosphorylated AQP-2 immunoreactivity in mpkCCD cells treated by dDAVP, dDAVP + K17F, or dDAVP + LIT. mpkCCD cells were seeded in 12 mm Transwell filters of 0.4 µm pore size at a density of 160,000 cells/cm² and were grown for 5 days. Twenty-four hours before the experiment, cells were starved with depletion media (1:1 (vol/vol) Ham's F12:DMEM medium). Then, cells were treated at the basolateral compartment with the depletion media (vehicle) or with 10 nmol/l of dDAVP in the presence or in the absence of 10 µmol/l K17F or LIT01-196 for 1 h at 37 °C. The cell culture medium was removed and cells were fixed with 4% formaldehyde in 1× PBS for 10 min at 4 °C, and permeabilized with 0.5% PBS Triton X-100 for 5 min at 20 °C. Then, inserts were incubated in 5% PBS-BSA for 60 min at 20 °C to block non-specific protein binding. Inserts were subjected to immunostaining with a rabbit anti-AQP-2-pS269 antibody (dilution, 1/200, Phospho Solution, Cliniscience, France) and a mouse monoclonal anti-occludin antibody (dilution, 1/200, Santa Cruz, Cliniscience, France) for 16 h at 4 °C. Inserts were then incubated with goat anti-rabbit Alexa Fluor Plus 647 or goat anti-mouse Alexa Fluor plus 488 secondary antibodies (dilution, 1/500, Invitrogen) for 60 min at 20 °C. Inserts were detached and mounted onto microscopy slides with Pro Long Aquafade containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Invitrogen). Slides were analyzed in the x-y and x-z axes under a ×63/1.4 Oil WD: 0.17 mm objective with a Zeiss Axiobserver Z1 inverted spinning-disk microscope equipped with a camera sCMOS Hamamatsu 2048 × 2048/pixel size: 6.45 × 6.45 µm² and the lasers (405 nm; 100 mW, 491 nm; 150 mW and 642 nm; 100 mW). Microscope settings were identical for all the samples and experiments were randomized and blinded.

Apelin and AVP radioimmunoassays. The radioimmunoassays are described in the Supplementary Information and methods.

Plasma LIT01-196 measurement by mass spectrometry analysis. The mass spectrometry analysis is described in the Supplementary Information and methods.

Plasma protein binding of LIT01-196. Plasma protein binding of LIT01-196 is described in the Supplementary Information and methods.

AVP-induced hyponatremia. Hyponatremia was induced with AVP using a protocol adapted from Verbalis et al.⁴³. We used male Sprague–Dawley rats that were implemented with an osmotic minipump (ALZET 2001, 200 µl, flow rate of 1 µl/h for 7 days), obtained from Durect Corporation (Cupertino, CA, USA) and filled with a solution of saline and AVP (at various concentrations), which was implanted subcutaneously under isoflurane anesthesia. Meloxicam was administered postoperatively for analgesia. Animals were then individually housed in metabolic cages (Techniplast), and given a semi-liquid diet consisting of 25 ml Gel-Diet Breeding-10 (SAFE, Augy, France) mixed with 25 ml tap water per day, with water available ad libitum. Animal weight, water, and food consumption were measured daily. Urine was collected daily, urinary electrolytes (Na⁺, K⁺, Cl⁻) were determined with an ISE 3000 (Caretium Medical Instruments, Shenzhen, China) and urinary osmolality was measured with a Cryobasic 1 osmometer (Astori Tecnica, Poncarale, Italy). Blood samples were collected on ice, before implantation of the osmotic minipump, and before drug administration, under isoflurane anesthesia, from the tail vein (4 µl of lithium heparinate (1600 IU/ml) for 400 µl of blood). The blood samples were immediately centrifuged (4 °C, 2600 × g, 20 min), and plasma electrolyte (Na⁺, K⁺, Cl⁻) levels were quantified with an ISE 3000. On the last day of the experiment, blood was also collected on ice by intracardiac puncture. This blood sample was collected into lithium heparinate under isoflurane anesthesia; plasma electrolyte levels were determined as described above and the animals were immediately killed by carbon monoxide inhalation. The experimental protocol is summarized in Fig. 4a.

Plasma glucose levels and fractional excretion of water and sodium. Fractional excretion of water (in %) was calculated using the following formula: (plasma creatinine/urine creatinine) × 100. Fractional excretion of sodium (in %) was calculated using the following formula: (plasma creatinine × urine sodium/urine

creatinine \times plasma sodium) \times 100. Blood and urine creatinine, urea nitrogen, and glucose levels were determined using an AU5800 Beckman Coulter chemistry analyzer (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Histological analyses. Histological analyses methods are described in the Supplementary Information and methods.

Blood pressure measurements. Blood pressure measurements are described in the Supplementary Information and methods.

Echocardiographic measurements. LVEF was determined in mice under isoflurane anesthesia at baseline and 3 h after s.c. administration of the compound, as previously described⁵².

Statistical analysis. We used Mann–Whitney *U* tests or paired Wilcoxon tests for comparisons between two groups, and analysis of variance or Kruskal–Wallis tests followed by post hoc comparisons for comparisons between multiple groups, when appropriate. We used a linear mixed-effects model to compare repeated values recorded over time, with time, treatment group, and the measured parameter as fixed effects and the unique animal identification number as a random effect. We assessed the effects of treatment by performing an analysis restricted to measurements taken after treatment administration. The normality of the data was assessed visually and with the Shapiro–Wilk normality test. The data represented are means, with error bars to indicate the standard error of the mean. The number of experiments or animals used is indicated in each figure legend. Data were collected using Microsoft Excel for MacOS version 16. Statistical analysis was performed with R software version 3.6.3⁵³. A *P* value <0.05 was considered significant. All analyses were two-sided. Exact *P* values for all analyses are provided in Supplementary Table 5.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the Supplementary information files. Source data are provided with this paper.

Received: 15 July 2019; Accepted: 9 December 2020;

Published online: 12 January 2021

References

- Ellison, D. H. & Berl, T. Clinical practice. The syndrome of inappropriate antidiuresis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 2064–2072 (2007).
- Waikar, S. S., Mount, D. B. & Curhan, G. C. Mortality after hospitalization with mild, moderate, and severe hyponatremia. *Am. J. Med.* **122**, 857–865 (2009).
- Kim, W. R. et al. Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1018–1026 (2008).
- Gheorghiadu, M. et al. Characterization and prognostic value of persistent hyponatremia in patients with severe heart failure in the ESCAPE Trial. *Arch. Intern. Med.* **167**, 1998–2005 (2007).
- Kovesdy, C. P. et al. Hyponatremia, hypernatremia, and mortality in patients with chronic kidney disease with and without congestive heart failure. *Circulation* **125**, 677–684 (2012).
- Nielsen, S. et al. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 1013–1017 (1995).
- Miyazaki, T. et al. Therapeutic effects of tolvaptan, a potent, selective nonpeptide vasopressin v2 receptor antagonist, in rats with acute and chronic severe hyponatremia. *Endocrinology* **146**, 3037–3043 (2005).
- Schrier, R. W. et al. Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2-receptor antagonist, for hyponatremia. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2099–2112 (2006).
- Verbalis, J. G. et al. Efficacy and safety of oral tolvaptan therapy in patients with the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion. *Eur. J. Endocrinol.* **164**, 725–732 (2011).
- Udelson, J. E. et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of tolvaptan monotherapy compared to furosemide and the combination of tolvaptan and furosemide in patients with heart failure and systolic dysfunction. *J. Card. Fail.* **17**, 973–981 (2011).
- Boertien, W. E. et al. Short-term Effects of Tolvaptan in Individuals With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease at Various Levels of Kidney Function. *Am. J. Kidney Dis.* **65**, 833–841 (2015).
- Bhandari, S. et al. A systematic review of known interventions for the treatment of chronic nonhypovolaemic hyponatremia and a meta-analysis of the vaptans. *Clin. Endocrinol.* **86**, 761–771 (2017).
- Sterns, R. H., Riggs, J. E. & Schochet, S. S. Osmotic demyelination syndrome following correction of hyponatremia. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1535–1542 (1986).
- Sterns, R. H., Silver, S., Kleinschmidt-DeMasters, B. K. & Rojiani, A. M. Current perspectives in the management of hyponatremia: prevention of CPM. *Expert Rev. Neurother.* **7**, 1791–1797 (2007).
- Torres, V. E. et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2407–2418 (2012).
- Torres, V. E. et al. Tolvaptan in later-stage autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1930–1942 (2017).
- Wu, Y. et al. Mechanisms of tolvaptan-induced toxicity in HepG2 cells. *Biochem. Pharmacol.* **95**, 324–336 (2015).
- O’Dowd, B. F. et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* **136**, 355–360 (1993).
- Tatemoto, K. et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 471–476 (1998).
- De Mota, N. et al. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 10464–10469 (2004).
- Azizi, M. et al. Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 1015–1024 (2008).
- Gerbier, R. et al. Development of original metabolically stable apelin-17 analogs with diuretic and cardiovascular effects. *FASEB J.* **31**, 687–700 (2017).
- Iturrioz, X. et al. By interacting with the C-terminal Phe of Apelin, Phe(255) and Trp(259) in Helix VI of the Apelin receptor are critical for internalization. *J. Biol. Chem.* **285**, 32627–32637 (2010).
- Reaux, A. et al. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.* **77**, 1085–1096 (2001).
- Reaux, A., Gallatz, K., Palkovits, M. & Llorens-Cortés, C. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* **113**, 653–662 (2002).
- O’Carroll, A. M., Selby, T. L., Palkovits, M. & Lolait, S. J. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **1492**, 72–80 (2000).
- Hus-Citharel, A. et al. Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int.* **74**, 486–494 (2008).
- Hus-Citharel, A. et al. Apelin counteracts vasopressin-induced water reabsorption via cross talk between apelin and vasopressin receptor signaling pathways in the rat collecting duct. *Endocrinology* **155**, 4483–4493 (2014).
- Boulkeroua, C. et al. Apelin-13 regulates vasopressin-induced aquaporin-2 expression and trafficking in kidney collecting duct cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **53**, 687–700 (2019).
- Galanth, C., Hus-Citharel, A., Li, B. & Llorens-Cortés, C. Apelin in the control of body fluid homeostasis and cardiovascular functions. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 789–798 (2012).
- Flahault, A., Couvineau, P., Alvear-Perez, R., Iturrioz, X. & Llorens-Cortés, C. Role of the vasopressin/apelin balance and potential use of metabolically stable apelin analogs in water metabolism disorders. *Front. Endocrinol.* **8**, 120 (2017).
- Reaux, A., Morinville, A., Bulet, A., Llorens-Cortés, C. & Beaudet, A. Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* **145**, 4392–4400 (2004).
- Blanchard, A. et al. An abnormal apelin/vasopressin balance may contribute to water retention in patients with the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone (SIADH) and heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 2084–2089 (2013).
- Hasler, U. et al. Long term regulation of aquaporin-2 expression in vasopressin-responsive renal collecting duct principal cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 10379–10386 (2002).
- Fanning, A. S., Mitic, L. L. & Anderson, J. M. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1337–1345 (1999).
- Furuse, M. et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**, 1777–1788 (1993).
- El Messari, S. et al. Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J. Neurochem.* **90**, 1290–1301 (2004).
- Reck, F. et al. Novel N-linked aminopiperidine inhibitors of bacterial topoisomerase type II: broad-spectrum antibacterial agents with reduced hERG activity. *J. Med. Chem.* **54**, 7834–7847 (2011).
- Taberi, S. et al. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 1208–1212 (2002).

40. Urwyler, S. A. et al. Plasma Apelin concentrations in Patients with Polyuria-Polydipsia Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1158> (2016).
41. Dai, L., Smith, P. M., Kuksis, M. & Ferguson, A. V. Apelin acts in the subfornical organ to influence neuronal excitability and cardiovascular function. *J. Physiol.* **591**, 3421–3432 (2013).
42. Hindmarch, C. et al. Microarray analysis of the transcriptome of the subfornical organ in the rat: regulation by fluid and food deprivation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1914–R1920 (2008).
43. Verbalis, J. G. Hyponatremia induced by vasopressin or desmopressin in female and male rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 1600–1606 (1993).
44. Aleksandrowicz, M. & Kozniwska, E. Effect of vasopressin-induced chronic hyponatremia on the regulation of the middle cerebral artery of the rat. *Pflug. Arch.* **470**, 1047–1054 (2018).
45. Tatemoto, K. et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul. Pept.* **99**, 87–92 (2001).
46. Japp, A. G. et al. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation* **121**, 1818–1827 (2010).
47. Dray, C. et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab.* **8**, 437–445 (2008).
48. Lacquaniti, A. et al. Apelin and copeptin: two opposite biomarkers associated with kidney function decline and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Peptides* **49**, 1–8 (2013).
49. Bens, M., Chassin, C. & Vandewalle, A. Regulation of NaCl transport in the renal collecting duct: lessons from cultured cells. *Pflug. Arch.* **453**, 133–146 (2006).
50. Chassin, C. et al. Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **293**, F927–F937 (2007).
51. Le Bouffant, F., Hus-Citharel, A. & Morel, F. Metabolic CO₂ production by isolated single pieces of rat distal nephron segments. *Pflug. Arch.* **401**, 346–353 (1984).
52. Boitard, S. E. et al. Brain renin-angiotensin system blockade with orally active aminopeptidase A inhibitor prevents cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **127**, 215–222 (2019).
53. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2018).
54. Llorens-Cortes, C. & Moos, F. Apelin and vasopressin: two work better than one. *J. Neuroendocrinol.* **24**, 1085–1086 (2012).

Acknowledgements

We thank Drs. Solène Boitard, Gwladys Haslé, and Paul Del Rincon from the Laboratory of Central Neuropeptides in the Regulation of Body Fluid Homeostasis and Cardiovascular Functions for animals and cell biology experiments, and Pr. Nicolas Pallet, from the Clinical Chemistry Department, Hôpital Européen Gorges Pompidou, APHP, Paris, France, for biochemistry determinations. We are grateful to Nicolas Humbert (Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, Illkirch, France) for peptide synthesis, Patrick Gizzi and François Daubeuf for PK experiments (Plate-forme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg, TechMedILL, UMS 3286 CNRS/Université de Strasbourg, Illkirch). We acknowledge the Orion imaging facility, CIRB, for their support with the spinning-disk imaging and image analysis. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), including financial support

for Proof of Concept, CoPoc Apelinatremia 2015–2017 by INSERM Transfert, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Strasbourg, the LabEx MEDALIS (ANR-10-LABX-0034), the Collège de France, the Agence Nationale de la Recherche “Vie, santé et bien-être 2016” (ANR-16-CE18-0030, FluoroPEP), the Fédération Française de Cardiologie, and the FRC (Frontier Research in Chemistry). A.F. was supported by a fellowship from INSERM (Poste d’Accueil pour Hospitaliers). P.-E.G.-S. was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale, grant number “PBR201810007643.” L.E. and S.M.R. were supported by a fellowship from the Ministère de l’Éducation Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche, and the Agence Nationale pour la Recherche, respectively.

Author contributions

A.F. designed the studies, conducted experiments, acquired and analyzed data, and wrote the manuscript; P.-E.G.-S. and X.I. designed and conducted experiments, analyzed data, and wrote the manuscript; M.K., R.A.P., and N.D.M. conducted experiments and analyzed the data; L.E., S.M.R., and D.B. performed the design and the synthesis of LIT01-196, plasma protein binding and mass spectrometry analysis, and wrote the manuscript. C.L.-C. supervised the work, designed the studies, analyzed the data, wrote the manuscript, and ensured the funding.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20560-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.B. or C.L.-C.

Peer review information *Nature Communications* thanks Anthony Davenport and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

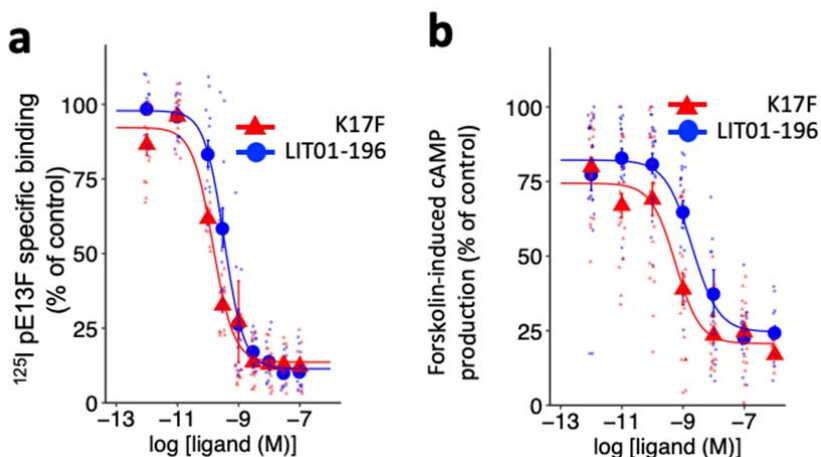
Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

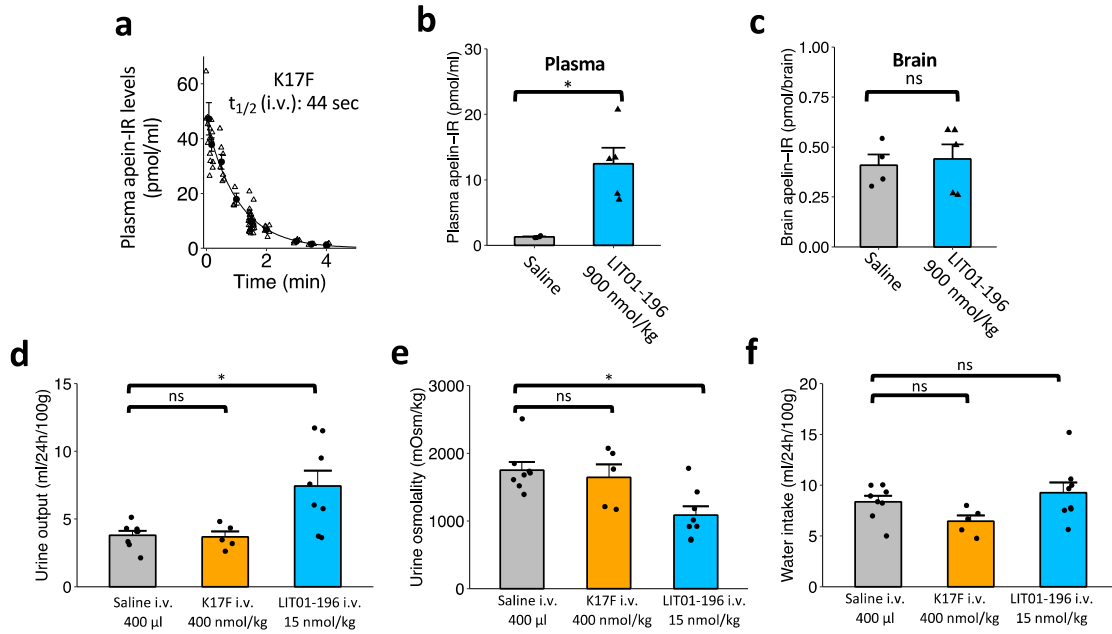
© The Author(s) 2021

16



17

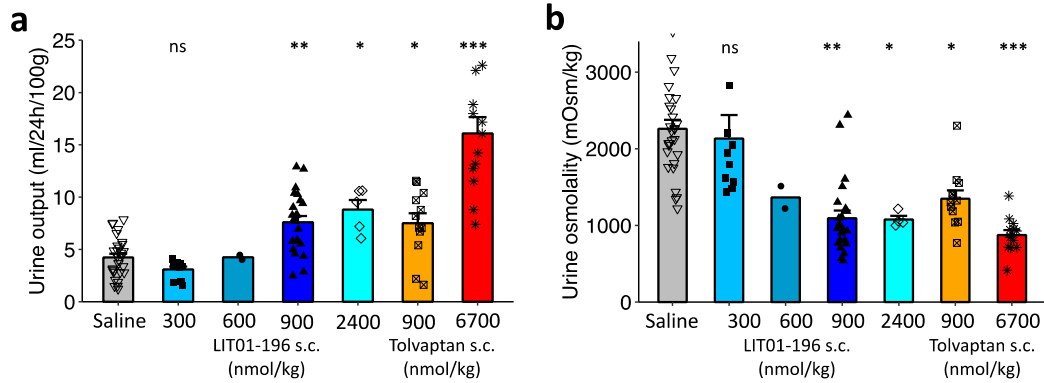
18 **Fig. S1. Pharmacological characterization of K17F and LIT01-196.** (a) Competitive
 19 binding activities of K17F and LIT01-196 with membranes from CHO cells stably expressing
 20 the human apelin receptor. The membranes of CHO cells stably expressing the human apelin
 21 receptor (0.5 $\mu\text{g}/\text{point}$) were incubated with 2×10^{-10} M ^{125}I -pE13F in the presence of
 22 various concentrations of K17F (red triangles) or LIT01-196 (blue circles). Data are expressed
 23 as a percentage of the maximal binding of ^{125}I -pE13F in the absence of nonradiolabeled
 24 ligand and represent the means \pm standard error of five independent experiments performed in
 25 duplicate. (b) Effects of K17F (red triangles) or LIT01-196 (blue circles) on forskolin-induced
 26 cAMP production in CHO cells stably expressing rat apelin receptor-EGFP. cAMP
 27 production was induced by treating the cells with 10^{-5} M forskolin. The effects of various
 28 concentrations of K17F and LIT01-196 on forskolin-induced cAMP production ($\text{fmol}/10^5$
 29 cells) were then evaluated. The data presented are the means \pm standard error of six separate
 30 experiments.



31

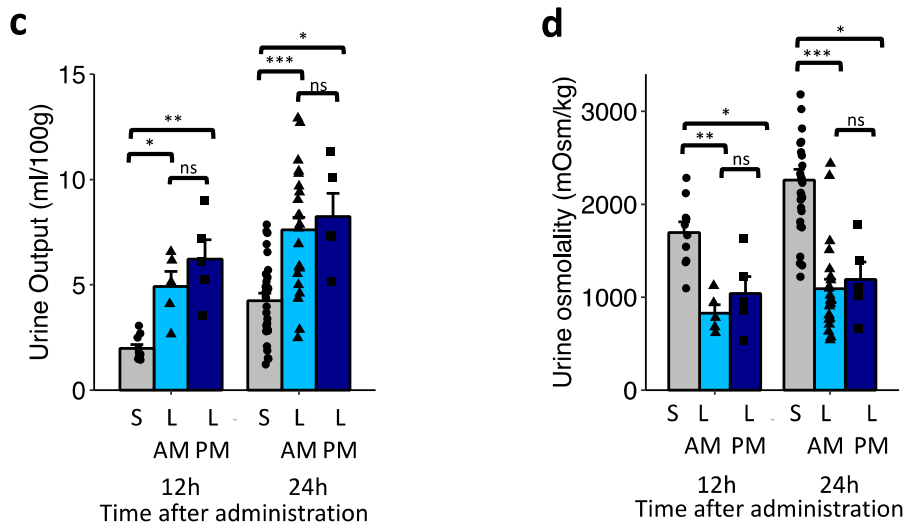
32 **Fig. S2. *In vivo* half-life of K17F in mice, brain penetration of LIT01-196 and its effects**
 33 **on urine output and osmolality in control rats. (a) *In vivo* half-life of K17F following i.v.**
 34 administration in mice. K17F (250 nmol/kg i.v.) was injected in alert mice. Animals (n is
 35 shown in **Supplemental Table 2**) were killed at various times following injection, trunk
 36 blood was collected and plasma apelin-immunoreactive levels were determined in a
 37 radioimmunoassay. **(b)** Plasma and **(c)** brain apelin-immunoreactive levels in mice (n=5
 38 animals) 30 minutes after subcutaneous administration of saline (grey bars, circles) or LIT01-
 39 196 (900 nmol/kg, blue bars, triangles). **(d)** 24-hour urine output, **(e)** urine osmolality and **(f)**
 40 water intake measured for 24 hours following the i.v. administration of saline (100 µl/kg, n=6
 41 animals, grey bars, circles), K17F (400 nmol/kg, n=5 animals, orange bars, circles) or LIT01-
 42 196 (15 nmol/kg = 51 µg/kg, n=6 animals, blue bars, circles). Data are shown as mean ±
 43 S.E.M. Multiple comparisons performed by ANOVA followed by post-hoc Dunnett's tests.
 44 Ns: $p > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

45

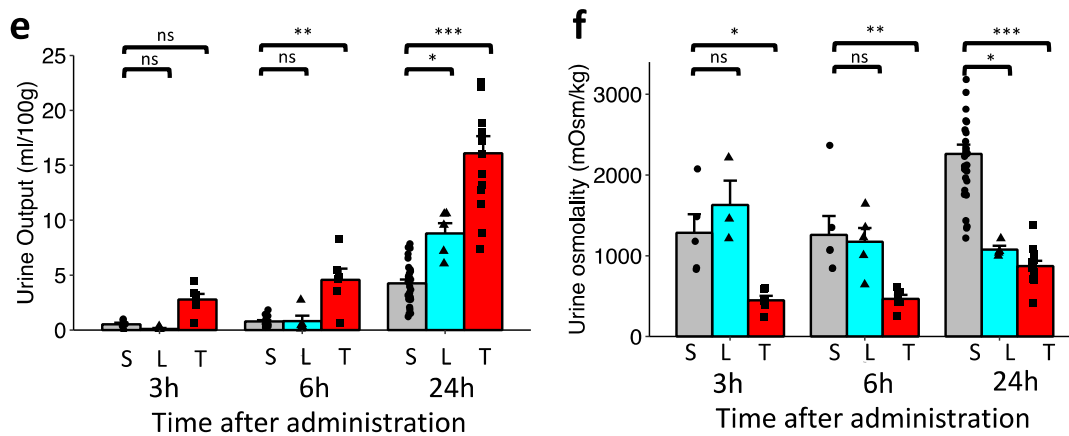


46

Daytime vs Nighttime administration of LIT01-196 900 nmol/kg



LIT01-196 2400 nmol/kg vs tolvaptan 6700 nmol/kg

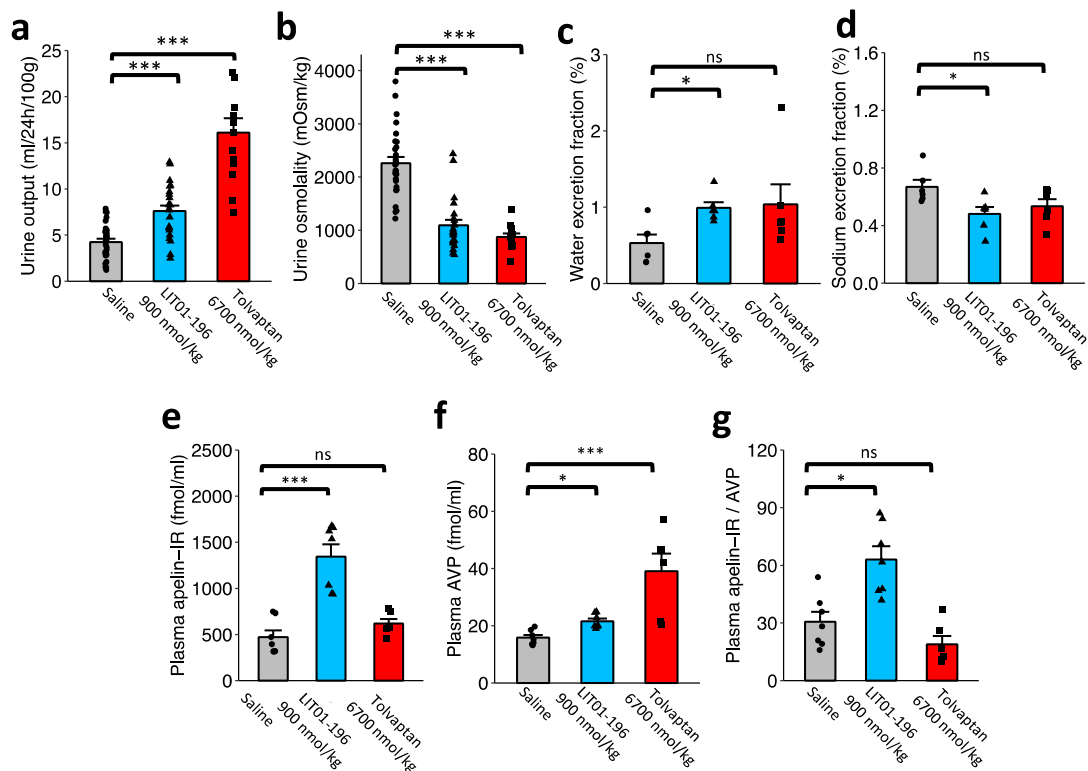


47

48 **Figure S3. Effects of different doses of LIT01-196 or tolvaptan administered**
 49 **subcutaneously in Sprague-Dawley normonatremic rats.** Evaluation of the effect of saline
 50 (1 ml/kg, n=19 animals, grey bars, open triangles); various doses of LIT01-196: 300 nmol/kg

51 (n=11 animals, blue bars, squares), 600 nmol/kg (n=2 animals, cyan bars, circles, no statistical
52 analysis performed), 900 nmol/kg (n=23 animals, dark blue bars, triangles) and 2400 nmol/kg
53 (n=5 animals, light blue bars, open diamonds); and various doses of tolvaptan: 900 nmol/kg
54 (n=12 animals, orange bars, checked squares) and 6700 nmol/kg (n=13 animals, red bars,
55 asterisks) on **(a)** urine output and **(b)** urine osmolality 24 hours after subcutaneous
56 administration. **(c)** Urine output and **(d)** urine osmolality measured 12 and 24 hours after
57 saline (S, grey bars, circles) and LIT01-196 (L) administered at 8 A.M. (blue bars, triangles)
58 or at 8 P.M. (dark blue bars, squares) **(e)** Urine output and **(f)** urine osmolality measured 3, 6
59 and 24 hours after saline (S, grey bars, circles), LIT01-196 (2400 nmol/kg, L, light blue bars,
60 triangles) and tolvaptan (6700 nmol/kg, T, red bars, squares). Number of animals used for
61 figures C-F are provided in **Supplemental Table 3**. Data are shown as mean \pm S.E.M.
62 Multiple comparisons performed by Kruskal-Wallis followed by post-hoc comparisons to the
63 saline group using Dunn's tests with Holm's adjustment. Ns: $p>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$,
64 *** $P<0.001$.

65

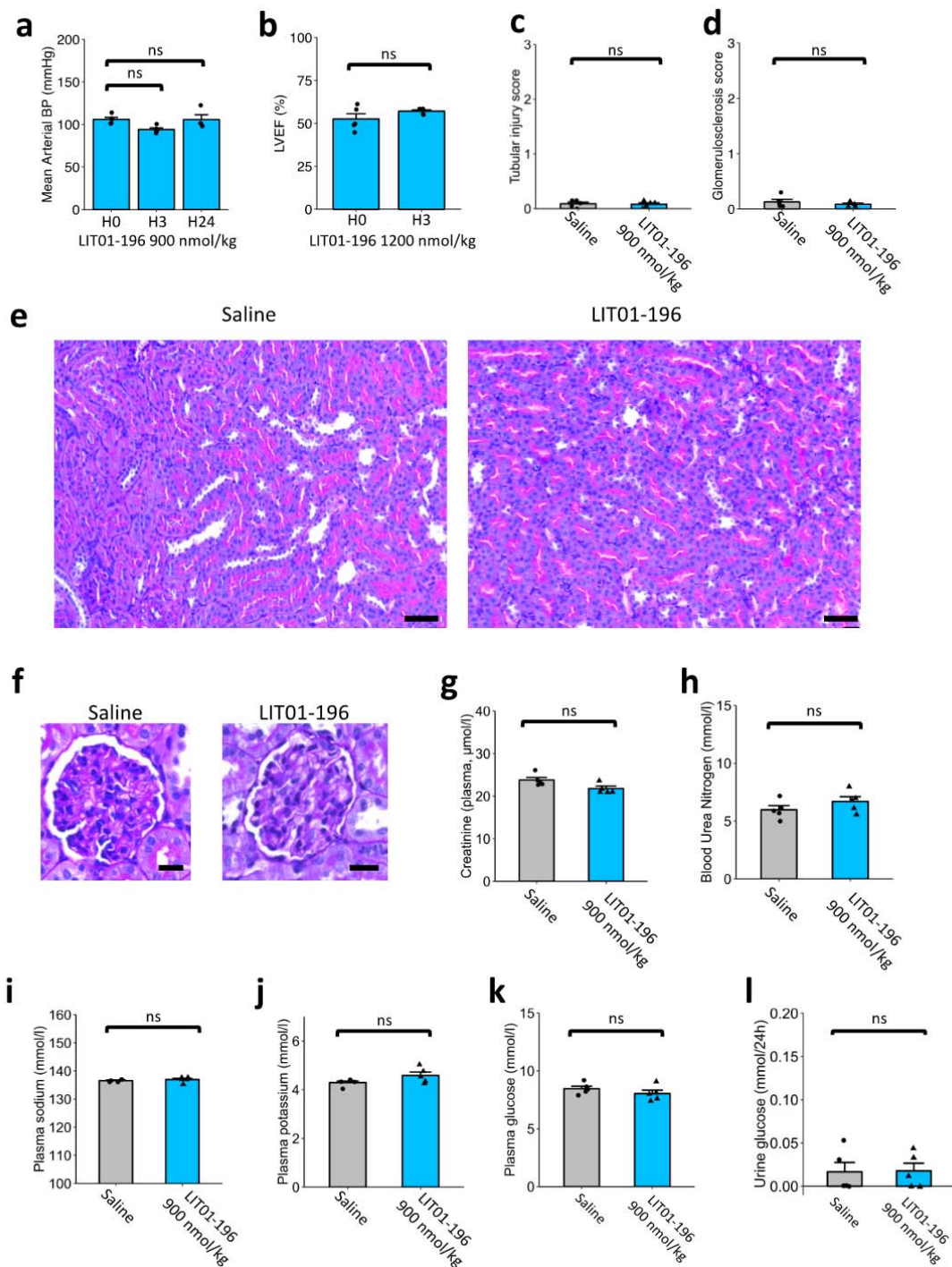


66

67 **Fig S4. Effects of s.c. saline, LIT01-196 (900 nmol/kg) and a high dose of tolvaptan (6700**
 68 **nmol/kg) on water metabolism, plasma electrolytes, AVP and apelin-IR plasma levels in**
 69 **control rats. (a) Urine output and (b) urine osmolality measured 24 hours after saline (grey**
 70 **bars, circles), LIT01-196 (900 nmol/kg, blue bars, triangles) and tolvaptan (6700 nmol/kg,**
 71 **red bars, squares). (c) 24-h water excretion fraction and (d) 24-h sodium excretion fraction**
 72 **measured 24 hours after the s.c. administration of saline (1 ml/kg), LIT01-196 (900 nmol /kg)**
 73 **or tolvaptan (6700 nmol/kg) in alert male Sprague-Dawley (SD) rats (number of animals are**
 74 **provided in Supplemental Table 4). (e) plasma apelin-IR, (f) AVP and (g) ratio of plasma**
 75 **apelin/AVP levels were determined on plasma samples obtained 3 hours after the s.c.**
 76 **administration of LIT01-196 (n=7 animals), tolvaptan (n=6 animals) or saline (n=7 animals)**
 77 **in alert male SD rats. Data are shown as mean ± S.E.M. Multiple comparisons performed by**
 78 **Kruskal-Wallis followed by post-hoc Dunn's tests with Holm's adjustment. Ns: $p > 0.05$,**
 79 *** $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.**

80

81



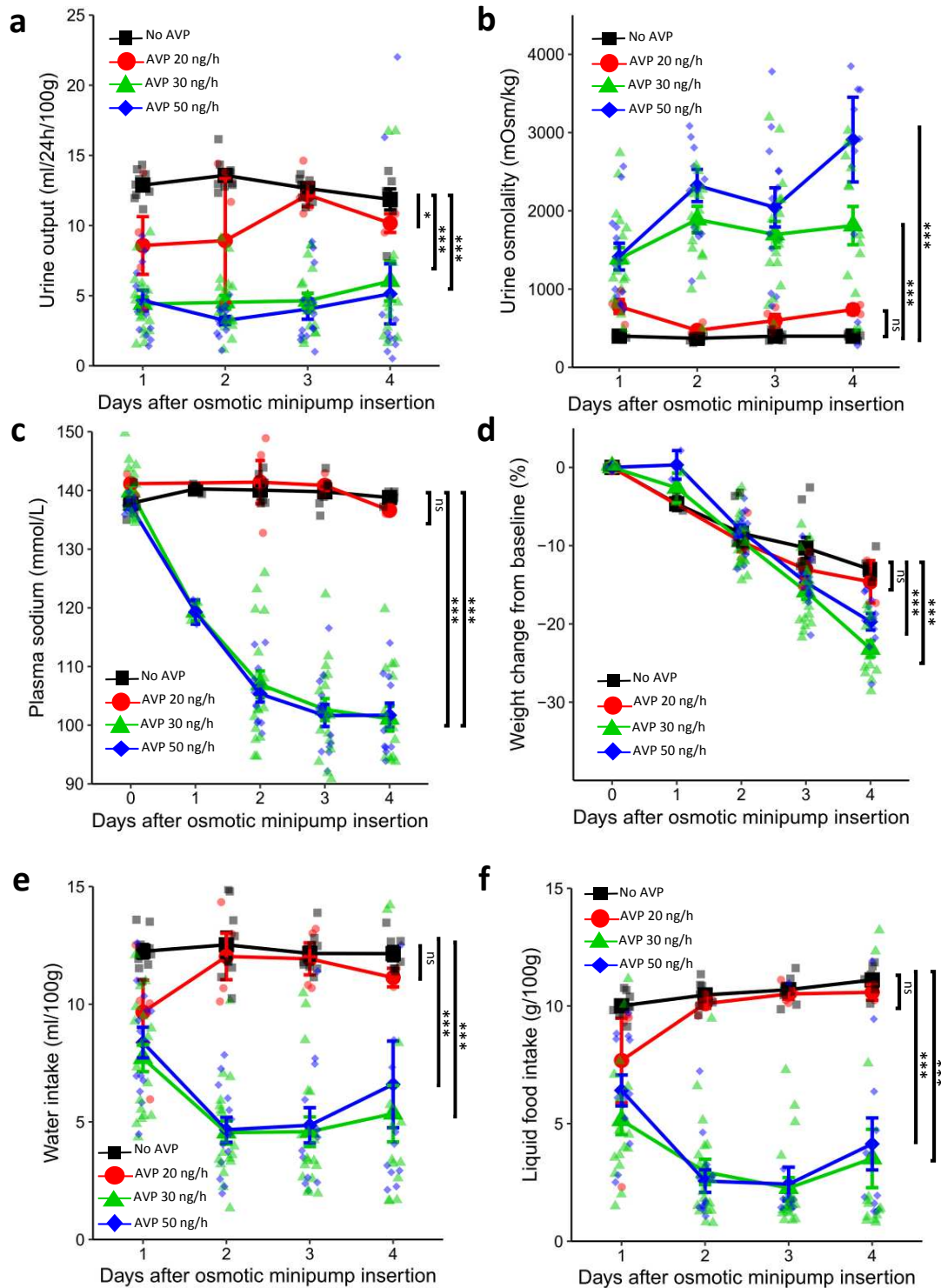
82

83 **Figure S5. Effects of LIT01-196 on blood pressure, cardiac contractility, kidney function**
 84 **and blood glucose.** (a) Mean arterial blood pressure (BP) before (H0), 3 (H3) and 24 (H24)
 85 hours after s.c. administration of 900 nmol/kg of LIT01-196 in alert normotensive rats (n=5
 86 animals). (b) Left ventricular ejection fraction (LVEF) measured by echocardiography in
 87 mice (n=5 animals) before (H0) and 3 hours (H3) after s.c. administration of 1,200 nmol/kg
 88 LIT01-196. In figures c to l, LIT01-196 (900 nmol/kg s.c., n=5 animals) or saline (1 ml/kg,

89 n=5 animals) were administered for daily in normonatremic Sprague-Dawley rats during 4
90 days, and blood and tissues were collected 24h after the last administration. **(c)** Tubular injury
91 score was scored using the percentage of tubules in the outer medulla and corticomedullary
92 junction that showed tubular atrophy or dilatation, loss of brush border, vacuolization,
93 epithelial cell shedding, and denuded tubular basement membrane, as follows: 0, normal; 1,
94 <10%; 2, 10%–25%; 3, 25%–50%; 4, 50%–75%; 5, 75%–100%. **(d)** Glomerulosclerosis score
95 was graded from 0 to 4 according to the percentage of glomerular involvement, with 1 a
96 lesion represented an involvement of 25% of the glomerulus, and a 4 a lesion indicated that
97 100% of the glomerulus was PAS positive. **(e)** Representative images of periodic acid - Schiff
98 staining of tubular epithelial cells of outer medulla kidney sections from saline and LIT01-196
99 treated rats. 200x, Bar: 50µm. **(f)** Representative images of periodic acid - Schiff staining of
100 glomeruli from saline and LIT01-196 treated rats. 400x, Bar: 20µm. **(g)** plasma creatinine, **(h)**
101 blood urea nitrogen, **(i)** plasma sodium, **(j)** plasma potassium, **(k)** plasma glucose and **(l)** 24h
102 urine glucose were collected 24 hours after the last administration of saline (grey bars, circles)
103 or LIT01-196 (900 nmol/kg, blue bars, triangles). Data are shown as mean ± S.E.M.
104 Comparisons performed using paired Wilcoxon tests (A-B) or Mann-Whitney U tests (C-D
105 and G to L). Ns: $p>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

106

107

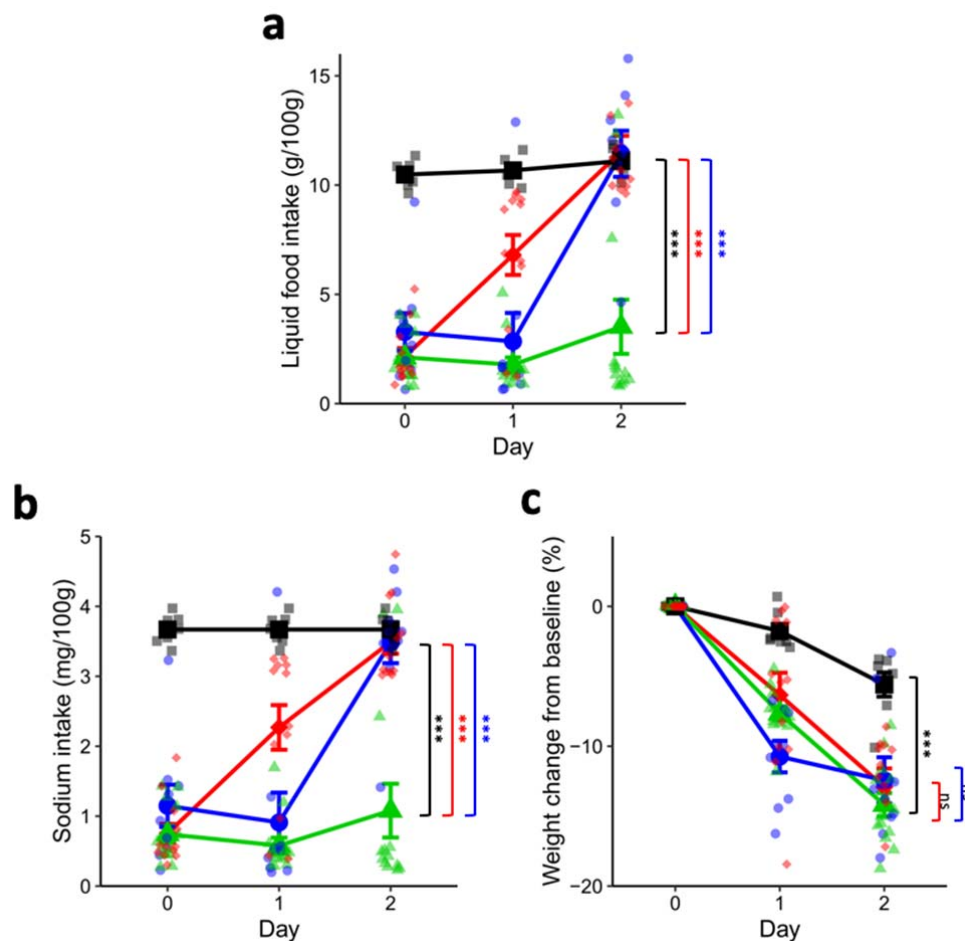


108

109 **Fig. S6. Determination of optimal AVP infusion rate.** Change in 24-hour urine output (a),
 110 urine osmolality (b), plasma sodium (c), body weight (d), water intake (e) and liquid food
 111 intake (f) after the insertion of a subcutaneous osmotic minipump delivering AVP at a rate of
 112 20 ng/h (red curves and circles, n=4 animals), 30 ng/h (green curves and triangles, n=17

113 animals) or 50 ng/h (blue curves and diamonds, n=13 animals) to alert male SD rats, relative
114 to control rats receiving no AVP (black curves and squares, n=9 animals). All animals
115 received a semi-liquid diet. Data are shown as mean \pm S.E.M. Each group was compared with
116 the control group from day 1 to day 4, with a linear mixed-effects model, to take repeated
117 measurements over time into account; ns: $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

118



119

120 **Fig. S7. Effects of saline, tolvaptan and LIT01-196 on water metabolism and plasma**
 121 **electrolytes in hyponatremic rats. (a), change in liquid food intake (without water), (b)**
 122 **sodium intake and (c) weight change from baseline in animals receiving continuous s.c. AVP**
 123 **at a rate of 30 ng/h from day -2 to 2, and a s.c. injection of saline (green curves and triangles,**
 124 **$n=13$ animals), tolvaptan (red curves and diamonds, 900 nmol/kg, $n=12$ animals) or LIT01-**
 125 **196 (blue curves and circles, 900 nmol/kg, $n=9$ animals) on days 0 and 1. The black curve and**
 126 **squares represents animals receiving no AVP ($n=7$ animals); all animals received a semi-**
 127 **liquid diet. Data are shown as mean \pm S.E.M. Each group was compared with the AVP +**
 128 **saline group with a linear mixed-effects model, to take repeated measurements over time into**
 129 **account; ns: $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.**

130

131 **Supplemental Tables**

132

Figure 4B	Time (min)	0.5	1	1.5	2	4	4
	n (animals)	6	6	6	6	6	6
Figure 4C	Time (min)	5	7.5	10	15	30	60
	n (animals)	2	3	2	3	3	2
Figure 4D	Time (min)	60	120	180	270	360	1440
	n (animals)	2	3	5	3	3	3

133 **Supplemental Table 1.** Number of animals per time point for *in vivo* half life determinations

134 in rats (Fig. 4 B-D).

135

Figure S2A	Time (min)	0.08	0.17	0.5	1	1.5	2	3	3.5	4
	n (animals)	11	6	7	3	30	6	4	3	4

136 **Supplemental Table 2.** Number of animals per time point for *in vivo* half life determination

137 in mice (Supplemental Figure 2A).

138

139

Group	Saline 12h	LIT01-196 AM – 12h	LIT01-196 PM – 12h	Saline 24h	LIT01-196 AM – 24h	LIT01-196 PM – 24h
Figure S3C	10	5	5	29	23	5
Figure S3D	10	5	5	29	23	5
Group	Saline 3 hours	Saline 6 hours	Saline 24 hours	Tolvaptan 3 and 6 hours	Tolvaptan 24 hours	LIT01-196 All groups
Figure S3E	6	16	29	6	13	5
Figure S3F	6	16	29	6	13	5

140 **Supplemental Table 3.** Number of animals per group for the study of metabolic effects of
 141 s.c. saline, LIT01-196 (900 nmol/kg) and a high dose of tolvaptan (6,700 nmol/kg) on water
 142 metabolism in control rats (Supplemental Figure S3 C-F).

143

Compound	Saline	LIT01-196 900 nmol/kg	Tolvaptan 6700 nmol/kg
Figure S4A	29	23	13
Figure S4B	29	23	13
Figure S4C	6	6	6
Figure S4D	6	6	6

144 **Supplemental Table 4.** Number of animals per group for the study of metabolic effects of
 145 s.c. saline, LIT01-196 (900 nmol/kg) and a high dose of tolvaptan (6,700 nmol/kg) on water
 146 metabolism, plasma electrolytes, in control rats (Supplemental Figure S4A-D).

147

Figure	P-values
Figure 2	
2B	Cells not stimulated : <0.001; FSK: 0.56; dDAVP: >0.99; AVP: §:p<0.001; 0.87; 0.32; <0.001; <0.001; <0.001 K17F: &:p>0.99/**p<0.001; >0.99; 0.96 LIT01-196: &:p>0.99/**p<0.001; >0.99; 0.31
2C	<0.001; <0.001
2D	<0.001; <0.001
2E	No dDAVP <0.001; dDAVP: §:p<0.001; K17F: 0.007; <0.001; <0.001 LIT01-196: 0.033; <0.001; <0.001
Figure 4	
4F	0.008
4G	0.84
4H	3h S/L p=0.30; 3h S/T p=0.044 6h S/L p=0.68; 6h S/T p= 0.003 24h S/L p=0.001 ; 24h S/T p<0.001
4I	3h S/L p=0.20; 3h S/T p=0.002 6h S/L p=0.052; 6h S/T p= 0.011 24h S/L p<0.001 ; 24h S/T p=0.001
4J	S/L p=0.22; S/T p<0.001
4K	S/L p=0.06; S/T p=0.21
4L	S/L p=0.005 ; S/T p=0.070
4M	S/L p=0.014 ; S/T p=0.32
Figure 5	
5B	S+AVP vs: S p=0.002 ; L p<0.001 ; T p<0.001
5C	S+AVP vs: S p<0.001 ; L p<0.001 ; T p<0.001
5D	S+AVP vs: S p<0.001 ; L p=0.042 ; T p=0.025
5E	S+AVP vs: S p<0.001 ; L p<0.001 ; T p<0.001
Figure 6	

6A	AVP+S vs: No AVP p<0.001; AVP+L p=0.35; AVP+T: p=0.99 AVP+L vs AVP+T: p=0.46
6B	AVP+S vs: No AVP p>0.99; AVP+L p<0.001 ; AVP+T: p=0.42 AVP+L vs AVP+T: p<0.001
6C	AVP+S vs: No AVP p=0.16 ; AVP+L p<0.001 ; AVP+T: p=0.97 AVP+L vs AVP+T: p<0.001
Figure S2	
S2B	0.015
S2C	0.90
S2D	S vs K: p=0.90 ; S vs L: p=0.047
S2E	S vs K: p=0.93 ; S vs L: p=0.030
S2F	S vs K: p=0.11 ; S vs L: p=0.75
Figure S3	
S3A	S vs L300 p=0.54 ; L900 p=0.002 ; L2400 p=0.020 ; S vs T 900 p=0.020 ; T 6700 p<0.001
S3B	S vs L300 p=0.50 ; L900 p<0.001 ; L2400 p=0.001 ; S vs T 900 p=0.006 ; T 6700 p<0.001
S3C	12 hours S vs L-AM p=0.017 ; L-PM p=0.002 ; L AM vs PM p=0.56 24 hours S vs L-AM p<0.001 ; L-PM p=0.01 ; L AM vs PM p=0.69
S3D	12 hours S vs L-AM p=0.006 ; L-PM p=0.041 ; L AM vs PM p=0.49 24 hours S vs L-AM p<0.001 ; L-PM p=0.012 ; L AM vs PM p=0.71
S3E	3 hours S vs L p=0.19 ; T p=0.068 6 hours S vs L p=0.31 ; T p=0.009 24 hours S vs L p=0.015 ; T p<0.001
S3F	3 hours S vs L p=0.54 ; T p=0.026 6 hours S vs L p=0.95 ; T p=0.008 24 hours S vs L p=0.010 ; T p<0.001
Figure S4	
S4A	S vs L p<0.001 ; T p<0.001
S4B	S vs L p<0.001 ; T p<0.001
S4C	S vs L p=0.022 ; T p=0.094
S4D	S vs L p=0.046 ; T p=0.14
S4E	S vs L p<0.001 ; T p=0.26
S4F	S vs L p=0.021 ; T p<0.001

S4G	S vs L p=0.038 ; T p=0.21
Figure S5	
S5A	Baseline vs H3: p=0.0625; H24: p=0.875
S5B	0.31
S5C	0.92
S5D	0.53
S5G	0.068
S5H	0.35
S5I	0.20
S5J	0.22
S5K	0.22
S5L	0.82
Figure S6	
S5A	No AVP vs AVP 20: p=0.024 ; AVP 30: p<0.001 ; AVP 50: p<0.001
S5B	No AVP vs AVP 20: p=0.43 ; AVP 30: p<0.001 ; AVP 50: p<0.001
S5C	No AVP vs AVP 20: p=0.78 ; AVP 30: p<0.001 ; AVP 50: p<0.001
S5D	No AVP vs AVP 20: p=0.20 ; AVP 30: p<0.001 ; AVP 50: p=0.002
S5E	No AVP vs AVP 20: p=0.80 ; AVP 30: p<0.001 ; AVP 50: p<0.001
S5F	No AVP vs AVP 20: p=0.80 ; AVP 30: p<0.001 ; AVP 50: p<0.001
Figure S7	
S7A	S+AVP vs: S p<0.001 ; L p<0.001 ; T p<0.001
S7B	S+AVP vs: S p<0.001 ; L p<0.001 ; T p<0.001
S7C	S+AVP vs: S p<0.001 ; L p=0.64 ; T p=0.33

149 **Supplemental Table 5.** Exact P-values for all analyzes, per figure. S: Saline; L:LIT01-196;

150 Tolvaptan.

151

152 **Supplementary Methods**

153 *cAMP assay.*

154 We quantified cAMP production with the cAMP dynamic 2 assay kit (Cisbio Bioassays,
155 Codolet, France), which is based on homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF)
156 technology, as previously described ¹. For cells expressing the Apelin-R, 2000 CHO cells/well
157 stably expressing rat apelinR-EGFP (clone B70) were added to the 384-well plate and
158 stimulated with 5 µmol/l forskolin (FSK) and various concentrations (0.01 pmol/l to 100
159 µmol/l) of K17F or LIT01-196 for 30 minutes at 20°C. For cells expressing the V2-R, HEK-
160 293T cells were transiently transfected with the human V2-R (cDNA Resource Center), after
161 48h, 4000 cells/well were added to white 384-well optiplates and stimulated either with 5
162 µmol/l forskolin (positive control) or with dDAVP (1µmol/l) or with various concentrations
163 of AVP (1µmol/l to 0.1pmol/l) or with K17F or LIT01-196 (at 1µmol/l) in absence or in
164 presence of AVP (1µmol/l or 1nmol/l) for 30 minutes at 37°C. Cells were then lysed, and
165 cAMP levels were determined in accordance with the kit manufacturer's instructions.
166 Stimulation was performed in stimulation buffer-IBMX (SBI) (Hank's balanced salt solution
167 (HBSS-Life Technology), 5 mmol/l Hepes, 0.1% BSA stabilizer (Perkin Elmer), 1 mmol/l
168 isobutylmethylxanthine (IBMX, Sigma Aldrich, pH 7.4)). For cAMP assay with mpkCCD
169 cells, the cells were grown on 12 mm Transwell filters (0.4 µm pore size, Corning Costar,
170 Cambridge, MA) until they reach confluency (4-5 days). For forskolin experiments, culture
171 media was replaced with SBI in apical and basolateral compartments. After 30 min of
172 equilibration at 37°C the cells were treated in the basolateral compartment with SBI alone or
173 SBI containing 1 µmol/l forskolin with or without 1 µmol/l K17F or LIT01-196 and incubated
174 for 30 min at 37°C. For the dDAVP experiments, 24h before the experiments the cells were
175 starved with depletion media (1:1 (vol/vol) Ham's F12 : DMEM medium). Then the cells
176 were treated on the basolateral compartments with depletion media containing 1 µmol/l

177 MLN4760 (an ACE2 inhibitor), 1 $\mu\text{mol/l}$ Thiorphan (a neprilysin inhibitor) and 100 $\mu\text{mol/l}$
178 bestatin (an aminopeptidase inhibitor) for 30 min at 37°C. Then cells were treated with 10
179 nmol/l dDAVP with or without 10 $\mu\text{mol/l}$ K17F or LIT01-196 and incubated for 60 min at
180 37°C. Then the media was removed and 100 μl of lysis buffer (Cisbio Bioassays, Codolet,
181 France) was added to Transwell filter and plate was incubated at 20°C for 2 hours. Cell
182 lysates were diluted 1/500 and 10 μl was subjected to cAMP measurement in white Optiplat
183 384-well plates (Perkin Elmer) according to manufacturer's instructions (Cisbio Bioassays,
184 Codolet, France). Cyclic AMP levels were measured in microdissected OMCDs by the same
185 method, as previously described ². Results are expressed in femtomoles of cAMP produced
186 per mm tubular length and per 10 min incubation time at 37°C.

187 *Apelin radioimmunoassay*

188 Plasma samples (0.5 ml) were acidified with 0.175 ml of 3 mol/l HCl and stored at -80°C
189 until use for apelin RIA. Before thawing the sample on ice, 0.05% BSA was added, and the
190 samples were centrifuged at 20000 x g at 4°C for 10 min. The supernatants were collected and
191 the pH was adjusted to 6.5 with 10 mol/l NaOH and 2 mol/l Tris-HCl buffer (pH 7.4). Apelin
192 was extracted from plasma by mixing the supernatant with 0.3 ml of 0.1% BSA in H₂O and 1
193 ml of 1% trifluoroacetic acid (TFA) - 0.1% BSA, and running the mixture on a Sep-Pak C18
194 cartridge (Waters) previously washed with 2 ml 100% acetonitrile and equilibrated with 5 ml
195 1% TFA - 0.1% BSA. The columns then were washed with 3 ml 1% TFA - 0.1% BSA and
196 apelin was eluted with 1.5 ml 100% acetonitrile. The samples were dried and dissolved in
197 0.32 ml of RIA buffer (19 mM NaH₂PO₄ • H₂O, 81 mM Na₂HPO₄ • 2H₂O, 50 mM NaCl,
198 0.1% TritonX-100, 0.01% NaN₃, 0.1% BSA).

199 For brain apelin RIA, the half brain was homogenized by sonication in 10 volumes of 0.4 N
200 HClO₄ supplemented with 0.05% BSA and kept on ice during 1h. The homogenate was
201 centrifuged (17000 x g, 4°C, 20 min). The supernatant (4 ml) was collected, and mixed with

202 0.4 ml potassium phosphate buffer (0.4 mol/l) and the pH was adjusted to 6.5 with 3 N KOH,
203 and the mixture was left to stand for 15 min on ice and then centrifuged (17000 x g, 4°C, 20
204 min). Two ml of the supernatant were mixed with 2 ml of 1% TFA - 0.1% BSA and loaded
205 onto a a Sep-Pak C18 cartridge (Waters) previously washed with 2 ml 100% acetonitrile and
206 equilibrated with 5 ml 1% TFA - 0.1% BSA. The columns were then treated as described in
207 the paragraph above.

208 Plasma or brain apelin levels were determined by RIA. Samples (0.1ml) were mixed with ¹²⁵I-
209 labeled pE13F (iodinated on Lys8 by the Bolton and Hunter method, 2200 Ci/mmol, Perkin-
210 Elmer, Waltham, MA; 0.05 ml, 19000 dpm) and polyclonal K17F antiserum (0.05 ml, final
211 dilution: 1/4500) to give a total volume of 0.2 ml and were incubated at 4°C overnight. We
212 used this radioligand instead of [Glp65, Nle75, Tyr77] [¹²⁵I]-apelin13 since the substitution of
213 the C terminal Phe of pE13F was shown to modify the binding affinity of the apelin
214 derivatives as described previously by ^{3,4}.

215 We then added 0.5 ml of Amerlex (Amersham RPN 510), and the resulting mixture was
216 incubated for 10 min at room temperature. The tubes were centrifuged at 2600 x g at 4°C for
217 20 min. The supernatant was removed and the radioactivity of the precipitates was measured.

218 We assessed the cross-reactivity of the apelin antiserum with various N- and C-terminally
219 truncated fragments of K17F and several other bioactive peptides. K17F (200% cross-
220 reactivity), pE13F and apelin 36 (100% cross-reactivity) were well recognized by the
221 antiserum, whereas the removal of the phenylalanine residue at the extreme end of the C-
222 terminus of K17F (forming K16P) decreased recognition to barely detectable levels (<0.3%
223 cross-reactivity). Negligible cross-reactivity was observed for angiotensin II, angiotensin III,
224 neuropeptide Y and arginine-vasopressin. This antiserum identified the apelin present in the
225 plasma of rodents as the pyroglutamyl form of apelin 13 (pE13F) and, to a lesser extent, K17F
226 ⁵ and in the hypothalamus, in major part as pE13F. Most of the apelin in human plasma was

227 K17F, followed by pE13F, and, to a lesser extent, apelin 36⁶. The detection limit was 6
228 fmol/ml, and the quantification limit was 12 fmol/ml. The within- and between-assay
229 coefficients of variation were 3 and 5%, respectively⁶. The recovery (mean±SEM) was
230 91±3% and the values for apelin levels were corrected for recovery.

231 We estimated the *in vivo* half-lives of K17F and LIT01-196 with a least-squares fit analysis,
232 according to the following equation: $[\text{plasma apelin}]_{\text{tx}} = [\text{plasma apelin}]_{\text{t0}} * e^{(-kt)}$, where k is
233 the elimination rate constant.

234 *Plasma LIT01-196 levels determination by mass spectrometry analysis*

235 6 weeks old CD-1 mice were injected with 300 nmol/kg of LIT01-196 via the tail vein (3
236 animals per time point). Blood samples (400µL) were collected at different time points (5
237 min, 15 min, 28 min and 60 min) by intracardiac puncture and placed into EDTA-coated
238 tubes, centrifuged 12000 x g at 4 °C for 10 min and the plasma was stored at -80 °C. The
239 samples were analyzed by UHPLC-MS/MS (LC-MS 8030, Shimadzu, electrospray ion
240 source) using a C18 column (Phenomenex 2.6 µm Kinetex, 50 X 2.1 mm) and a linear
241 gradient of solvent B 5-95% v/v over 1.2 min at a flow rate of 0.5 mL/min (solvent A: H₂O
242 and 0.05% formic acid; solvent B: acetonitrile). Plasma samples were processed before RP-
243 HPLC analysis as follows: 400 µL of each plasma sample were then mixed with 1 ml of
244 acetonitrile for protein precipitation and compound extraction. Samples were vortex-stirred
245 for 5 min, sonicated for 1 min and centrifuged at 10000 x g for 5 min. 400 µl of supernatants
246 were freeze-dried and then dissolved in 20 µl of water/acetonitrile 1/1. Peptides were
247 quantified by integrating the area under the peaks, and normalization was based on the
248 standard and compared to standard curves. Standard curves were obtained by analyzing
249 known peptide quantities that were dissolved in plasma and processed as well as analyzed
250 using the same procedure. Pharmacokinetics parameters were calculated using a one-
251 compartment model. Peptide injection and blood sample collection were performed by

252 TechMedILL platform (Illkirch) reviewed and approved by the agriculture ministry regulating
253 animal research in France (Ethics regional committee for animal experimentation Strasbourg,
254 APAFIS 1341#2015080309399690).

255 *AVP radioimmunoassay*

256 Male Sprague-Dawley rats were killed by decapitation, and trunk blood was collected on ice
257 (into 50 μ l of 0.3M EDTA (pH 7.4) per 1 ml of blood). Samples were centrifuged (2,600 x g,
258 4°C, 20 min), and the resulting plasma was split into 500 μ l aliquots, to which we added 168
259 μ l of 3N HCl before storage at -80°C. The AVP RIA was performed as previously described
260 ⁵, using a specific AVP-[Arg8] antibody (final dilution, 1/4.5) and [¹²⁵I]-(Tyr2Arg8)-AVP
261 (2200 Ci/mmol, Perkin-Elmer, Billerica, MA; 15000 dpm) as a tracer.

262 *Plasma protein binding of LIT01-196*

263 Plasma protein binding of LIT01-196 was determined using Thermo Scientific Single-Use
264 RED Plate (Rapid Equilibrium Dialysis) composed of dialysis inserts with a membrane cutoff
265 of 12 kDa. Compound (10 μ mol/l) was spiked in plasma chamber (donor side); phosphate
266 buffer was placed in the receiving side. The plate was rotated at 37 °C on an orbital shaker at
267 600 rpm for 4 hours. Peptide concentration was determined for the plasma sample that
268 represents the bound fraction, the peptide concentration was determined for the buffer sample
269 that represents the free fraction. The samples were analyzed by UHPLC-MS/MS (LC-MS
270 8030, Shimadzu, electrospray ion source) using a C18 column (Phenomenex 2.6 μ m Kinetex,
271 50 X 2.1 mm) and a linear gradient of solvent B 5-95% v/v over 1.2 min at a flow rate of 0.5
272 ml/min (solvent A: H₂O and 0.05% formic acid; solvent B: acetonitrile). Plasma samples (70
273 μ l) were treated with 70 μ l of phosphate buffer and 350 μ l of acetonitrile to precipitate the
274 proteins. Percentages of bound and free peptides were calculated as follows: % free peptide =
275 (peak area of buffer chamber / peak area of plasma chamber) x 100; % bound peptide = 100 -
276 % free.

277 *Histological analyzes*

278 Kidneys were fixed in paraformaldehyde 4% overnight and processed for paraffin embedding.
279 Sections of 4 µm thickness were made and stained with the periodic acid-Schiff (PAS)
280 reagent and counterstained with hematoxylin. Histological analyzes were performed by a
281 trained nephrologist (AF), blinded of the treatment group. Tubular injury score was scored
282 using the percentage of tubules that showed tubular atrophy or dilatation, loss of brush border,
283 vacuolization, epithelial cell shedding, and denuded tubular basement membrane, as follows:
284 0, normal; 1, <10%; 2, 10%–25%; 3, 25%–50%; 4, 50%–75%; 5, 75%–100%, and was
285 calculated from twenty viewing fields selected randomly from the outer medulla and
286 corticomedullary junction and were examined at ×400 magnification. Glomerulosclerosis
287 score was graded from 0 to 4 according to the percentage of glomerular involvement, with 1 a
288 lesion represented an involvement of 25% of the glomerulus, and a 4 a lesion indicated that
289 100% of the glomerulus was PAS positive, and was calculated from at least 20 glomeruli
290 selected randomly.

291 *Blood pressure measurements*

292 Rats were implanted with a right femoral artery catheter which was passed beneath the skin
293 under isoflurane anesthesia. Blood pressure (BP) was recorded in male alert Sprague Dawley
294 rats after a recovery period of at least 24 hours, with a PowerLab/Labchart system
295 (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) connected to the arterial catheter via a pressure
296 transducer. Mean arterial BP (MABP) was calculated from the arterial pressure signal as
297 previously described⁷. The compound was administered s.c. after baseline BP recording for at
298 least 30 minutes. BP was then measured at 3 and 24 hours after administration. At the end of
299 the experiment, animals were killed with a lethal dose of pentobarbital (Dolethal®, 150
300 mg/kg).

301

302 **Supplementary references**

- 303 1. Gerbier, R. *et al.* New structural insights into the apelin receptor: identification of key
304 residues for apelin binding. *FASEB J.* **29**, 314–322 (2015).
- 305 2. Hus-Citharel, A. *et al.* Apelin Counteracts Vasopressin-Induced Water Reabsorption via
306 Cross Talk Between Apelin and Vasopressin Receptor Signaling Pathways in the Rat
307 Collecting Duct. *Endocrinology* **155**, 4483–4493 (2014).
- 308 3. Murza, A. *et al.* C-Terminal modifications of apelin-13 significantly change ligand
309 binding, receptor signaling, and hypotensive action. *J. Med. Chem.* **58**, 2431–2440 (2015).
- 310 4. Zhang, Y. *et al.* Identifying structural determinants of potency for analogs of apelin-13:
311 integration of C-terminal truncation with structure-activity. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 2992–
312 2997 (2014).
- 313 5. De Mota, N. *et al.* Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions
314 through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl. Acad.*
315 *Sci. U.S.A.* **101**, 10464–10469 (2004).
- 316 6. Azizi, M. *et al.* Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli.
317 *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 1015–1024 (2008).
- 318 7. Reaux, A. *et al.* Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents.
319 *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13415–13420 (1999).

320

321

IX.2 Discussion

Nous avons tout d'abord commencé par vérifier que le LIT01-196 n'avait aucun effet sur le récepteur V2-R et avons montré que le LIT01-196, tout comme K17F, n'était pas capable de diminuer la production d'AMPc induite par l'AVP dans des cellules HEK293T transfectées uniquement avec le V2-R. Nous avons ensuite évalué, dans les cellules mpkCCD, que le LIT01-196, comme le K17F, inhibait la production d'AMPc induite par la FSK de l'ordre de 30% et celle induite par la dDAVP à 10^{-8} M de 79 et 75 % respectivement. Enfin, nous avons évalué dans des segments micro-disséqués de la médullaire externe du canal collecteur de rat que le LIT01-196 diminuait la production d'AMPc induite par la dDAVP, comme précédemment observé dans le laboratoire pour K17F (Hus-Citharel et al., 2008). Nous avons ensuite montré dans les cellules mpkCCD, que K17F et le LIT01-196 inhibaient la translocation de l'AQP2 phosphorylée induite par la dDAVP à la membrane apicale de ces cellules. Ceci suggère que le LIT01-196 bloque l'effet antidiurétique de l'AVP en diminuant la réabsorption d'eau dans le canal collecteur *via* la diminution de l'insertion des canaux perméables à l'eau à la membrane apicale. Avant d'évaluer les effets du LIT01-196 sur la diurèse chez le rat, nous avons déterminé sa demi-vie chez cet animal après administration par voie *i.v.* et *s.c.* Alors que par voie *i.v.*, la demi-vie de K17F est de 50 sec., celle du LIT01-196 est significativement augmentée à 28 min et elle est encore plus élevée après administration par voie *s.c.*, à 156 min. L'augmentation de la demi-vie *in vivo* du LIT01-196 dans la circulation sanguine comparée à K17F est probablement due au fait que le LIT01-196 se lie à 69 %, aux protéines plasmatiques, le protégeant ainsi contre la dégradation enzymatique et la réduction de la clairance rénale.

Nous avons par la suite comparé l'effet d'une administration par voie *s.c.* de 900 nmol/kg de LIT01-196 ou de tolvaptan sur la diurèse et l'osmolalité urinaire chez le rat Sprague-Dawley normo-natrémique. Nous avons ainsi observé que la diurèse sur 24 heures était augmentée de façon comparable dans les deux groupes d'animaux traités, de 79 % et 77 %, respectivement, avec en parallèle une diminution de l'osmolalité urinaire de 52 % et 40 %, respectivement. Les effets *in vivo* du LIT01-196 sur la diurèse, après administration par voie *s.c.*, impliquent une action au niveau du rein et non une action au niveau cérébral car nous avons montré que le LIT01-196 administré par voie *s.c.* ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. Ceci peut néanmoins être discuté car au niveau des organes circumventriculaires, qui contiennent des capillaires fenestrés comme l'organe subfornical, l'Apéline-R est exprimé et donc accessible aux taux circulants de LIT01-196. Sa stimulation pourrait entraîner une inhibition de la libération de l'AVP dans la circulation sanguine *via* les voies neuronales qui connectent le SFO au noyau

paraventriculaire où sont présents les corps cellulaires des neurones vasopressinergiques. Cependant, nous n'avons pas observé de baisse des taux plasmatiques d'AVP après une administration aiguë de LIT01-196 par voie *s.c.*

L'augmentation de la diurèse a été associée à une augmentation significative de la consommation d'eau dans le groupe tolvaptan (+37%) et à une légère augmentation non significative dans le groupe LIT01-196 (+11%). Par ailleurs, nous avons montré que la fraction d'excrétion urinaire du sodium n'est pas modifiée par l'administration de LIT01-196 ou de tolvaptan. La légère augmentation de la consommation d'eau induite par le LIT01-196 pourrait être liée au fait que l'administration *i.c.v.* de l'apéline-13, chez les rats privés d'eau pendant 24 h, réduit le comportement dipsique. De plus, chez les patients atteints de polydipsie primaire, les taux d'apéline circulants sont inférieurs à ceux des volontaires sains. Ces résultats suggèrent que l'activation de l'Apéline-R par le LIT01-196 au niveau des organes circumventriculaires comme le SFO, qui fait partie de la lamina terminalis, région située le long du troisième ventricule qui contrôle le comportement dipsique, pourrait limiter la prise d'eau associée à l'effet aquarétique du LIT01-196.

Suite à ces résultats, nous avons évalué et comparé les effets du LIT01-196 à ceux du tolvaptan dans un modèle expérimental d'hyponatrémie chez le rat. La perfusion continue d'AVP par voie *s.c.* (30 ng/h) à des rats pendant 4 jours, associée à un régime semi-liquide, entraîne une diminution de la diurèse, une augmentation de l'osmolalité urinaire et une diminution des taux plasmatiques de sodium, stables autour de 100 mmol/L pendant 2-4 jours après le début de la perfusion. Le LIT01-196 (900 nmol/kg) administré dans ce modèle d'hyponatrémie pendant 2 jours, par voie *s.c.*, inhibe efficacement les effets de l'AVP sur la diurèse et l'osmolalité urinaire et induit une correction progressive des taux plasmatiques de sodium.

Comme décrit précédemment, le tolvaptan, à une dose équimolaire, inhibe de façon similaire l'effet antidiurétique de l'AVP. Par ailleurs, nous avons montré que, si l'on augmente la dose de tolvaptan, on observe une augmentation encore plus importante de la diurèse. A l'inverse nous n'observons pas cet effet lorsque l'on augmente la dose de LIT01-196. Ces données suggèrent que le LIT01-196, contrairement au tolvaptan qui bloque la liaison de l'AVP sur le V2-R dans le canal collecteur, va agir indirectement en inhibant la production exacerbée d'AMPC induite par la perfusion continue d'AVP. Cette inhibition n'étant pas totale, elle va notamment dépendre du niveau d'expression de l'Apéline-R par rapport à celui du V2-R. Cette augmentation modérée de la diurèse aqueuse, par le LIT01-196, va avoir pour conséquence une correction progressive de l'hyponatrémie (Figure 18).

Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure une moindre efficacité clinique de LIT01-196, par rapport au tolvaptan, dans le traitement de l'hyponatrémie. Cependant, activer l'Apéline-R par le LIT01-196 et donc rétablir l'équilibre apéline/AVP dans le canal collecteur, plutôt que de bloquer les effets de l'AVP par le tolvaptan, entraîne une polyurie et une polydipsie moins sévères et pourrait être mieux toléré que le traitement par les antagonistes du V2-R (dont l'utilisation est associée à un syndrome polyuro-polydipsique majeur qui entraîne des arrêts de traitement), ce qui reste à déterminer.

Etant donné la présence de l'Apéline-R dans différents organes et son action sur la PA, la contractilité cardiaque et la tolérance au glucose, obtenir un agoniste de l'Apéline-R, biaisé pour la protéine Gi, aurait beaucoup d'avantages. En effet, il permettrait, d'une part de s'affranchir des effets de l'apéline qui sont liés à l'activation d'autres voies de signalisation notamment celles qui sont β -arrestine-dépendantes, et d'autre part d'augmenter l'activité Gi (diminution de la production d'AMPc) tout en diminuant la désensibilisation de l'Apéline-R lié à son internalisation.

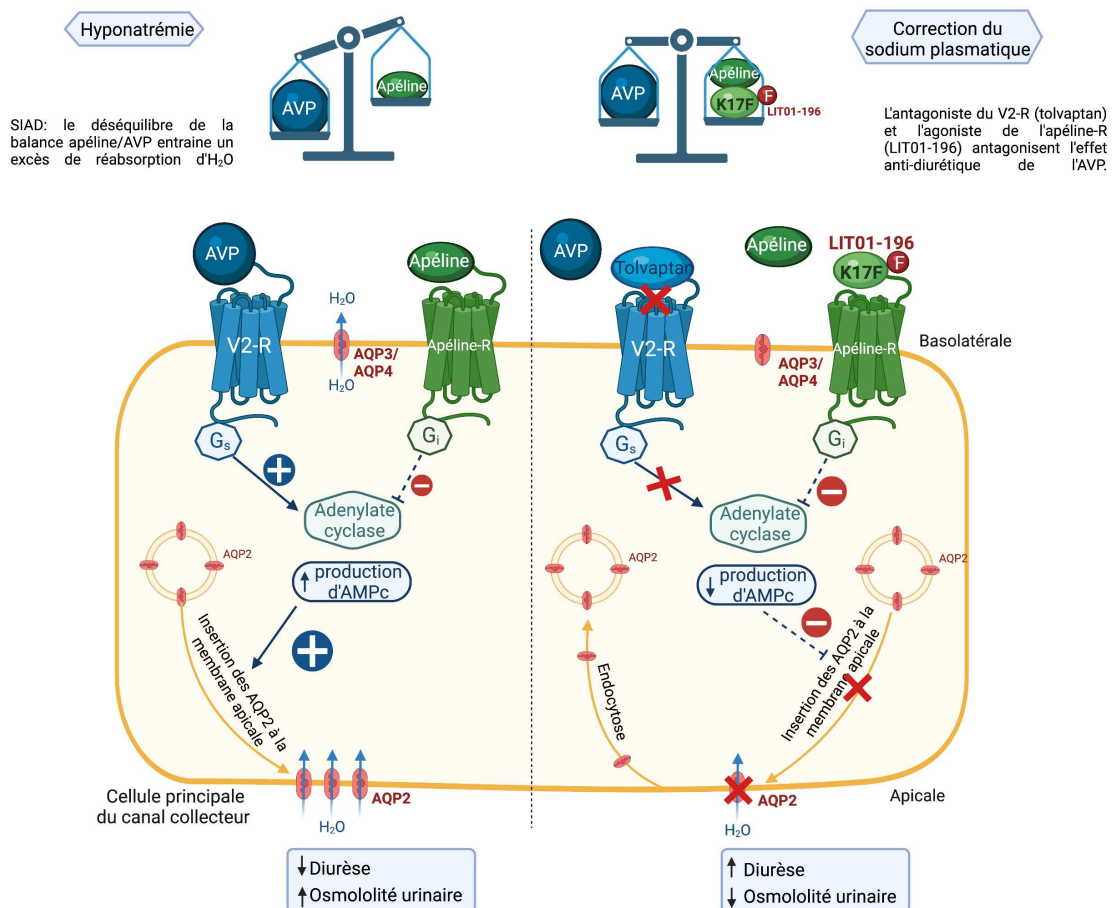


Figure 18 : Effets du LIT01-196 sur les cellules principales du canal collecteur dans le SIAD. Dans un modèle expérimental de SIAD, la sécrétion de l'AVP dans la circulation sanguine est inadaptée, trop élevée par rapport à l'osmolalité plasmatique. En se fixant sur le V2-R présent sur les cellules principales du canal collecteur, l'AVP

augmente la production d'AMPc, la mobilisation de l'aquaporine 2 (AQP2) à la membrane apicale et accroît la réabsorption d'eau, entraînant une hyponatrémie. L'administration du LIT01-196, un analogue métaboliquement stable de l'apéline-17 (K17F) en stimulant l'Apéline-R, localisé sur les cellules principales du canal collecteur, inhibe la production d'AMPc induite par l'AVP, réduit la mobilisation de l'AQP2 à la membrane apicale et la réabsorption d'eau, augmentant la diurèse aqueuse. Ceci a pour conséquence d'améliorer progressivement l'hyponatrémie. Adapté de (Flahault et al., 2021).

X Article 2. "The metabolically stable apelin-17 analog, LIT01-196, improves cardiac function and reduces remodeling in heart failure post-myocardial infarction"

X.1 Introduction

L'IC est un problème de santé publique majeur dans le monde, elle est associée à un mauvais pronostic, à une morbidité et une mortalité élevée. Elle touche au moins 26 millions de personnes et sa prévalence est en constante augmentation avec le vieillissement de la population. De nombreux médicaments sont actuellement disponibles, tels que des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, des bêtabloquants, des antagonistes des récepteurs de l'aldostérone et les antagonistes des récepteurs AT1.

Malgré l'arsenal thérapeutique disponible, on estime que 50% des patients diagnostiqués décèdent dans les 5 ans après l'apparition des premiers symptômes. Il existe donc un besoin de découvrir de nouveaux traitements visant de nouvelles cibles avec un mode d'action différent de ceux déjà établis. Le développement de nouvelles molécules agissant à la fois sur l'amélioration de la fonction cardiaque mais aussi sur la réduction des oedèmes présents chez les patients en IC sévère, demeure un enjeu important.

L'Apéline-R semble être une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Connue pour son implication dans la régulation de l'équilibre hydrique, l'apéline entraîne un effet aquarétique, à la fois par une action centrale, en inhibant la libération de l'AVP par les neurones magnocellulaire vasopressinergiques, et par une action directe au niveau du rein, en s'opposant aux effets antidiurétiques de l'AVP médiés par le V2-R dans les canaux collecteurs.

L'apéline est également impliquée dans plusieurs fonctions cardiovasculaires par le biais d'un effet vasodilatateur médié par le NO et d'un effet inotrope positif direct. De plus, il a été montré chez la souris, que l'administration systémique d'apéline entraîne une augmentation de la contractilité du myocarde, diminue les pré- et post-charges. A l'inverse, la contractilité cardiaque est altérée dans les modèles KO pour l'Apéline-R ou la préproapéline, à la fois spontanément et après ligature de l'artère coronaire. Chez l'homme, les taux plasmatiques d'apéline augmentent au début de l'IC mais chutent aux stades ultérieurs de la maladie. La perfusion *i.v.* d'apéline entraîne une augmentation de l'index cardiaque chez les sujets sains et les sujets atteints d'IC. De plus, en réponse à un stress pathologique, plusieurs études ont montré que l'axe apéline-APJ

était impliqué dans le remodelage myocardique et la fonction cardiaque (Foussal et al., 2010; Pchejetski et al., 2012).

Mais l'utilisation de l'apéline à des fins thérapeutiques est actuellement limitée par la demi-vie très courte du peptide endogène dans la circulation sanguine (moins de 1 min). Pour faire face à ce problème, nous avons développé un analogue de K17F métaboliquement stable, le LIT01-196. Le LIT01-196 a déjà montré *in vivo* des effets bénéfiques pour corriger l'hyponatrémie dans un modèle expérimental de SIAD (Flahault et al., 2021).

L'objectif de ce travail a été, tout d'abord de déterminer la demi-vie *in vivo* du composé après administration par voie *s.c.* chez la souris vigile. J'ai ensuite évalué les effets d'une administration aiguë du LIT01-196 par voie *s.c.* chez la souris saine anesthésiée, sur la fonction cardiaque mesurée par échocardiographie afin de déterminer la dose optimale de LIT01-196 pour induire une augmentation de la FEVG. Les résultats obtenus m'ont permis, par la suite, d'étudier les effets d'administration *s.c.* répétées de LIT01-196 (une fois par jour à la dose de 9mg/kg/jour) pendant 4 semaines dans un modèle expérimental d'IC obtenu après IM chez la souris. Le traitement a démarré 2 jours après l'IM afin d'évaluer les effets du LIT01-196 pendant le développement de l'IC. Pour cela, j'ai mesuré par échocardiographie différents paramètres de la fonction cardiaque chez des souris ayant reçu du sérum physiologique ou du LIT01-196. A la suite de ce traitement chronique pendant 31 jours, les paramètres hémodynamiques des souris ont été mesurés par cathéter intraventriculaire (Millar), les cœurs ont été prélevés pour effectuer des analyses histologiques afin d'évaluer l'hypertrophie et la fibrose cardiaques ainsi que la mesure de biomarqueurs d'IC, fibrose, inflammation et hypoxie.

The metabolically stable apelin-17 analog, LIT01-196, improves cardiac function and reduces remodeling in heart failure post-myocardial infarction

Pierre-Emmanuel Girault-Sotias¹, Solène E Boitard¹, Robin Deloux², Nadia De Mota¹, Alain Berdeaux³, Dominique Bonnet⁴, Onnik Agbulut², and Catherine Llorens-Cortes^{1,5}.

¹ Laboratory of Central Neuropeptides in the Regulation of Body Fluid Homeostasis and Cardiovascular Functions, Collège de France, CIRB, INSERM U1050/CNRS UMR7241, 75005 Paris, France; ² Sorbonne Université, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), CNRS UMR 8256, Inserm ERL U1164, Biological Adaptation and Ageing, 75005, Paris, France; ³ INSERM U955-IMRB Equipe 03 Université Paris Est Créteil, 94010 Créteil, France; ⁴ Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR7200 CNRS/Université de Strasbourg, Labex MEDALIS, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France; ⁵ Département Médicaments et Technologies pour la Santé, SIMoS, CNRS ERL9004, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

Aims Apelin, a neurovasoactive peptide induces vasodilatation, increases cardiac contractility and aqueous diuresis while exhibiting anti-inflammatory and anti-fibrotic effects. Considering the very short *in vivo* apelin half-life, we previously developed and used here a metabolically stable apelin-17 analog, LIT01-196 to investigate its effects on cardiac function, cardiac hypertrophy and fibrosis in a murine myocardial infarction (MI) model.

Methods and results The *in vivo* half-life of LIT01-196 was determined in male Swiss mice, receiving acute subcutaneous (*s.c.*) LIT01-196 administration, and plasma LIT01-196 levels were determined by radioimmunoassay. Two days after permanent coronary artery ligation, mice were randomized into two groups for receiving once daily, a 4-week treatment by *s.c.* route with LIT01-196 (MI+LIT01-196, 9 mg/kg/day) or saline (MI+saline). Left ventricular (LV) function was evaluated by echocardiography and Millar catheter and Sirius red staining was used to assess cardiac fibrosis.

LIT01-196 has an *in vivo* half-life of 2h40 min in the bloodstream after *s.c.* administration in mice. Then, 4 weeks post-MI, MI+LIT01-196 mice displayed a significant higher LV ejection fraction and significant smaller LV end-systolic diameters and volumes compared with MI+saline mice. LIT01-196 markedly and significantly reduced heart failure biomarkers mRNA expression and improved cardiac contractility, LV peak-systolic and end-diastolic pressures and arterial blood pressure, the values of which reached those found in a sham group. Moreover, LIT01-196 significantly reduced infarct size and cardiac fibrosis whereas it prevented the MI-induced decrease in the LV wall thickness.

Conclusion LIT01-196 treatment in post-MI mice during 4 weeks improves LV function without decreasing arterial blood pressure and decreases remodeling. Then Apelin-R activation may constitute an original approach for heart failure treatment post-MI

Keywords Heart failure, Apelin analog, Cardiac function, Fibrosis, Remodeling

Address of the corresponding author:

Catherine Llorens-Cortes, Tel: + 33 1 44 27 16 63 ; Fax : + 33 1 44 27 16 91; Email : c.llorens-cortes@college-de-france.fr

Introduction

Beside activation of the adrenergic system, activation of the renin-angiotensin systems (RAS) is well identified as a major factor contributing to the cardiac remodeling of the heart following acute myocardial infarction (MI).^{1,2} Through the increased production of angiotensin II (AngII), cardiac fibrosis develops and leads to the progressive increase in cardiac volume and diameter and ultimately to the reduction in ejection fraction,^{3,4} a hallmark of left ventricular heart failure (LVHF). Treatments with spironolactone⁵ as well as inhibitors of the RAS with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitors or antagonists of type 1 AngII receptors (AT1R)⁶ are since a long time well known to reduce cardiac fibrosis and subsequent remodeling of the myocardium following MI. However, and despite these current treatments mainly based on antagonizing hemodynamic stress and neurohormonal disorders in HF there is always a high unmet need for novel drugs acting on new targets for preventing cardiac remodeling and subsequent hemodynamic dysfunction following MI.

In addition to the RAS, other counter-regulatory hormonal systems like the natriuretic and the apelinergic systems are also involved in HF.⁷⁻⁹ Apelin, a neuro-vasoactive peptide, is the endogenous ligand of the human orphan G protein-coupled receptor, APJ, renamed the apelin receptor (Apelin-R).^{10,11} Apelin is a peptide derived from a 77-amino acid precursor, preproapelin¹⁰ and is expressed as well as its receptor in the brain, heart, kidneys and vessels.¹²⁻¹⁵

Known to be involved in the regulation of body fluid homeostasis, apelin increases aqueous diuresis by a central mechanism involving inhibition of arginine-vasopressin (AVP) release into the bloodstream¹⁶ as well as by a direct renal mechanism, counteracting the antidiuretic effect of AVP occurring *via* type 2 vasopressin receptors¹⁷. Apelin is also involved in several cardiovascular functions through a peripheral nitric oxide (NO)-mediated vasodilatory effect^{14,18,19} and a direct cardiac positive inotropic effect.^{20,21} In mice, systemic apelin administration increased myocardial contractility, decreased preload and afterload. Conversely, cardiac contractility is impaired in Apelin-R or preproapelin KO models, both spontaneously¹³ and after coronary artery ligation.²² Human plasma apelin levels rise in early

HF but fall in later stages of the disease.²³⁻²⁵ LV Apelin-R mRNA expression is lower in end-stage HF patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.²⁵ This suggests that the apelinergic system is up-regulated during the early stages of HF (probably as a compensatory mechanism), but depleted at the end stage of the disease. In agreement with this conclusion, intravenous (*i.v.*) apelin infusion in humans leads to an increase in cardiac index in healthy and HF subjects.²⁶ Moreover in response to pathological stress, apelin-APJ axis was shown to regulate myocardial remodeling and cardiac function.^{27,28}

Taken all together these physiological and pharmacological effects of apelin might contribute positively to counteract the deleterious consequences of cardiac remodeling following MI but the use of the natural peptide for therapeutic purposes is limited due to its short *in vivo* half-life (less than 1 min).²⁹ For these reasons we previously generated LIT01-196, a metabolically stable apelin-17 analog.²¹ We investigated here the effects of repeated subcutaneous (*s.c.*) administrations of LIT01-196 for 4 weeks to improve cardiac function and to reduce cardiac remodeling, in an experimental model of post-MI induced HF in mice.

Methods

Drugs, antibodies, and reagents.

LIT01-196 (200 mg) was synthesized by the Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (CNRS UMR7200, Illkirch, France) as previously described.²¹ The chemical structure of LIT01-196 is shown in *Figure 1A*. [¹²⁵I]-pE13F (monoiodinated on Lys⁸ with Bolton-Hunter reagent) was purchased from PerkinElmer (Wellesley, MA USA). Rabbit polyclonal antibodies directed against the apelin fragment K17F were produced in the laboratory, as previously described.³⁰ Isoflurane (Isovet), ketamine (Imalgen 1000, Merial, Lyon, France), xylazine (Rompun 2%, Bayer Healthcare, Loos, France), lidocaine (Lidor, Axience, Pantin, France), buprenorphine (Buprecaire, Axience, France) and Meloxicam (Metacam, Boehringer Ingelheim, Germany) were obtained from Centravet (Nancy, France). Drugs administered *s.c* were diluted in 0,9% NaCl (saline, 1 ml/kg) for injection

Experimental animals.

Adult male Swiss mice (25-30 g, 4-6 weeks) were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). Animals were kept under artificial light 12 h light / 12 h dark cycle) with ad libitum access to normal food and water. The housing rooms were thermoregulated (18-22°C) with controlled hygrometry (40%-60%). All procedures conformed to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes or current NIH guidelines. The experimental protocols were approved by the French Committee on Ethics in Animal Experimentation (CEEA n°59, Ref. APAFIS#22274-2019080111288819).

Subcutaneous treatment.

Animals were randomly assigned to three groups: 1) Sham receiving saline (Sham); 2) MI mice with saline (MI+saline); 3) MI mice with LIT01-196 (MI+LIT01-196) at a dose of 9 mg/kg once daily for 4 weeks by subcutaneous route (s.c.) (at different injection sites). The investigators were blinded to the treatment of each animal during the experiments. Drugs were always administered in the morning.

Myocardial infarction (MI) model.

The mouse model of HF used for this study was an ischemic model of MI obtained by the permanent surgical ligation of the descending left coronary artery (LAD). Surgical procedures for the myocardial infarction model are detailed in *online supplementary Methods*.

Echocardiographic measurements.

Cardiac function was assessed before surgery, 2- and 4-weeks post-MI by transthoracic echocardiography with a Vevo 2100 (FUJIFILM Visualsonics Inc, Toronto, Canada) equipped with a linear array 22–55 MHz MicroScan mouse cardiovascular transducer (MS550D) as detailed in *online supplementary Methods*.

Invasive hemodynamic studies.

LV hemodynamic parameters [(systolic arterial blood pressure (SABP), diastolic arterial BP (DABP), cardiac contractility (dP/dt max and min), LV peak systolic pressure (LVSP) and LV end-diastolic pressure (LVEDP)] measurements were performed using a Millar catheter (Mikro-Tip Catheter

Transducers SPR-671, Millar, Houston, USA) placed in the carotid artery and inserted into the LV in anesthetized mice. Surgical procedures for the *in vivo* hemodynamic measurement are detailed in *online supplementary Methods*.

Histological quantification of fibrosis.

Cardiac cryosections were stained as detailed in *online supplementary Methods*.

Real-time quantification of heart failure and fibrosis biomarkers gene expression.

Real-time quantification of gene expression from the cardiac apex is detailed in *online supplementary Methods*.

Plasma Brain Natriuretic Peptide (NT-ProBNP) levels quantification.

NT-ProBNP levels were determined in plasma samples, 4 weeks post-MI, with the Mouse Pro brain Natriuretic Peptide ELISA kit (CliniSciences, Nanterre, France), according to the manufacturer's instructions.

Apelin radioimmunoassay.

Plasma apelin levels were measured by radioimmunoassay (RIA), as previously described^{16,31} using the K17F antiserum that we produced and previously characterized,²¹ as detailed in *online supplementary Methods*. The antibody directed against K17F recognized K17F and LIT01-196 with a similar affinity (IC₅₀ values: 0.11 ± 0.01 nmol/l and 0.56 ± 0.04 nmol/l, respectively). Mean IC₅₀ values for inhibition of the binding of [¹²⁵I]pE13F to the apelin antiserum were 0.28 ± 0.08 nM. The minimal concentration of pE13F required for significant displacement of the tracer was 6 fmol.

Statistical analysis.

Data are expressed as mean ± SEM. Differences were analyzed by one-way or two-way ANOVA analysis of variance followed by Sidak's or Tukey's post hoc test for multiple comparisons as appropriate in experiments including ≥ 3 groups. The normality of the data was assessed visually and with the Shapiro-Wilk normality test. A minimum value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism software 8.0.

Results

In vivo half-life of LIT01-196.

The antibody directed against K17F used to measure plasma LIT01-196 levels recognized K17F and LIT01-196 with a similar affinity (IC_{50} values: 0.11 ± 0.01 nmol/l and 0.56 ± 0.04 nmol/l, respectively). Plasma apelin-immunoreactive (apelin-IR) baseline levels correspond to plasma endogenous apelin levels and plasma apelin + LIT01-196 levels after s.c. administration of LIT01-196 ($9 \text{ mg/kg} = 2700 \text{ nmol/kg}$) correspond to plasma endogenous apelin levels plus plasma LIT01-196 levels.

In conscious mice, basal plasma apelin-IR levels were 0.6 ± 0.1 pmol/ml. The time course of plasma apelin + LIT01-196 levels after s.c. administration of

LIT01-196 to conscious mice was shown in *Figure 1B*. LIT01-196 treatment led to a sharp increase in plasma apelin+LIT01-196 levels, reaching the C_{max} value (164 ± 18 pmol/ml) at 90 min after s.c. administration. Then plasma apelin+LIT01-196 levels decreased rapidly to return to basal values after 12 h (1.2 ± 0.1 pmol/ml). The analysis of the rate of disappearance of plasma apelin+LIT01-196 levels after LIT01-196 treatment was performed using an exponential one phase decay equation (GraphPad Prism). The kinetic of disappearance corresponded to a first-order elimination model ($r = 0.96$), leading to an *in vivo* half-life for LIT01-196 in the mouse bloodstream after s.c. administration of 142 min (*Figure 1B*), a value very similar to the half-life of LIT01-196 in the rat bloodstream 156 min as previously shown.²⁹

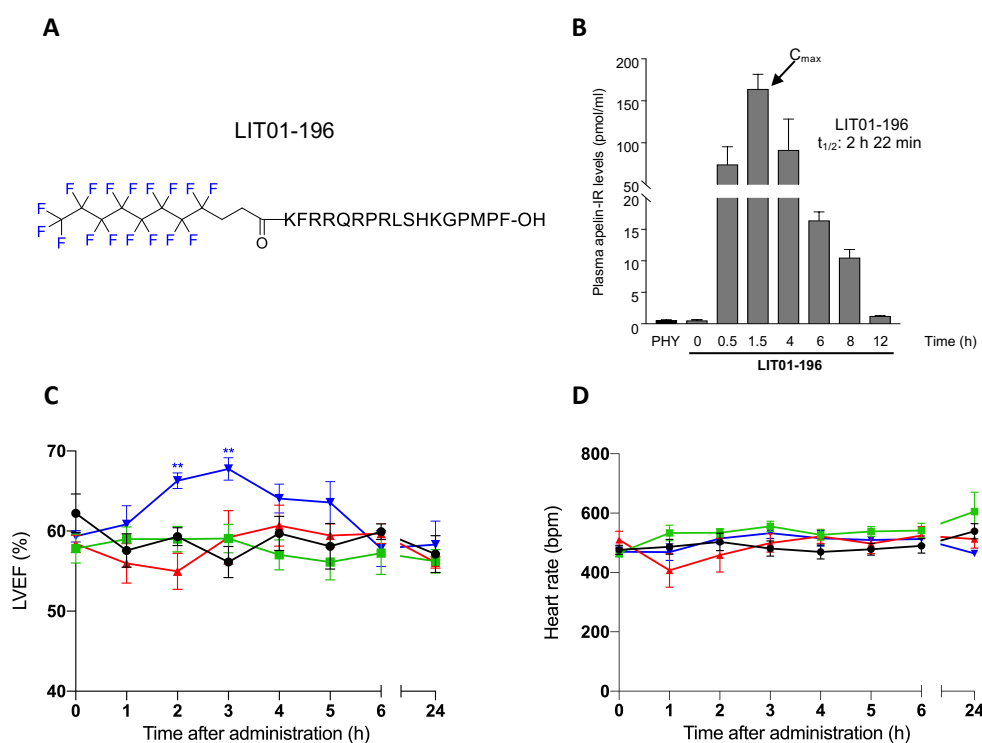


Figure 1 *In vivo* half-life of LIT01-196 and effects of acute s.c. saline and LIT01-196 administration on LV ejection fraction (LVEF) and heart rate (HR) in control mice. (A) Chemical structure of LIT01-196. (B) *In vivo* half-life of LIT01-196 following acute s.c. administration ($2700 \text{ nmol/kg} = 9 \text{ mg/kg}$) in conscious mice (for each time $n = 3$ to 7). (C) LVEF (%) and (D) HR (bpm) were measured by echocardiography in mice, at different times, after acute administration by s.c. route of LIT01-196 at different doses (green line, 300 nmol/kg , $n = 6$; red line, 900 nmol/kg , $n = 6$; blue line, 2700 nmol/kg , $n = 6$), or saline (black line, 1 ml/kg , $n = 6$). Data are presented as mean \pm SEM. Multiple comparison tests were performed using two-way ANOVA followed by Tukey's tests. ** $P < 0.01$.

Determination of the dose of LIT01-196 to observe after acute administration an effect on left ventricular ejection fraction in control mice.

The effects of acute LIT01-196 administration on LVEF in control mice were shown in *Figure 1* and

online supplementary Table S1. Acute s.c. administration of LIT01-196 at the dose of 1 or 3 mg/kg (300 or 900 nmol/kg , $n = 6$ for each group) did not induce any significant change in LVEF when compared to saline-treated mice (*Figure 1C*). In contrast s.c. administration of LIT01-196 at the dose of 9 mg/kg ($n = 6$) induced a progressive increase in

LVEF. The increase in LVEF was significant after 2 h ($66.3 \pm 1.0 \%$), maximal after 3 h ($67.8 \pm 1.4 \%$) and still present after 5 h when compared to control mice receiving saline (1 ml/kg, $n = 6$). After 24 h, the LVEF of mice in the different groups had returned to their initial value (baseline) (*Figure 1C*). Acute s.c. LIT01-196 administration did not cause any change in HR whatever the dose used (*Figure 1D*). Therefore, the dose of 9 mg/kg of LIT01-196 given by s.c. route was selected to study the effects of chronic administration of this compound for 4 weeks on cardiac function in mice post-MI.

Effects of chronic LIT01-196 treatment on cardiac function.

A total of 84 mice were randomized to MI or sham surgery, 24 mice died during the surgical procedure (29% mortality in the MI groups). All mice died from ventricular fibrillation within 60 min of left anterior descending coronary artery ligation. No mortality was observed during the subsequent stages of the study in sham-operated mice (Sham). Mortality in the MI+vehicle and the MI+LIT01-196 groups during the subsequent stages of the study was 35% and 15% respectively. In total, 7 mice with infarct sizes of <15% were excluded from the analysis (4 mice in the MI-vehicle group, 3 mice in the MI+ LIT01-196 group), leaving a total of 39 mice for the current analysis. The final group sizes were 14 for Sham, 13 for MI+vehicle mice, 12 for MI+LIT01-196 mice.

MI was induced by ligation of the LAD on day 0, then 2 days after surgery, s.c. treatment of the animals was initiated, either with saline (1 ml/kg) or LIT01-196 (9 mg/kg), once daily during 4 weeks (*Figure 2A*). As expected, MI resulted in a reduction in LVEF at 2- and 4-weeks post-MI compared with the corresponding values obtained in Sham (*Figures 2B, 2C and 2E, Table 1*). At 2- and 4-weeks post-MI, LVEF was significantly higher in MI+LIT01-196 mice compared to the MI+saline group (*Figure 2E, Table 1*). The LVEF values in the MI+LIT01-196 group at 2- and 4-weeks post-MI remained significantly lower than the corresponding values measured in Sham (*Figure 2D and 2E, Table 1*).

Effects of chronic LIT01-196 treatment on LV dilatation and LV wall thickness

At 4 weeks post-MI, the mean body weight was identical in the 3 groups of mice (Sham: 41.0 ± 0.7 g,

MI+saline: 39.6 ± 1.0 g and MI+LIT01-196: 38.9 ± 1.0 g). At 2- and 4-weeks post-MI, MI resulted in significant LV dilatation as shown by the significant increase in LVEDD, LVESD, LVEDV, LVESV and fractional shortening (FS) observed in the MI+saline group compared to Sham (*Figure 2F-I, Table 1; online supplementary Figure S1A and Table S2*).

LIT01-196 treatment significantly reduced LVESD when compared to MI+saline mice, at two and 4 weeks post-MI (*Figure 2G, Table 1*) but remained nevertheless significantly higher than the corresponding values obtained in Sham (*Figure 2G, Table 1*) MI+LIT01-196 mice displayed a non-significant decrease in LVEDD when compared to MI+saline mice at 2- and 4-weeks post-MI (*Figure 2F, Table 1*) but were also not significantly different from the corresponding values obtained in Sham at 2 weeks post-MI whereas after 4 weeks, they became significantly different (*Figure 2F, Table 1*).

Treatment with LIT01-196 significantly decreased LVESV when compared with MI+saline mice after 2- and 4-weeks post-MI but remained significantly different from basal values measured in Sham (*Figure 2I, Table 1*). Similarly, treatment with LIT01-196 for 2- and 4-weeks decreased LVEDV to values which were not significantly different from those found in MI+saline mice but were also not significantly different from the corresponding values obtained in Sham at 2 weeks post-MI whereas after 4 weeks, they became significantly different (*Figure 2H, Table 1*).

In MI+LIT01-196 mice, FS significantly increased when compared to MI+saline mice at 2- and 4-weeks post-MI but remained significantly lower than the corresponding values measured in Sham (*online supplementary Figure S1A and Table S2*).

LV posterior wall thickness in systole (LVPWs) and diastole (LVPWd) values were shown in *online supplementary Figure S1C and D, Table S2*. Only LVPWs was significantly decreased in MI+saline mice at 4 weeks post-MI when compared to Sham. LIT01-196 treatment during for 4 weeks significantly increased LVPWs when compared to MI+saline, reaching control values measured in Sham.

Treatment with LIT01-196 for 4 weeks post-MI did not modify HR when compared to MI+saline or Sham (sham: 496 ± 17 bpm, MI \pm saline: 516 ± 18 bpm and MI \pm LIT01-196: 445 ± 26 bpm).

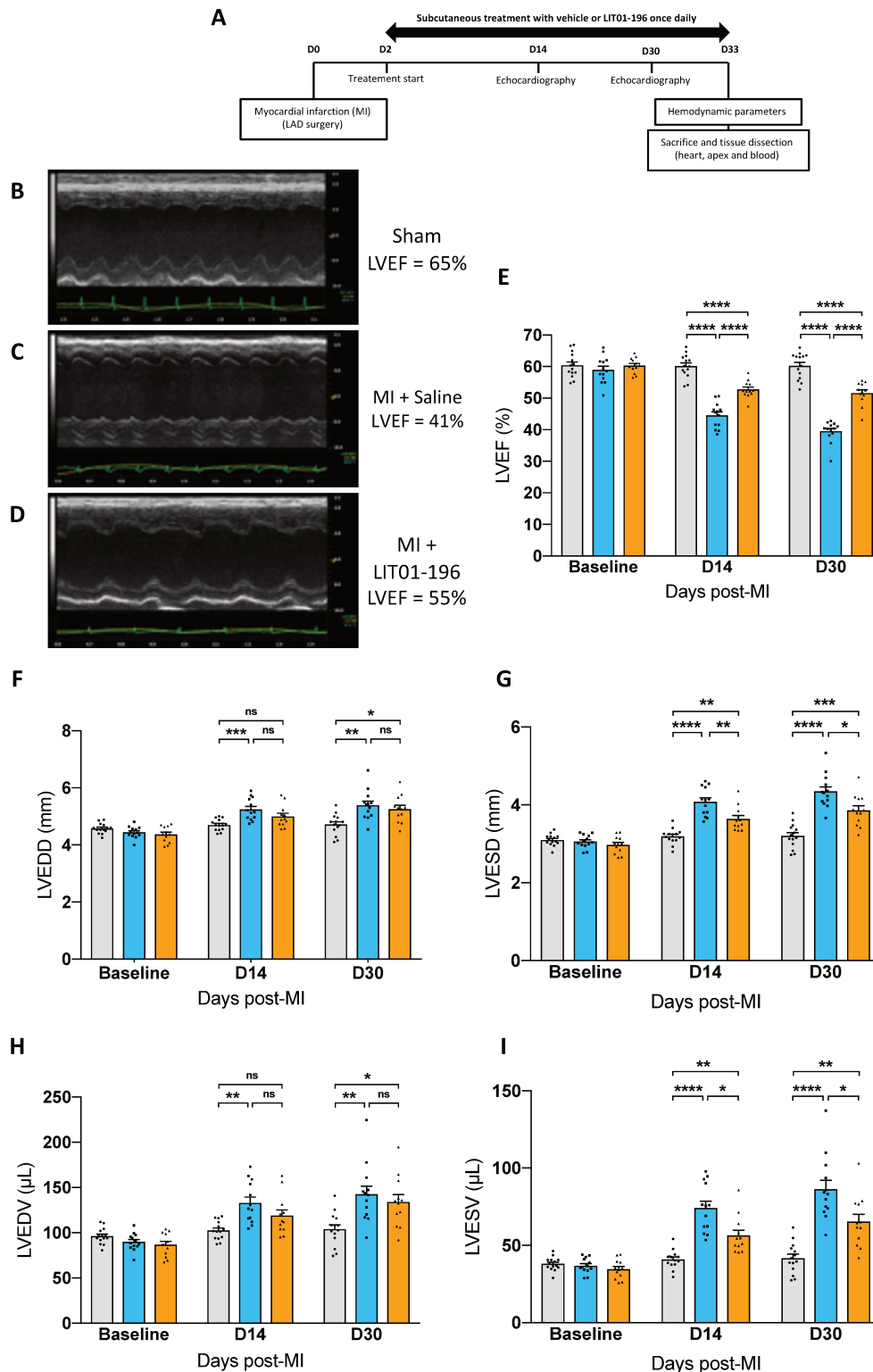


Figure 2 Effects of repeated administrations of LIT01-196 by s.c. route in mice post-MI on cardiac function. (A) Schematic experimental design of the study: Chronic oral subcutaneous treatment with LIT01-196 was compared with saline in mice over a 4-week period beginning 2 days after MI. Cardiac function was monitored by echocardiography at two-week intervals and hemodynamic parameters were measured before euthanasia by Millar catheters. (B-D) Representative echocardiography two-dimensional guided M-mode from parasternal short axis views outside of the MI region from different experimental groups. (E) LVEF % (F) LVEDD, (G) LVESD, (H) LVEDV, (I) LVESV, measured by echocardiography at different times, before surgery, 14 days post-MI and 28 days post-MI among the different groups. Mice with MI were injected s.c. once daily for 28 consecutive days with saline (blue bars and squares, 1 ml/kg, $n = 15$ animals), or LIT01-196 (orange bars and triangles, 2600 nmol/kg, $n = 12$ animals). Sham received a s.c. injection of saline (gray bars and circles, 1 ml/kg, $n = 13$ animals). Data are shown as mean \pm SEM. Multiple comparisons performed by two-way ANOVA with Tukey's adjustment for multiple comparisons. n.s.: $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Table 1: Absolute values (mean \pm SEM) of the different parameters measured by echocardiography after chronic treatment with LIT01-196

	weeks Post-MI	Sham (n=14)	MI + saline (n=13)	MI + LIT01-196 (n=12)
Fig. 2E - LVEF (%)	2	60.2 \pm 1.0	44.5 \pm 1.1####	52.8 \pm 0.8****, ###
	4	60.2 \pm 1.1	39.5 \pm 0.9####	51.6 \pm 1.0****, ###
Fig. 2F – LVEDD (mm)	2	4.7 \pm 0.1	5.2 \pm 0.1###	5.0 \pm 0.1NS, ns
	4	4.7 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1##	5.3 \pm 0.1NS, #
Fig. 2G – LVESD (mm)	2	3.2 \pm 0.1	4.1 \pm 0.1####	3.6 \pm 0.1**, ##
	4	3.2 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1####	3.9 \pm 0.1*, ###
Fig. 2H - LVEDV (μl)	2	102.6 \pm 2.8	133.1 \pm 6.3##	119.0 \pm 6.3NS, ns
	4	104.0 \pm 4.9	142.6 \pm 9.0##	134.0 \pm 8.1NS, #
Fig. 2I - LVESV (μl)	2	40.9 \pm 1.6	74.2 \pm 4.3####	56.4 \pm 3.5*, ##
	4	41.7 \pm 2.7	86.3 \pm 5.8####	65.3 \pm 4.8*, ##

$P < 0.05$ vs sham operated mice
 ## $P < 0.01$ vs sham operated mice
 ### $P < 0.001$ vs sham operated mice
 #### $P < 0.0001$ vs sham operated mice
 ns, not significant vs sham operated mice

* $P < 0.05$ vs MI + saline group
 ** $P < 0.01$ vs MI + saline group
 **** $P < 0.0001$ vs MI + saline group
 NS, not significant vs MI + saline group

Effects of chronic treatment with LIT01-196 on hemodynamic parameters.

Thirty one days post-MI, SABP and DABP were significantly decreased in MI+saline mice when compared to Sham (*Figure 3A and 3B, Table 2*). In MI+LIT01-196 mice, SABP and DABP were significantly increased when compared to MI+saline mice and not significantly different from control values measured in Sham (*Figure 3A and 3B, Table 2*).

Thirty one days after MI, MI+saline mice exhibited a decrease in dP/dt max and increase in dP/dt min as compared to Sham (*Figure 3C and 3D, Table 2*). Chronic treatment with LIT01-196 for 31 days post-MI improved cardiac contractility when compared with MI+saline mice as shown by the improvement of dP/dt max and dP/dt min values which became not significantly different from those measured in Sham (*Figure 3C and 3D, Table 2*). Chronic LIT01-196 treatment for 31 days post-MI, also significantly increased LVPSP and decreased LVEDP when compared with MI+saline mice (*Figure 3E and 3F, Table 2*). Furthermore, LVPSP and LVEDP values in MI+LIT01-196 mice were similar to those measured in Sham (*Figure 3E and 3F, Table 2*). Treatment with LIT01-196 for 31 days post-MI did not modify HR when compared to MI+saline or Sham (*Table 2*). Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-2 (SERCA-2) mRNA levels significantly decreased by 67% in the cardiac apex when compared to Sham (*Table 2, online supplementary Figure S2A*).

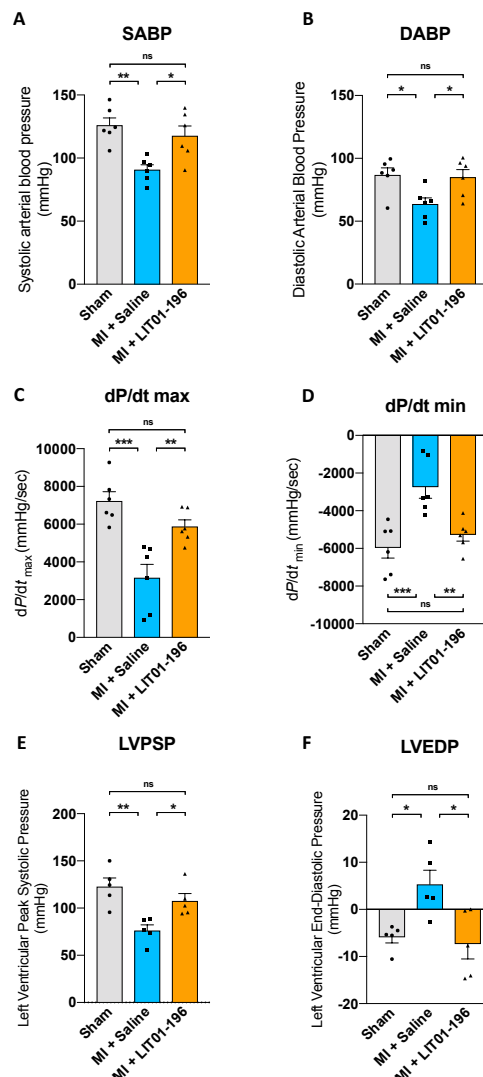


Figure 4 Hemodynamic parameters in mice treated with LIT01-196 or saline after 4 weeks of myocardial infarction. Measurement of: (A) SABP, (B) DABP, (C) dP/dt max, (D) dP/dt min, (E) LVPSP and (F) LVEDP in anaesthetized mice receiving during 28 days, a s.c. saline solution. (gray bars and circles, 1

ml/kg, n=5-6 animals) for sham and MI+saline mice (blue bars and squares, 1 mL/kg, n=5-6 animals), or LIT01-196 for MI+LIT01-196 mice (orange bars and triangles, 2600 nmol/kg, n=5-6 animals) 3 h before measurement. The right carotid artery of the mice was catheterized as described in the methods section. Data are presented as mean \pm SEM. Multiple comparison test performed by one-way ANOVA with Tukey adjustment for multiple comparisons. n.s.: $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Chronic LIT01-196 treatment for 31 days post-MI significantly increased SERCA-2 mRNA expression when compared with MI+saline mice which nevertheless remained lower than the corresponding value measured in Sham (*Table 2, online supplementary Figure S2A*).

Table 2. Absolute values (mean \pm SEM) of heart hemodynamic parameters after chronic treatment with LIT01-196, during 31 days in mice post MI

	Sham	n	MI+saline	n	MI+LIT01-196	n
Fig. 3A - SABP (mmHg)	126.1 \pm 5.8	6	90.8 \pm 3.9 [#]	6	117.7 \pm 7.7 ^{*, ns}	6
Fig. 3B - DABP (mmHg)	86.8 \pm 5.6	6	63.7 \pm 4.8 [#]	6	85.0 \pm 6.0 ^{*, ns}	6
Fig. 3C - dP/dt max (mmHg/sec)	7226 \pm 498	6	3161 \pm 712 ^{###}	6	5880 \pm 353 ^{**^{ns}}	6
Fig. 3D - dP/dt min (mmHg/sec)	-5974 \pm 538	6	-2748 \pm 586 ^{###}	6	-5282 \pm 329 ^{**^{ns}}	6
Fig. 3E- LVPSP (mmHg)	122.8 \pm 9.0	5	76.3 \pm 6.0 [#]	5	107.7 \pm 7.7 ^{*, ns}	5
Fig. 3F- LVEDP (mmHg)	-5.9 \pm 1.2	5	5.3 \pm 3.0 [#]	5	-7.3 \pm 3.2 ^{*, ns}	5
Heart rate (bpm)	283 \pm 12	6	267 \pm 11 ^{ns}	6	281 \pm 6 ^{NS, ns}	6
Fig. S2B- Relative mRNA expression of SERCA-2 (AU)	507 \pm 17	10	167 \pm 19 ^{####}	10	310 \pm 18 ^{****, ####}	10

[#] $P < 0.05$ vs sham operated mice

^{##} $P < 0.01$ vs sham operated mice

^{###} $P < 0.001$ vs sham operated mice

^{####} $P < 0.0001$ vs sham operated mice

ns, not significant vs sham operated mice

* $P < 0.05$ vs MI + saline group

** $P < 0.01$ vs MI + saline group

NS, not significant vs MI + vehicle group

Effects of chronic treatment with LIT01-196 on heart failure biomarkers

HF biomarkers were assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the apex (*Figure 4, online supplementary Table S3*). MI significantly increased Atrial natriuretic factor (Anf) and Brain natriuretic peptide (Bnp) (*Figure 4A and 4B*) mRNA levels, confirming the relevance of the post-MI mouse model as a model of HF with reduced

EF. LIT01-196 treatment for 31 days post-MI in mice significantly reduced Anf and Bnp mRNA levels when compared to MI+saline mice (*Figure 4A and 4B*). A significant increase in plasma NT-ProBNP levels was also observed at 31 days post-MI in mice treated with saline when compared to Sham (*Figure 4C*). However, after 31 days of treatment with LIT01-196, a significant decrease in plasma NT-ProBNP levels was observed when compared to the MI+saline group (*Figure 4C*).

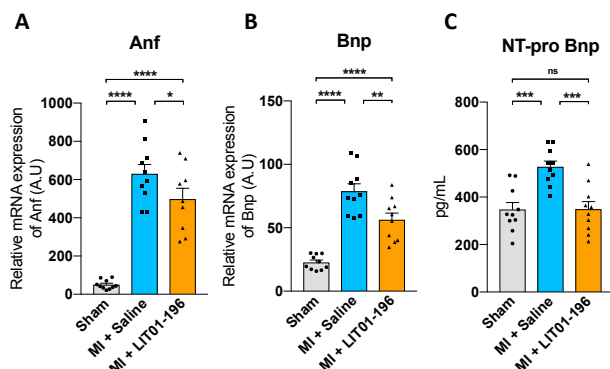


Figure 4 Chronic treatment with LIT01-196 reduces the expression of heart failure biomarkers. (A-B) Anf and Bnp mRNA levels, (C) Plasma NT-ProBnp levels

Effects of chronic treatment with LIT01-196 on cardiac fibrosis and hypoxia.

We investigated the effects of LIT01-196 treatment during 31 days in mice post-MI on cardiac fibrosis by quantifying, on 10- μ m-thick heart sections, the percentage of collagen type I (Col I) and III (Col III) fibers after Sirius red staining (*Figure 5A*). The percentage of cardiac fibrosis quantified in the total heart significantly increased in MI+saline mice when compared to Sham (*Figure 5B, Table 3*).

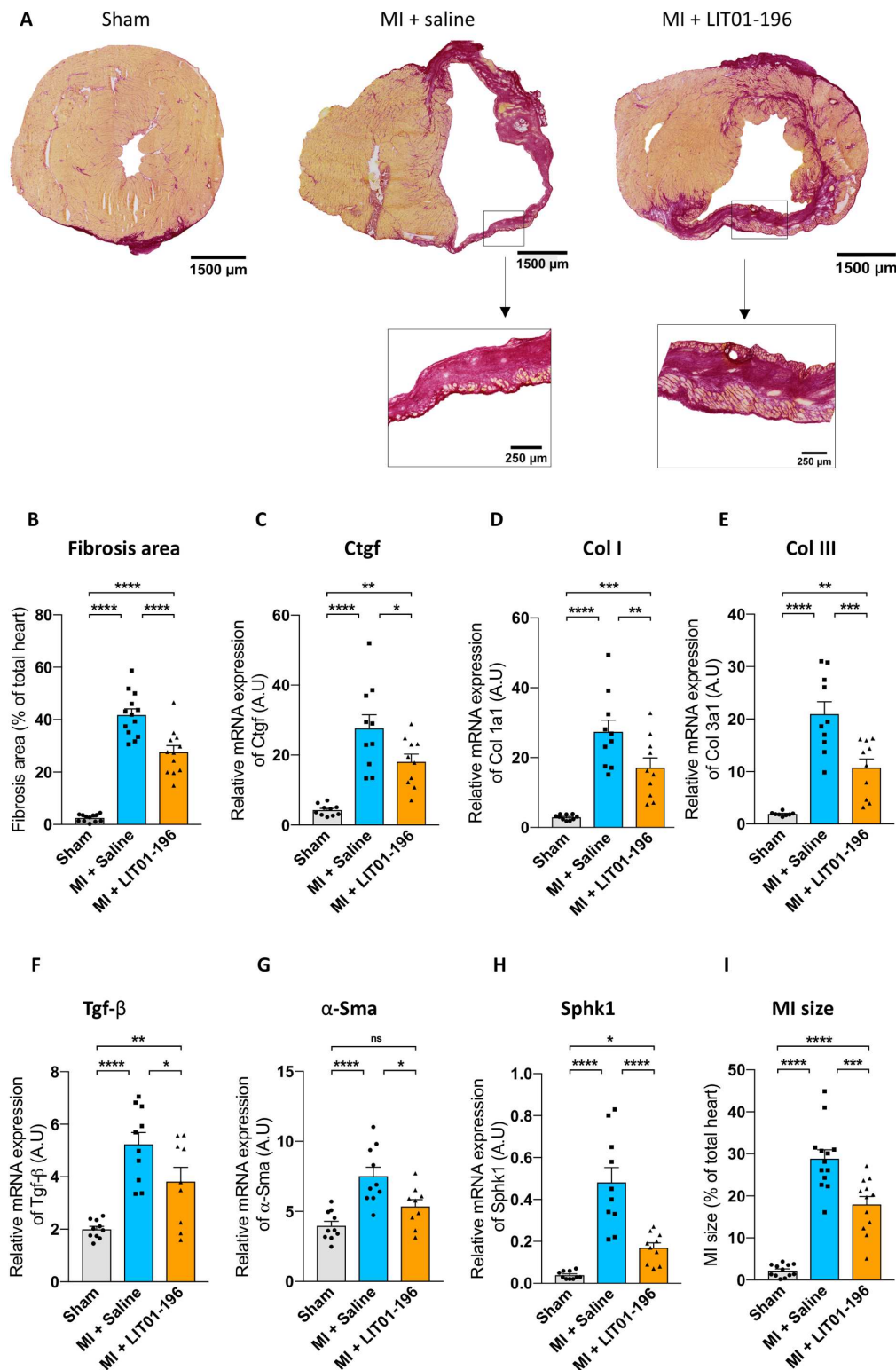


Figure 5 Chronic treatment with LIT01-196 reduces infarct size and fibrotic remodeling induced by myocardial infarction in mice. (A) Representative Sirus red staining heart sections (10- μ m-thick) of mice subjected to MI or sham surgery and given 1 ml/kg/day s.c. of saline solution or 9 mg/kg/day of LIT01-196 for 31 days followed by collection of heart. (B) Quantification of fibrosis on total heart ($n=13$ for Sham; $n=14$ for MI+saline group and $n=12$ for MI+LIT01-196 group). (C-H) Relative mRNA levels for fibrosis markers Ctgf, Col I, Col III, Tgf- β , α -Sma, Sphk1 normalized against Sham with two housekeeping genes (Hmbs and Sdha) as a reference, 31 days post-MI in the cardiac apex. (I) Evaluation of MI size on total heart. Mean \pm SEM of 9 to 14 mice for each set of conditions. One-way ANOVA followed by Tukey's tests for multiple comparisons. n.s.: $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Treatment with LIT01-196 for 31 days post-MI strongly reduced cardiac fibrosis when compared to MI+saline mice (Figure 5B, Table 3). The mRNA expression levels for genes involved in fibrosis, such as Connective tissue growth factor (Ctgf, Figure 5C), Col I (Figure 5D), Col III (Figure 5E), Transforming growth factor- β (Tgf- β) (Figure 5F), α -Smooth muscle actin (α -Sma) (Figure 5G) and Sphingosine Kinase 1 (SphK1) (Figure 5H) were significantly higher in MI+saline mice than in Sham (Table 3). After LIT01-196 treatment during 31 days in mice post-MI, mRNA levels for cardiac fibrosis biomarkers were significantly decreased when compared with MI+saline mice but remained significantly higher than in Sham, except for α -Sma

which returned to control values measured in Sham (Table 3).

Hif1- α mRNA expression, a hypoxia biomarker, was higher in the MI+saline group than in the Sham group (Table 3, online supplementary Fig. S2B). After LIT01-196 treatment during 31 days in mice post-MI, Hif1- α mRNA expression was significantly decreased when compared with MI+saline mice but remained significantly higher than the corresponding value measured in Sham (Table 3, online supplementary Fig. S2B).

On heart sections, after Sirius red staining, we measured the LV infarct size. The average LV infarct size 31 days post-MI was 29 % and was significantly decreased by treatment with LIT01-196 to 18% compared to MI+saline mice (Figure 5I, Table 3).

Table 3. Absolute values (mean \pm SEM) of cardiac fibrosis and hypoxia after chronic treatment with LIT01-196 administered, during 31 days in mice post MI

	Sham	n	MI+saline	n	MI+LIT01-196	n
Fig. 5B - Fibrosis area (% of total heart)	2.5 \pm 0.4	12	41.8 \pm 2.3 ^{#####}	13	27.6 \pm 2.5 ^{****, #####}	12
Fig. 5C - Relative mRNA expression of Ctgf (AU)	4.3 \pm 0.5	10	27.6 \pm 3.9 ^{#####}	10	18.1 \pm 2.2 ^{*, ##}	10
Fig. 5D - Relative mRNA expression of Col I (AU)	2.9 \pm 0.2	10	27.4 \pm 3.4 ^{#####}	10	17.1 \pm 2.8 ^{**, ##}	10
Fig. 5E - Relative mRNA expression of Col III (AU)	1.9 \pm 0.1	8	21.0 \pm 2.3 ^{#####}	10	10.7 \pm 1.7 ^{***, ##}	10
Fig. 5F - Relative mRNA expression of Tgf-β (AU)	2.0 \pm 0.1	10	5.2 \pm 0.4 ^{#####}	10	3.8 \pm 0.5 ^{*, ##}	9
Fig. 5G - Relative mRNA expression of α-Sma (AU)	4.0 \pm 0.3	10	7.5 \pm 0.6 ^{#####}	10	5.4 \pm 0.5 ^{*, ns}	9
Fig. 5H - Relative mRNA expression of Sphk1 (AU)	0.04 \pm 0.006	10	0.5 \pm 0.07 ^{#####}	10	0.2 \pm 0.02 ^{****, #}	10
Fig. 5I - MI size (% of total heart)	2.2 \pm 0.4	12	28.9 \pm 2.1 ^{#####}	13	18.0 \pm 1.9 ^{***, #####}	12
Fig. S2A- Relative mRNA expression of Hif1-α (AU)	2.2 \pm 0.1	10	5.9 \pm 0.4 ^{#####}	10	4.9 \pm 0.3 ^{*, #####}	10

$P < 0.01$ vs sham operated mice

$P < 0.001$ vs sham operated mice

$P < 0.0001$ vs sham operated mice

* $P < 0.05$ vs MI + saline group

** $P < 0.01$ vs MI + saline group

*** $P < 0.001$ vs MI + saline group

**** $P < 0.0001$ vs MI + vehicle group

Discussion

We demonstrate in this study that the chronic s.c. administration of a metabolically stable K17F analog, LIT01-196, for 4 weeks in mice post-MI improves cardiac function by increasing LVEF and maintaining normal hemodynamic parameters such as dp/dt max and min, LVEDP and LVPSF without decreasing BP and reduces cardiac remodeling by limiting infarct size, ventricular dilatation, LV wall thinning, and

cardiac fibrosis. These results provide evidence for a critical role of apelin in the regulation of cardiac function and remodeling post-MI and suggest the use of Apelin-R agonists as a new therapeutic approach to prevent the development of HF post-MI.

We previously showed that LIT01-196 bound to the Apelin-R with a subnanomolar affinity, behaved as a full agonist for cAMP production, ERK1/2 phosphorylation, β -arrestin recruitment, and Apelin-R internalization and was much more stable in plasma (half-life >24 h than K17F (4.6min)).²¹ In the present

study, we show that LIT01-196 has an *in vivo* half-life of 2 h 40 min in the bloodstream after acute s.c. administration in mice. This leads 1h and 30 min after LIT01-196 administration at the dose of 9 mg/kg to a maximal plasma concentration of 164 nM, corresponding to a concentration 2050 times higher than its affinity (K_i : 0.08 nM) for the murine Apelin-R²¹ and which remains 125 times above the K_i value eight hours after administration. The increase of the *in vivo* half-life of LIT01-196 in the blood circulation is probably due to the fact that LIT01-196 displays a 69% binding to plasma proteins³², leading to its protection from enzymatic degradation and to the reduction of its renal clearance.

Subsequently, we have determined in control mice the optimal dose of LIT01-196 (9 mg/kg, *s.c*) able to significantly improve cardiac performance independently from HR and used it for chronic treatment in mice post MI.

Chronic s.c. administration of LIT01-196 in mice post-MI during 4 weeks improves cardiac function as shown by the significant increase in LVEF, FS, LVSP and the improvement of LVEDP. The latter effect is in agreement with the effect of the non-peptidic Apelin-R agonist, AM-8123, which was shown to improve diastolic function in rats post-MI.³³ The LVEDP improvement may reflect a better volume regulation since LIT01-196 was shown to be a potent aquaretic by inhibiting in the collecting duct the anti-diuretic action of AVP, improving preload.^{21,32}

Chronic LIT01-196 administration also improved cardiac contractility as shown by the improvement of dP/dt max and dP/dt min as compared to MI+saline group. SERCA2 is the primary cardiac isoform regulating intracellular Ca²⁺ homeostasis.³⁴ Its downregulation in HF leads to a loss of cardiac contractility whereas increased expression of SERCA2a improves contractility.^{35,36} In our study, SERCA2 mRNA expression in the LV tissue was decreased post-MI as previously shown.³⁷ LIT01-196 treatment significantly doubled SERCA2 mRNA expression compared to MI+saline mice. Therefore, the favorable effect of LIT01-196 on cardiac contractility post-MI could be related in part to the increased SERCA2 expression which increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content, involved in excitation–contraction coupling.

Interestingly, LIT01-196 treatment prevented the decrease in SABP and DABP induced by MI at 4

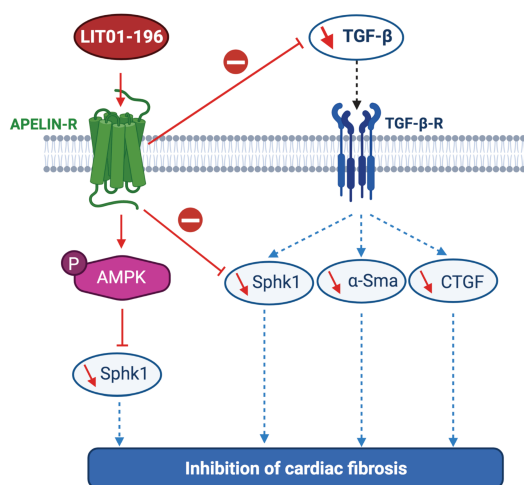
weeks. Indeed, SABP and DABP values after LIT01-196 treatment were similar to the corresponding values measured in Sham. This is in agreement with the effect of LIT01-196 on LVSP, the value of which was not significantly different from that measured in the sham group. This could be related to the vasodilatory effect of LIT01-196,³⁸ improving afterload as previously shown for apelin.³⁹ Hypotension is a well-known adverse effect of ACE inhibitors and careful dose-titration is strongly recommended when initiating ACE inhibitor treatment in patients with acute MI.⁴⁰ Therefore, our data suggest that LIT01-196 could have the advantage of improving cardiac function without lowering BP.

The improvement in cardiac function on LIT01-196 treatment was confirmed by the significant decrease in the mRNA expression of HF biomarkers in the apex, such as Bnp⁴¹ and Anf⁴² or in plasma NT-proBNP levels accompanied by a reduction in Hif1- α mRNA expression, an hypoxia biomarker, suggesting a reduction of cardiomyocytes hypoxia.⁴³

Chronic LIT01-196 treatment also significantly attenuates the increases in LV diameter and volume, decreasing LV dilatation. It also prevented the decrease in the thickness of the LV posterior wall induced by MI and reduces the infarct size. These changes demonstrate a cardioprotective role for LIT01-196 in cardiac remodeling and are in agreement with previous studies^{44,45} showing that chronic apelin-13 treatment in mice post-MI decreases infarct size, improves cell survival and promotes angiogenesis

Adverse cardiac remodeling is also associated with increased interstitial collagen deposition, enhanced fibrosis and fibrosis-related gene expression. The most striking effect of LIT01-196 appears to be its ability to strongly decrease cardiac fibrosis within the whole heart as shown by the reduced Sirius red staining of heart sections in mice post-MI treated with LIT01-196, an effect also observed after intramyocardial injection of a lentivector expressing apelin into a mouse MI model.³⁶ TGF- β plays a key role in the activation of cardiac fibroblasts following MI⁴⁶ and increases Sphk1 expression, known to mediate TGF- β stimulated collagen production.⁴⁷ We found that the mRNA expression of fibrosis biomarkers, Ctgf, collagen I, collagen III, TGF- β , α -SMA and Sphk1 were largely increased in the hearts of MI mice treated with saline but significantly reduced by LIT01-196 treatment. The mRNA levels

of collagen I, collagen III, TGF- β and Sphk1 remained however higher than the corresponding values measured in Sham except for the expression of α -SMA which became similar to that measured in Sham. Knowing that apelin was previously shown to inhibit TGF- β -stimulated activation of cardiac fibroblasts through inhibition of Smad activation, SphK1 up-regulation and collagen production induced by TGF- β but also by a direct inhibition of SphK1 activity through an AMP-activated protein kinase dependent mechanism,²⁷ we propose the following mechanism of action for the LIT01-196-induced fibrosis decrease (*Figure 6*).



LIT01-196 by activating the Apelin-R reduces cardiac fibrosis post-MI by inhibiting cardiac SphK1 and TGF- β mRNA expression, inducing a decrease in α -SMA and Ctgf mRNA levels, the expression of the latter being correlated with the severity of the disease.⁴⁸

Conclusions and perspectives

Our study shows that chronic s.c. LIT01-196 treatment during 4 weeks after MI, at a dose of 9 mg/kg, allowing to reach a LIT01-196 concentration in the blood circulation at minima 125 times above its K_i value for the Apelin-R during 8 h, prevents cardiac dysfunction by improving LVEF, cardiac contractility and intracardiac pressure. LIT01-196 treatment also reduced infarct size, cardiac dilatation and fibrosis and prevented thinning of the LV wall induced by MI, attenuating remodeling of the myocardium and ventricular dysfunction. In contrast to ACE inhibitors, no hypotension was associated with LIT01-196 treatment. It would be therefore interesting to explore the safety and efficacy of agonist-induced Apelin-R activation in patients after acute MI.

Supplementary Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Methods S1. Supplementary methods.

Figure S1. (A) FS (%). (B) LV Mass (mg). (C) LVPWd (mm), (D) LVPWs (mm).

Figure S2. (A) Hif1- α mRNA levels (AU), (B) SERCA 2a mRNA levels (AU).

Figure S3. (Histologic representation of the safety of the neutraligands LIT01-196.

Table S1. Absolute values (mean \pm SEM) of the parameters shown in *Figure 1C and D*.

Table S2. Absolute values (mean \pm SEM) of the different parameters measured by echocardiography after chronic treatment with LIT01-196.

Table S3. Absolute values (mean \pm SEM) of heart failure biomarkers after chronic treatment with LIT01-196, during 31 days in mice post-MI.

Acknowledgements

Special thanks goes to the animal facility of College de France and its staff for their help and guidance. The English text was edited by J. Sappa from Alex Edelman & Associates.

We acknowledge the Orion imaging facility, CIRB, for their support with the spinning-disk imaging and image analysis.

Funding

This work was supported by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM), the *Collège de France* and the *Fédération Française de Cardiologie*.

P.-E.G.-S. was supported by a fellowship from the *Fondation pour la Recherche Médicale*, grant number “PBR201810007643.”

Conflict of interest: none declared.

References

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Ferranti S de, Després J-P, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW, Turner MB. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update. *Circulation* 2015;**131**:e29–e322.
2. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, Hellermann-Homan JP, Killian J, Yawn BP, Jacobsen SJ. Trends in Heart Failure Incidence and Survival in a Community-Based Population. *JAMA* 2004;**292**:344–350.
3. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W. Left ventricular

- remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 1986;**74**:693–702.
4. Tardif J-C, O'Meara E, Komajda M, Böhm M, Borer JS, Ford I, Tavazzi L, Swedberg K, SHIFT Investigators. Effects of selective heart rate reduction with ivabradine on left ventricular remodelling and function: results from the SHIFT echocardiography substudy. *Eur Heart J* 2011;**32**:2507–2515.
 5. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, Fujii M, Taniguchi A, Hamatani T, Nozato Y, Kataoka K, Morigami N, Ohnishi M, Kinoshita M, Horie M. Immediate Administration of Mineralocorticoid Receptor Antagonist Spironolactone Prevents Post-Infarct Left Ventricular Remodeling Associated With Suppression of a Marker of Myocardial Collagen Synthesis in Patients With First Anterior Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2003;**107**:2559–2565.
 6. Ju H, Zhao S, Jassal DS, Dixon IMC. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1997;**35**:223–232.
 7. Calvieri C, Rubattu S, Volpe M. Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides. *J Mol Med Berl Ger* 2012;**90**:5–13.
 8. Zhang Z-Z, Wang W, Jin H-Y, Chen X, Cheng Y-W, Xu Y-L, Song B, Penninger JM, Oudit GY, Zhong J-C. Apelin Is a Negative Regulator of Angiotensin II-Mediated Adverse Myocardial Remodeling and Dysfunction. *Hypertens Dallas Tex* 1979 2017;**70**:1165–1175.
 9. Sato T, Kadowaki A, Suzuki T, Ito H, Watanabe H, Imai Y, Kuba K. Loss of Apelin Augments Angiotensin II-Induced Cardiac Dysfunction and Pathological Remodeling. *Int J Mol Sci* 2019;**20**:239.
 10. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;**251**:471–476.
 11. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993;**136**:355–360.
 12. Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport AP. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept* 2005;**126**:233–240.
 13. Charo DN, Ho M, Fajardo G, Kawana M, Kundu RK, Sheikh AY, Finsterbach TP, Leeper NJ, Ernst KV, Chen MM, Ho YD, Chun HJ, Bernstein D, Ashley EA, Quertermous T. Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;**297**:H1904–1913.
 14. Hus-Citharel A, Bouby N, Frugière A, Bodineau L, Gasc J-M, Llorens-Cortes C. Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int* 2008;**74**:486–494.
 15. Reaux A, Gallatz K, Palkovits M, Llorens-Cortes C. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 2002;**113**:653–662.
 16. De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:10464–10469.
 17. Hus-Citharel A, Bodineau L, Frugière A, Joubert F, Bouby N, Llorens-Cortes C. Apelin counteracts vasopressin-induced water reabsorption via cross talk between apelin and vasopressin receptor signaling pathways in the rat collecting duct. *Endocrinology* 2014;**155**:4483–4493.
 18. Salcedo A, Garijo J, Monge L, Fernández N, Luis García-Villalón A, Sánchez Turrión V, Cuervas-Mons V, Diéguez G. Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids. *Regul Pept* 2007;**144**:50–55.
 19. Japp AG, Cruden NL, Amer DAB, Li VKY, Goudie EB, Johnston NR, Sharma S, Neilson I, Webb DJ, Megson IL, Flapan AD, Newby DE. Vascular Effects of Apelin In Vivo in Man. *J Am Coll Cardiol* 2008;**52**:908–913.
 20. Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkariainen S, Piuholta J, Rysä J, Tóth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002;**91**:434–440.
 21. Gerbier R, Alvear-Perez R, Margathe J-F, Flahault A, Couvineau P, Gao J, De Mota N, Dabire H, Li B, Ceraudo E, Hus-Citharel A, Esteouille L, Bisoo C, Hibert M, Berdeaux A, Iturrioz X, Bonnet D, Llorens-Cortes C. Development of original metabolically stable apelin-17 analogs with diuretic and cardiovascular effects. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2017;**31**:687–700.
 22. Wang W, McKinnie SMK, Patel VB, Haddad G, Wang Z, Zhabeyev P, Das SK, Basu R, McLean B, Kandalam V, Penninger JM, Kassiri Z, Vederas JC, Murray AG, Oudit GY. Loss of Apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic Apelin analogues. *J Am Heart Assoc* 2013;**2**:e000249.
 23. Chen MM, Ashley EA, Deng DXF, Tsalenko A, Deng A, Tabibiazar R, Ben-Dor A, Fenster B, Yang E, King JY, Fowler M, Robbins R, Johnson FL, Bruhn L, McDonagh T, Dargie H, Yakhini Z, Tsao PS, Quertermous T. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* 2003;**108**:1432–1439.
 24. Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006;**8**:355–360.
 25. Földes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mäyränpää M, Sárman B, Seres L, Skoumal R, Lakó-Futó Z, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**308**:480–485.
 26. Barnes GD, Alam S, Carter G, Pedersen CM, Lee KM, Hubbard TJ, Veitch S, Jeong H, White A, Cruden NL, Huson L, Japp AG, Newby DE. Sustained cardiovascular actions of APJ agonism during renin-angiotensin system activation and in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 2013;**6**:482–491.
 27. Pchejetski D, Foussal C, Alfarano C, Lairez O, Calise D, Guilbeau-Frugier C, Schaak S, Seguelas M-H, Wanecq E, Valet P, Parini A, Kunduzova O. Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur Heart J* 2012;**33**:2360–2369.
 28. Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, Parini A, Kunduzova O. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 2010;**584**:2363–2370.
 29. Flahault A, Girault-Sotias P-E, Keck M, Alvear-Perez R, De Mota N, Estéouille L, Ramanoudjame SM, Iturrioz X, Bonnet D, Llorens-Cortes C. A metabolically stable apelin-17 analog decreases AVP-induced antidiuresis and improves hyponatremia. *Nat Commun* 2021;**12**:305.
 30. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortès C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 2001;**77**:1085–1096.
 31. Azizi M, Iturrioz X, Blanchard A, Peyrard S, De Mota N, Chartrel N, Vaudry H, Corvol P, Llorens-Cortes C. Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J Am Soc Nephrol JASN* 2008;**19**:1015–1024.
 32. Flahault A, Girault-Sotias P-E, Keck M, Alvear-Perez R, De Mota N, Estéouille L, Ramanoudjame SM, Iturrioz X, Bonnet D, Llorens-Cortes C. A metabolically stable apelin-17 analog decreases AVP-induced antidiuresis and improves hyponatremia. *Nat Commun* 2021;**12**:305.
 33. Ason B, Chen Y, Guo Q, Hoagland KM, Chui RW, Fielden M, Sutherland W, Chen R, Zhang Y, Mihardja S, Ma X, Li X, Sun Y, Liu D, Nguyen K, Wang J, Li N, Rajamani S, Qu Y, Gao B, Boden A, Chintalgattu V, Turk JR, Chan J, Hu LA, Dransfield P, Houze J, Wong J, Ma J, Pattaropong V, Véniant MM, Vargas HM, Swaminath G, Khakoo AY. Cardiovascular response to small-molecule APJ activation. *JCI Insight* 2020;**5**:132898.
 34. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*

- 2002;**415**:198–205.
35. Neef S, Maier LS. Novel aspects of excitation–contraction coupling in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2013;**108**:360.
 36. Renaud-Gabardos E, Tatin F, Hantelys F, Lebas B, Calise D, Kunduzova O, Masri B, Pujol F, Sicard P, Valet P, Roncalli J, Chaufour X, Garmy-Susini B, Parini A, Prats A-C. Therapeutic Benefit and Gene Network Regulation by Combined Gene Transfer of Apelin, FGF2, and SERCA2a into Ischemic Heart. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2018;**26**:902–916.
 37. Røe ÅT, Ruud M, Espe EK, Manfra O, Longobardi S, Aronsen JM, Nordén ES, Husebye T, Kolstad TRS, Cataliotti A, Christensen G, Sejersted OM, Niederer SA, Andersen GØ, Sjaastad I, Louch WE. Regional diastolic dysfunction in post-infarction heart failure: role of local mechanical load and SERCA expression. *Cardiovasc Res* 2019;**115**:752–764.
 38. Gerbier R, Alvear-Perez R, Margathe J-F, Flahault A, Couvineau P, Gao J, De Mota N, Dabire H, Li B, Ceraudo E, Hus-Citharel A, Esteouille L, Bisoo C, Hibert M, Berdeaux A, Iturriz X, Bonnet D, Llorens-Cortes C. Development of original metabolically stable apelin-17 analogs with diuretic and cardiovascular effects. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2017;**31**:687–700.
 39. Ashley EA, Powers J, Chen M, Kundu R, Finsterbach T, Caffarelli A, Deng A, Eichhorn J, Mahajan R, Agrawal R, Greve J, Robbins R, Patterson AJ, Bernstein D, Quertermous T. The endogenous peptide apelin potentially improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 2005;**65**:73–82.
 40. Pfeffer MA, Greaves SC, Arnold JM, Glynn RJ, LaMotte FS, Lee RT, Menapace FJ, Rapaport E, Ridker PM, Rouleau JL, Solomon SD, Hennekens CH. Early versus delayed angiotensin-converting enzyme inhibition therapy in acute myocardial infarction. The healing and early afterload reducing therapy trial. *Circulation* 1997;**95**:2643–2651.
 41. Doust JA, Lehman R, Glasziou P. The Role of BNP Testing in Heart Failure. *Am Fam Physician* 2006;**74**:1893–1898.
 42. Brandt RR, Wright RS, Redfield MM, Burnett JC. Atrial natriuretic peptide in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1993;**22**:A86–A92.
 43. Ikeda M, Ide T, Tadokoro T, Miyamoto HD, Ikeda S, Okabe K, Ishikita A, Sato M, Abe K, Furusawa S, Ishimaru K, Matsushima S, Tsutsui H. Excessive Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression Induces Cardiac Rupture via p53-Dependent Apoptosis After Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis* 2021;**10**:e020895.
 44. Li L, Zeng H, Chen J-X. Apelin-13 increases myocardial progenitor cells and improves repair postmyocardial infarction. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 2012;**303**:H605–H618.
 45. Rastaldo R, Cappello S, Folino A, Berta GN, Sprio AE, Losano G, Samaja M, Pagliaro P. Apelin-13 limits infarct size and improves cardiac postischemic mechanical recovery only if given after ischemia. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 2011;**300**:H2308–H2315.
 46. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 2009;**123**:255–278.
 47. Gellings Lowe N, Swaney JS, Moreno KM, Sabbadini RA. Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for transforming growth factor- β -stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2009;**82**:303–312.
 48. Koitabashi N, Arai M, Niwano K, Watanabe A, Endoh M, Suguta M, Yokoyama T, Tada H, Toyama T, Adachi H, Naito S, Oshima S, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M. Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008;**10**:373–379.
 49. Boitard SE, Marc Y, Keck M, Mougnot N, Agbulut O, Balavoine F, Llorens-Cortes C. Brain renin-angiotensin system blockade with orally active aminopeptidase A inhibitor prevents cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2019;**127**:215–222.

Supplementary Information

Supplemental Methods

Myocardial infarction (MI) model.

Male adult Swiss mice were anesthetized with a mixture of 100 mg/kg ketamine (Imalgene 1000) and 10 mg/kg xylazine (Rompun 2%) via intraperitoneal injection, intubated and ventilated at a rate of 200 insufflations/min, with a mean insufflate volume of 0.3 ml (Bioseb, France). The skin was shaved, disinfected with 10% povidone (Betadine, Mylan Medical, France). Local analgesia was achieved by a 4 mg/kg s.c. injection of lidocaine (Lidor) at the incision site, and the heart was exposed by left thoracotomy between the third and fourth ribs. The LAD coronary artery was permanently ligated between the pulmonary artery trunk and the left atrial appendage with 8/0 PVSF suture. Pain before, during, and after surgery was prevented by s.c. injection of 1 mg/kg meloxicam (Metacam). After surgery, pain due to ischemia was prevented by a subcutaneous injection of 0.04 mg/kg buprenorphine (Buprecaire). Mortality due to surgical procedures was approximately 20% in all groups. The same surgical procedure was performed without LAD coronary artery ligation in sham-operated mice.

Echocardiographic measurements

Measurements were obtained in anesthetized mice and performed 3 h after s.c. injection of LIT01-196 (9

mg/kg) or NaCl (0.9%) according to the assigned groups. Anesthesia was induced by 4% isoflurane and maintained at 1.0–1.5% during echocardiography images acquisition. The Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF), cardiac diameters [LV end-systolic diameter (LVESD) and LV end-diastolic diameter (LVEDD)] and volumes [LV end-systolic volume (LVESV) and LV end-diastolic volume (LVEDV)], and heart rate (HR) were determined as previously described.⁴⁹ All parameters were measured at least 3 times, and the means are presented, as detailed in *table S1*.

Hemodynamic studies.

Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The right carotid artery was accessed via a mid-cervical incision and lightly dissected to isolate the carotid from the nerve. After distal ligation and proximal clamping, the artery was cut, opened, and the Millar pressure catheter was inserted. The Millar catheter was slipped into the left ventricle after passing the aortic sigmoid valve. Millar Pressure signals were recorded and analyzed with Labchart software version 8.1.17 (AD Instruments, Oxfordshire, United Kingdom) as detailed in *table S2*. The hemodynamic parameters are measured several minutes after the signal stabilization.

Histological quantification of fibrosis.

After euthanasia of the animals, the hearts were immediately harvested and fixed in Tissue Freezing Medium (Leica, Mount Waverley, Australia) and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane to be cut into 10 µm-thick cryosections on a cryostat (CryoStar NX70, Thermo Scientific, Waltham, USA). Cardiac cryosections were stained with a picosirius red solution (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Cardiac sections were visualized using an Axioscan 7 vertical slide scanner (Zeiss, Marly-le-Roi, France). The entire cardiac section was analyzed with a macro in Fiji to determine infarct size, and cardiac fibrosis in total area was blindly scored in 3 random sections per sample.

Real-time quantification of gene expression.

Total RNA was extracted from the apex using TRIzol reagent (Sigma T9424). A total of 250 ng of RNA was used for reverse transcription with the High Capacity Kit (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France). The cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France) and random primers, according to the manufacturer. The qPCR reactions were performed with a Light Cycler® 480 system (Roche Diagnostics) and SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France), we performed the reaction in duplicate for each sample. The average expression values of one gene HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase), was used as reference. The cDNA from the sham group core was used as a calibrator for all experiments. Data were collected and analyzed with LightCycler® 480 version 1.5.0 software (Roche Diagnostics). The sequences of the primers used (5' to 3') were:

Gene	Forward	Reverse
Anf	ATCTGCCCTTTGAAAAGCA	GCTCCAATCCTGTCAATCCT
Bnp	CAGCTCTTGAAGGACCAAGG	AGACCCAGGCAGAGTCAGAA
Col III	AAAGAGGATCTGAGGGCTCG	TCACCTCCAATCCAGCAAT
Col I	ATTCCCGTTCGAGTACGGAA	CTCGATCTCGTTGGATCCCT
Ctgf	ACTCTGCCAGTGGAGTTCAA	TTACGCCAATGTCTCCGTACA
Hif-1α	ACAACCTGCCACCACTGATGA	GCCTTAGCAGTGGTCTGTTTC
Tgf-β	GTCACCTGGAGTTGTACGGCA	GGGCTGATCCCGTTGATTTTC
Serca	CACACCGCTGAATCTGAC	GGAAGCGGTTACTCCAGT
Sphk1	CTCTCATCTCGACTTCGTCC	GGGCGGCCAGATTTTTAGC
α-SMA	GAGAAGCCAGCCAGTCG	CTCTTGCTCTGGGCTTCA

Apelin radioimmunoassay in plasma samples.

Preparation of plasma samples. Male SWISS mice (25-30g, 4-6 weeks) were injected with 2700 nmol/kg of

LIT01-196 or saline subcutaneously (3-7 animals per point). Trunk blood (~ 1 ml) was collected, at different time points (0.5, 1.5, 4, 6, 8, 12 h), in chilled tubes containing 0.05 ml of 0.3 M EDTA (pH 7.4) on ice and centrifuged at 1,800 g at 4°C for 15 min. Plasma (0.5 ml) was mixed with 0.05% BSA and acidified with 0.175 ml of 3 M HCl and stored at -80°C until use for apelin RIA.

Apelin radioimmunoassay. After thawing on ice, the samples were centrifuged at 20,000 x g at 4°C for 10 min. Apelin was extracted from plasma by mixing the supernatant with 0.3 ml of 0.1% BSA in H₂O and 1 ml of 1% trifluoroacetic acid (TFA) - 0.1% BSA, and running the mixture on a Sep-Pak C18 cartridge (Waters) previously washed with 2 ml 100% acetonitrile and equilibrated with 5 ml 1% TFA - 0.1% BSA. The columns then were washed with 3 ml 1% TFA - 0.1% BSA and apelin was eluted with 1.5 ml 100% acetonitrile. The samples were dried and dissolved in 0.6 ml of RIA buffer (19 mM NaH₂PO₄ • H₂O, 81 mM Na₂HPO₄ • 2H₂O, 50 mM NaCl, 0.1% TritonX-100, 0.01% NaN₃, 0.1% BSA).

Plasma apelin levels were determined by RIA. Samples (0.1ml) were mixed with 125I labeled pE13F (iodinated on Lys8 by the Bolton and Hunter method, 2200 Ci/mmol, Perkin- Elmer, Waltham, MA; 0.05 ml, 19000 dpm) and polyclonal K17F antiserum (0.05 ml, final dilution: 1/4500) to give a total volume of 0.2 ml and were incubated at 4°C overnight.

We then added 0.1 ml of GARGG and NRS (Goat anti-rabbit IgG Antiserum and Normal Rabbit Serum, Peninsula, BMA Biomedicals). After 2 h of incubation at room temperature, we added 0,5ml of RIA buffer and centrifuged the tubes at 2,600 x g at 4°C for 20 min. The supernatant was removed and the radioactivity of the precipitates was measured.

The detection limit was 6 fmol/ml, and the quantification limit was 12 fmol/ml. The within- and between-assay coefficients of variation were 3 and 5%, respectively.³¹ The recovery (mean ± SEM) was 91 ± 3% and the values for apelin levels were corrected for recovery.

Supplemental Figures

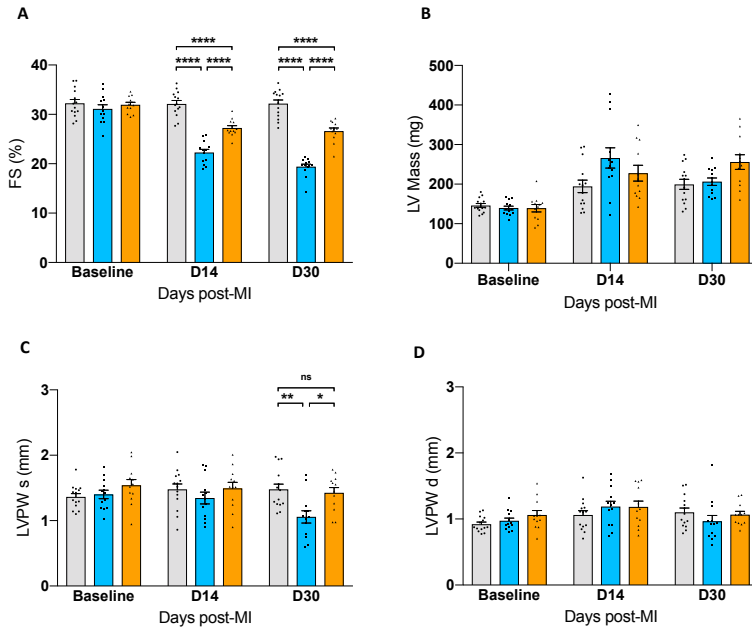


Figure S1. Effects of chronic treatment with LIT01-196 on fractional shortening, left ventricular mass and left ventricular posterior wall thickness. (A) FS (%). (B) LV Mass (mg). (C) LVPWd (mm), (D) LVPWs (mm).

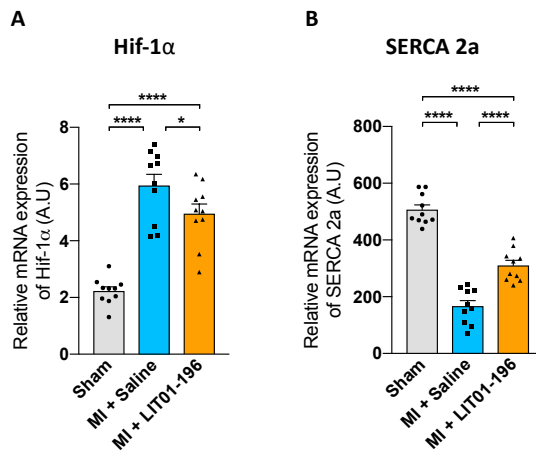


Figure S2. Effects of chronic treatment with LIT01-196 on the expression of fibrosis and hypoxia biomarkers. (A) Hif1- α mRNA levels (AU), (B) SERCA 2a mRNA levels (AU).

Supplemental Tables

Table S1. Absolute values (mean \pm SEM) of the parameters shown in *Figure 1C and D*

Dose	Time (h)	Saline (n=6)		LIT01-196	
			300 nmol/kg (n=6)	900 nmol/kg (n=6)	2700 nmol/kg (n=6)
Figure 1C - LVEF (%)	0	62.2 \pm 2.4	57.8 \pm 1.8 ^{NS}	58.4 \pm 1.1 ^{NS}	59.3 \pm 0.7
	1	57.6 \pm 2.1	59.0 \pm 1.5 ^{NS}	56.0 \pm 2.5 ^{NS}	60.9 \pm 2.3
	2	59.3 \pm 1.1	59.0 \pm 1.6*	55.0 \pm 2.3*	66.3 \pm 1.0 ^{##}
	3	56.1 \pm 1.9	59.1 \pm 1.8*	59.2 \pm 3.3 ^{NS}	67.8 \pm 1.4 ^{##}
	4	59.7 \pm 2.1	57.0 \pm 1.9 ^{NS}	60.7 \pm 2.6 ^{NS}	64.1 \pm 1.8
	5	58.1 \pm 2.8	56.1 \pm 2.2 ^{NS}	59.5 \pm 1.4 ^{NS}	63.6 \pm 2.6
	6	59.9 \pm 1.0	57.3 \pm 2.7 ^{NS}	59.7 \pm 1.2 ^{NS}	57.8 \pm 2.3
	24	57.1 \pm 2.3	56.2 \pm 1.5 ^{NS}	56.1 \pm 0.7 ^{NS}	58.3 \pm 2.9
Figure 1D - Heart rate (bpm)	0	477 \pm 15	466 \pm 14	510 \pm 29	470 \pm 16
	1	487 \pm 26	533 \pm 26	407 \pm 57	469 \pm 28
	2	503 \pm 30	534 \pm 14	458 \pm 57	515 \pm 18
	3	481 \pm 26	556 \pm 17	499 \pm 31	532 \pm 18
	4	469 \pm 24	527 \pm 18	522 \pm 24	515 \pm 26
	5	478 \pm 20	538 \pm 17	497 \pm 34	510 \pm 28
	6	490 \pm 25	541 \pm 24	524 \pm 31	513 \pm 20
	24	539 \pm 26	605 \pm 65	513 \pm 30	464 \pm 8

^{##} $P < 0.01$ vs mice injected with saline

* $P < 0.05$ vs mice injected with LIT01-196 at the dose of 2700 nmol/kg
NS, not significant vs LIT01-196 at the dose of 2700 nmol/kg

Table S2: Absolute values (mean \pm SEM) of the different parameters measured by echocardiography after chronic treatment with LIT01-196

	weeks Post-MI	Sham n=14	MI + saline n=13	MI + LIT01-196 n=12
Fig. S1A – FS (%)	2	32.1 \pm 0.7	22.3 \pm 0.6 ^{####}	27.2 \pm 0.5 ^{****,####}
	4	32.2 \pm 0.8	19.4 \pm 0.5 ^{####}	26.6 \pm 0.6 ^{****,####}
Fig. S1C – LVPW systole (mm)	2	1.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1 ^{ns}	1.5 \pm 0.1 ^{NS, ns}
	4	1.5 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1 ^{##}	1.4 \pm 0.1 ^{*, ns}
Fig. S1D – LVPW diastole (mm)	2	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1 ^{ns}	1.2 \pm 0.1 ^{NS, ns}
	4	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1 ^{ns}	1.1 \pm 0.1 ^{NS, ns}

^{##} $P < 0.01$ vs sham operated mice

^{####} $P < 0.0001$ vs sham operated mice

ns, not significant vs sham operated mice

^{****} $P < 0.0001$ vs MI + vehicle group

NS, not significant vs MI + vehicle group

X.2 Discussion

Dans un premier temps sachant que la demi-vie *in vivo* de K17F après administration par voie *i.v.* est de 50 sec (Article 1), j'ai évalué la demi-vie du LIT01-196 dans la circulation sanguine chez la souris contrôle. Pour cela j'ai mesuré par dosage radioimmunologique les taux plasmatiques de LIT01-196 à différents temps après l'administration par voie *s.c.* du composé à la dose de 9 mg/kg. Le LIT01-196 présente une demi-vie *in vivo* de 2h 40 min et une concentration plasmatique maximale de 164 nM, correspondant à une concentration 2050 fois supérieure à son affinité (K_i : 0,08 nM) pour l'Apéline-R de rat et qui reste 125 fois supérieure à la valeur du K_i , 8 h après administration. Cette augmentation de la demi-vie du LIT01-196 est, comme nous l'avons montré dans l'Article 1, lié au fait que le LIT01-196 se lie aux protéines plasmatiques, conduisant à sa protection contre la dégradation enzymatique et à la réduction de sa clairance rénale.

Afin d'étudier les effets d'une administration aiguë du LIT01-196 chez la souris contrôle sur la contractilité cardiaque, le LIT01-196 a été administré à différentes doses (1, 3 et 9 mg/kg) et la FEVG a été mesurée toutes les heures. Les doses de 1 et 3 mg/kg administrées par voie *s.c.* n'ont induit aucune augmentation significative de la FEVG. A l'inverse, la dose de 9 mg/kg a augmenté significativement la FEVG dès 2 h après l'injection, avec une augmentation maximale de plus de 10% à 3 h, sans modification de la FC. Ces résultats démontrent que le LIT01-196 a un effet inotrope positif après une injection unique chez la souris par voie *s.c.*, indépendamment de la FC en accord avec l'effet inotrope positif de l'apéline *in vivo* qui a été observée dans de nombreuses études lors d'une perfusion du peptide par voie *i.v.* La cinétique de l'effet inotrope du LIT01-196 est en accord avec la demi-vie du composé qui est de 2 h 40 min dans la circulation sanguine, à la même dose et par la même voie d'injection. La dose de 9 mg/kg a été sélectionnée pour réaliser la suite des expériences sur les effets d'un traitement chronique par le LIT01-196 chez la souris après IM.

De plus, dans l'IC, une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique est observée, qui en augmentant la FC, permet de compenser la perte de contractilité. Cette augmentation de FC va permettre au cœur de répondre aux besoins de l'organisme dans les premières phases d'IC, mais va devenir à long terme délétère obligeant le cœur à augmenter l'effort cardiaque et donc à l'aggravation des symptômes de l'IC. C'est l'une des raisons pour laquelle les bêtabloquants sont préconisés en première intention chez les patients insuffisants cardiaques après IM afin de réduire l'augmentation de la FC. Le LIT01-196 présente donc l'avantage d'un effet inotrope positif sans effet chronotrope positif.

Afin d'évaluer les effets thérapeutiques potentiels du LIT01-196 dans l'IC, nous avons utilisé un modèle d'IC chez la souris à la suite d'un IM qui a été induit par la ligature permanente de l'artère coronaire gauche descendante. Après l'IM, le cœur dans un premier temps va s'hypertrophier (phase pouvant être très courte si l'IM est sévère) puis l'IC va s'installer et le cœur va se dilater progressivement. On observe une baisse de la FE (de 60% à environ 40%), une augmentation des volumes et des diamètres en fin de diastole et systole. La fonction cardiaque peut se maintenir quelques temps jusqu'à l'épuisement des mécanismes adaptatifs et la décompensation cardiaque terminale.

Quarante-huit heures après l'IM, les souris reçoivent, soit du sérum physiologique, soit du LIT01-196 à la dose de 9 mg/kg, par voie *s.c.* pendant 31 jours. J'ai montré dans cette étude, que les animaux post-IM recevant du LIT01-196 de manière répétée, présentaient une amélioration significative de leur fonction cardiaque. En effet, leur FEVG était moins altérée à 14 jours (52,8 % vs 44,5%) et à 30 jours (51,6 vs 39,5%) post-IM que chez les souris recevant du sérum physiologique et restait maintenue durant les 4 semaines de traitement alors que celle FEVG des souris IM recevant du sérum physiologique se détériorait au cours du temps. De plus, le traitement chronique par le LIT01-196 diminue également de manière significative l'augmentation du diamètre et du volume télésystoliques du VG, diminuant la dilatation du VG.

L'administration chronique de LIT01-196 a aussi améliorée la contractilité cardiaque comme le montre l'amélioration de la dp/dt max et dp/dt min par rapport au groupe de souris post-IM recevant du sérum physiologique. Cette amélioration pourrait être liée à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de SERCA2 que nous avons observé chez les souris recevant du LIT01-196. En effet, SERCA2 est l'isoforme 2 de la pompe calcique de type SERCA (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) qui permet le transport du Ca^{2+} , du cytosol du cardiomyocyte vers le réticulum sarcoplasmique. Elle est impliquée dans le couplage excitation-contraction, la diminution de son expression dans l'IC mène à une perte de contractilité cardiaque alors que sa surexpression améliore la contractilité.

Il est intéressant de noter que la réduction des PA systolique et diastolique 4 semaines après IM, chez les souris traitées par le sérum physiologique, a été prévenue par le traitement par le LIT01-196. En effet, les valeurs de PA observées chez les souris IM traitées par le LIT01-196 étaient similaires à celles mesurées chez les souris Sham. Ceci est en accord avec la normalisation de la LVPSP par le LIT01-196 au niveau des valeurs observées chez le groupe Sham. Ceci pourrait être lié à l'effet vasodilatateur du LIT01-196, améliorant la postcharge comme précédemment montré pour l'apéline.

L'hypotension est un effet indésirable bien connu des IEC et il est fortement recommandé d'ajuster soigneusement la dose lors de l'initiation d'un traitement chez des patients ayant subi un IC. Par conséquent, nos données suggèrent que le LIT01-196 pourrait avoir l'avantage d'améliorer la fonction cardiaque sans abaisser la PA. Nous avons aussi observé une diminution de la pression ventriculaire gauche télédiastolique qui pourrait refléter une diminution du volume extracellulaire, améliorant la précharge, en accord avec l'effet aquarétique du LIT01-196 qui inhibe dans le canal collecteur l'action antidiurétique de l'AVP.

L'amélioration de la fonction cardiaque par le LIT01-196 a été confirmée par la diminution significative de l'expression de l'ARNm des biomarqueurs de l'IC, tels que le Bnp (Brain natriuretic peptide) et l'Anf (Atrial natriuretic factor) mesuré dans l'apex cardiaque ou des taux plasmatiques de NT-proBNP. Nous avons aussi observé une réduction de l'expression de Hif1- α dans l'apex cardiaque qui est un biomarqueur de l'hypoxie des cardiomyocytes.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ason *et coll.* qui ont montré, chez le rat insuffisant cardiaque après IM, que le traitement par leur composé AM-8123, un agoniste non peptidique de l'Apéline-R, améliore la fonction diastolique (Ason et al., 2020).

Des analyses histologiques sur les cœurs des souris m'ont également permis d'observer chez les souris traitées après IM par le LIT01-196 une réduction significative de la taille de l'infarctus, à mettre en parallèle avec la diminution de la dilatation du VG et à la préservation de l'épaisseur de la paroi du VG. L'ensemble de ces données suggèrent que le LIT01-196 aurait un effet cardioprotecteur, en réduisant le développement d'un remodelage cardiaque délétère et l'installation d'une cardiomyopathie dilatée, qui est observable chez les souris post-IM recevant du sérum physiologique. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures montrant que le traitement chronique par l'apéline-13 chez la souris après IM diminue la taille de l'infarctus, améliore la survie cellulaire et favorise l'angiogenèse (Rastaldo et al., 2011; Li et al., 2012a).

L'amélioration de la fonction cardiaque induite par le LIT01-196 peut aussi impliquer une diminution de la fibrose cardiaque. En effet, l'effet le plus frappant du LIT01-196 semble être sa capacité à diminuer fortement la fibrose cardiaque dans le cœur comme le montre la réduction de la coloration au rouge Sirius sur des coupes de cœur de souris traitées après IM avec le LIT01-196. Le TGF- β joue un rôle clé dans l'activation des fibroblastes cardiaques après IM et augmente l'expression de Sphk1, connue pour médier la production de collagène stimulée par le TGF- β (Pchejetski et al., 2012). Nous avons trouvé que l'expression des ARNms des biomarqueurs de la fibrose, CTGF, collagène I, collagène III, TGF- β , α -SMA et Sphk1 était largement augmentée

dans les cœurs des souris traitées après IM par une solution saline mais significativement diminuée après traitement par le LIT01-196.

Les niveaux d'ARNm du TGF- β , de Sphk1, du collagène I et du collagène III sont restés cependant plus élevés que les valeurs correspondantes mesurées chez les souris Sham, sauf pour l'expression d' α -SMA qui est devenue similaire à celle mesurée chez les souris Sham. Sachant que l'apéline inhibe l'activation des fibroblastes cardiaques induite par le TGF- β (Pchejetski et al., 2012), nous avons montré que le traitement par le LIT01-196 inhibe l'expression du TGF- β ainsi que l'augmentation de l'expression de SphK1, d' α -SMA et de CTGF induite par le TGF- β mais aussi réduit directement l'activité de SphK1, réduisant la production de collagène. Considérant l'ensemble de ces données, nous proposons le mécanisme d'action suivant pour la diminution de la fibrose induite par le LIT01-196 (Figure 19). Le LIT01-196 en activant l'Apéline-R réduit la fibrose cardiaque post-IM en inhibant directement l'activité de SphK1 et l'expression du TGF- β et de SphK1 dans le coeur, provoquant une diminution des taux d'ARNm d' α -Sma et de CTGF, dont l'expression est corrélée avec la sévérité de la maladie.

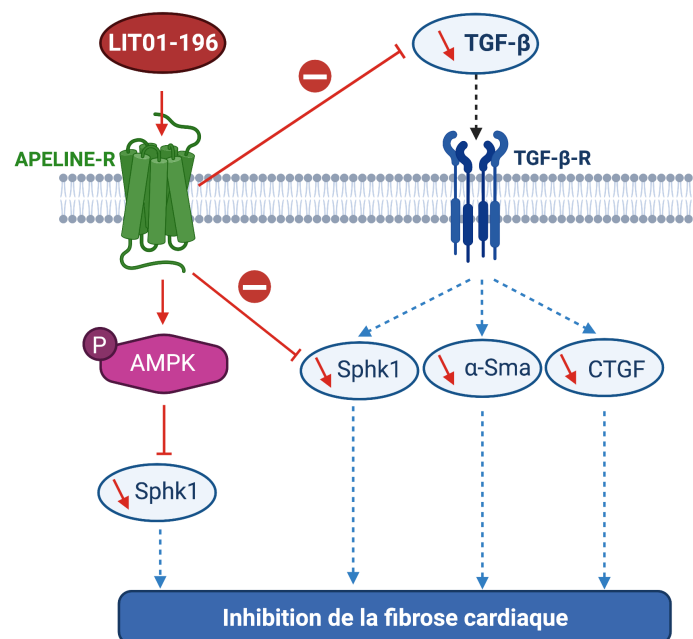


Figure 19 : Voies de signalisation impliquées dans l'effet inhibiteur du LIT01-196 sur la fibrose cardiaque

Nous démontrons dans cette étude que l'administration chronique par voie *s.c.* d'un analogue de K17F métaboliquement stable, le LIT01-196, pendant 4 semaines chez des souris après IM améliore la fonction cardiaque et réduit le remodelage cardiaque sans diminuer la PA et en réduisant la taille de l'infarctus et la fibrose, tout en prévenant l'amincissement de la paroi du VG. Ces résultats suggèrent un effet cardioprotecteur majeur de l'apéline dans la fonction et le

remodelage cardiaques après IM. Ces données suggèrent que l'utilisation d'agonistes de l'Apéline-R pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique pour prévenir le développement de l'IC après IM.

DISCUSSION GENERALE

L'apéline est un peptide vasoactif présent dans le cerveau et au niveau systémique qui joue un rôle important dans le contrôle de l'équilibre hydrique et des fonctions cardiovasculaires. Cependant, sa demi-vie est très courte, *ex vivo* dans le plasma (4,6 minutes pour K17F) et *in vivo* dans la circulation sanguine (50 secondes pour K17F), ce qui limite son utilisation à des fins thérapeutiques. Pour faire face à cette difficulté, nous avons développé en collaboration avec l'équipe du Dr D. Bonnet, un analogue métaboliquement stable de K17F, le LIT01-196, obtenu grâce à l'addition originale d'une chaîne fluorocarbonée à l'extrémité N-terminale de K17F. L'addition de cette chaîne ne modifie pas l'affinité du composé pour l'Apéline-R, ni sa capacité à inhiber la production d'AMPc induite par la forskoline, ni sa faculté à recruter la β -arrestine de l'Apéline-R et à induire l'internalisation ou à phosphoryler ERK comparé à K17F (Gerbier et al., 2017).

Le LIT01-196 est un agoniste complet de l'Apéline-R. L'addition de cette chaîne fluorocarbonée a grandement augmenté la demi-vie du LIT01-196 *ex vivo* (supérieure à 24 h) et *in vivo* (27 minutes après une administration i.v. et 156 minutes après une administration *s.c.* chez la souris). Le LIT01-196 se lie aux protéines plasmatiques ce qui pourrait conduire à sa protection contre la dégradation enzymatique et à la réduction de sa clairance rénale et à l'augmentation de sa demi-vie dans la circulation sanguine comparé à K17F qui ne se lie pas aux protéines sériques. Ainsi, l'obtention de cet analogue de K17F métaboliquement stable administrable par voie *s.c.*, nous a permis d'étudier ses effets *in vivo* chez le rongeur dans des situations physiologiques et pathologiques. Dans ce travail de thèse, nous avons évalué les effets de ce composé dans deux modèles expérimentaux de pathologies. Le premier travail portait sur un modèle d'hyponatrémie et le second sur un modèle d'insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde.

Avant de commencer l'étude sur le modèle expérimental d'hyponatrémie, nous avons vérifié la sélectivité du LIT01-196 vis-à-vis de l'Apéline-R, nous avons montré qu'il n'agissait pas comme un antagoniste sur le V2-R en montrant que le LIT01-196 ne diminuait pas la production d'AMPc induite par l'AVP dans des cellules HEK293T sur-exprimant uniquement le V2-R. Nous avons ensuite montré, dans les cellules mpkCCD, une lignée cellulaire immortalisée issue des cellules principales du canal collecteur de souris mais aussi dans une préparation plus physiologique, dans des segments de néphron micro-disséqués de la médullaire externe du canal collecteur de rat, que le LIT01-196 comme K17F inhibait la production d'AMPc induite par la dDAVP, un agoniste sélectif du V2-R. Nous avons ensuite observé dans les cellules mpkCCD, que le LIT01-196 inhibait la translocation de l'AQP-2 phosphorylée induite par la dDAVP à la membrane

apicale de ces cellules. Ceci suggérerait que le LIT01-196 pourrait bloquer l'effet antidiurétique de l'AVP en diminuant la réabsorption d'eau dans le canal collecteur *via* l'inhibition de la production d'AMPC induite par l'AVP et la diminution de l'insertion des canaux perméables à l'eau à la membrane apicale. Pour démontrer cette hypothèse, nous avons administré le LIT01-196 par voie *s.c* chez le rat contrôle vigile parallèlement au tolvaptan, un antagoniste du V2-R utilisé comme témoin positif. Nous avons observé que le LIT01-196 et le tolvaptan, administrés par voie *s.c.* à une dose équimolaire, entraînaient une diurèse aqueuse de même amplitude.

L'ensemble de ces données obtenues *ex vivo* et *in vivo* suggèrent que LIT01-196, en agissant sur l'Apéline-R présent dans le canal collecteur, inhibe la production d'AMPC induite par l'AVP, inhibant ainsi l'insertion des AQP-2 à la membrane apicale du canal collecteur, entraînant l'inhibition de la réabsorption d'eau par le rein et augmentant la diurèse aqueuse.

Par contre, l'augmentation de la prise de boisson était plus importante après le traitement par le tolvaptan qu'après celui du LIT01-196.

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, bien que le LIT01-196 ne pénètre pas dans le cerveau après administration par voie *s.c.*, il peut activer ses récepteurs présents dans le SFO, structure cérébrale, contenant des capillaires fenestrés et jouant un rôle clé dans le comportement dipsique. Le LIT01-196, en stimulant ces récepteurs pourrait exercer un effet inhibiteur sur la prise d'eau similaire à celui que nous avons observé avec l'apéline injectée par voie *i.c.v.* chez le rat déshydraté pendant 24 heures (Reaux et al., 2001). Cette hypothèse reste à explorer. Cet effet du LIT01-196 sur le comportement dipsique serait intéressant puisque l'utilisation chronique du tolvaptan est associée à un syndrome polyuro-polydipsique majeur, très handicapant, qui entraîne l'arrêt du traitement(Boertien et al., 2015).

Dans la mesure où les taux plasmatiques d'apéline et d'AVP sont régulés de façon opposée en réponse à une stimulation osmotique, mais que l'augmentation des taux plasmatiques d'apéline est insuffisante pour compenser l'excès d'AVP chez les patients atteints du syndrome d'antidiurèse inapproprié (SIAD), nous avons cherché à déterminer si un traitement par le LIT01-196, en rétablissant la balance (apéline + LIT01-196)/AVP, pourrait compenser par son effet aquarétique, l'effet antidiurétique accrue de l'AVP et permettrait de corriger l'hyponatrémie induite par l'AVP dans le SIAD.

Nous avons pour cela mis au point un modèle expérimental d'hyponatrémie induite par la perfusion continue d'AVP (30 ng/kg) administrée par voie *s.c.* à l'aide d'une pompe osmotique, chez des rats recevant également une alimentation semi-liquide. Cette perfusion a été effectuée pendant 4 jours et a permis d'obtenir une hyponatrémie stable à ~100 mmol/l, pendant 2 à 4 jours

après le début de la perfusion. L'administration du LIT01-196 pendant 2 jours, par voie *s.c.*, inhibe efficacement l'effet antidiurétique de l'AVP et l'augmentation de l'osmolalité urinaire induite par l'AVP et corrige progressivement l'hyponatrémie.

Comme décrit dans les études précédentes (Miyazaki et al., 2005), le tolvaptan a également inhibé l'effet antidiurétique de l'AVP. Cependant, bien que le tolvaptan et le LIT01-196 à la même dose de 900 nmol/kg aient entraîné des effets aquarétiques similaires chez les rats hyponatrémiques, l'augmentation de la dose de tolvaptan a entraîné une augmentation accrue de la diurèse, effet qui n'est pas observé lorsque l'on augmente la dose de LIT01-196. Ceci pourrait s'expliquer par le mécanisme d'action du LIT01-196. En effet, le tolvaptan va bloquer la liaison de l'AVP sur le V2-R, alors que le LIT01-196 va agir indirectement en inhibant la production d'AMPC induite par l'AVP. Cette inhibition n'étant pas totale, elle va notamment dépendre du niveau d'expression de l'Apéline-R par rapport au V2-R. Cela pourrait expliquer l'augmentation modérée de la diurèse aqueuse par le LIT01-196 et la correction progressive de l'hyponatrémie. La correction plus progressive observée avec le LIT01-196 peut être souhaitable. En effet, une correction trop rapide de l'hyponatrémie peut entraîner des complications neurologiques sévères et irréversibles comme la démyélinisation osmotique.

En conclusion notre étude montre que l'activation de l'Apéline-R par un agoniste de ce récepteur pourrait constituer une nouvelle approche pharmacologique pour le traitement de l'hyponatrémie.

L'insuffisance cardiaque (IC) après infarctus du myocarde (IM) est associée à une mortalité élevée, malgré l'arsenal thérapeutique disponible à ce jour, elle demeure un problème majeur de santé publique. Découvrir de nouveaux traitements reste un enjeu important. Sachant que l'apéline *via* son récepteur augmente la diurèse aqueuse, la contractilité cardiaque, tout en réduisant les résistances vasculaires, nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement par le LIT01-196 pourrait être bénéfique pour prévenir le développement de l'IC après IM.

Nous avons tout d'abord évalué l'effet d'une administration aiguë de LIT01-196 par voie *s.c.* chez la souris contrôle, sur la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG). Ceci nous a permis de définir la dose optimale de LIT01-196 (9 mg/kg) entraînant une augmentation significative de la FEVG sans modification de la fréquence cardiaque (FC). Ces résultats suggéraient que l'amélioration de la performance cardiaque observée est, au moins en partie, indépendante de la FC. Nous avons ensuite étudié, dans un modèle d'IC chez la souris obtenu après IM induit par la ligature permanente de la coronaire gauche descendante, les effets d'un

traitement chronique par le LIT01-196 pendant 28 jours, commencé 48 heures après IM sur la fonction et le remodelage cardiaques

Le traitement par le LIT01-196 améliore la fonction cardiaque de manière significative en améliorant la fonction systolique et en réduisant les volumes et diamètres du ventricule gauche (VG) ainsi que différents biomarqueurs de l'IC (ANF et BNP). De plus, la mesure des paramètres hémodynamiques a permis d'observer le maintien de la pression artérielle tout en augmentant la contractilité du myocarde, en diminuant la pression intracardiaque en fin de diastole et en maintenant une pression intracardiaque en fin de systole normale.

Le traitement par le LIT01-196 chez les souris post-IM a aussi permis de diminuer la taille de l'infarctus, la fibrose cardiaque, la dilatation du VG tout en préservant l'épaisseur de sa paroi. Ces données suggèrent que le traitement par le LIT01-196 entraîne une atténuation du remodelage post-IM et donc de l'installation de la cardiomyopathie observée chez les souris après IM traitées par le sérum physiologique. L'activation de l'Apéline-R par le LIT01-196 à la suite d'un IM a permis une meilleure récupération fonctionnelle de par l'amélioration de la fonction cardiaque et ses effets cardioprotecteurs qui ont protégé le cœur des lésions myocardiques ischémiques. Finalement, l'innocuité du LIT01-196 lors d'un traitement par voie *s.c.* pendant 28 jours chez la souris est en cours d'évaluation. Les premiers résultats sur l'analyse histologique du rein et du foie ne montrent aucune toxicité du composé.

Les deux modèles expérimentaux de ce travail de thèse que sont l'hyponatrémie et l'IC après IM sont en réalité liés. En effet, une hyponatrémie peut survenir chez les patients atteints d'IC. L'hyponatrémie aggrave la mortalité chez ces patients. Le traitement donné aux patients en cas d'IC notamment les diurétiques à effet natriurétique, comme le furosémide, aggrave d'autant plus l'hyponatrémie. Le tolvaptan, qui est le traitement actuel de l'hyponatrémie, n'a pas montré de bénéfice clinique dans le traitement de l'IC. L'idéal serait donc de traiter à la fois l'hyponatrémie et l'IC en utilisant le LIT01-196. En effet, l'activation de l'Apéline-R par le LIT01-196 permettrait d'induire une diurèse aqueuse, une amélioration de la fonction cardiaque, une diminution de la dilatation du VG, de la fibrose, de la taille de l'infarctus tout en prévenant l'amincissement de la paroi du VG. **Le LIT01-196 pourrait permettre d'ouvrir la voie au développement d'une nouvelle classe thérapeutique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque après IM et de prévenir l'hyponatrémie.**

PERSPECTIVES

Différentes expériences supplémentaires pourraient être réalisées dans l'avenir et permettraient de compléter les résultats déjà obtenus au cours de ces travaux de thèse.

Développement d'agonistes biaisés de l'Apéline-R

Etant donné la distribution de l'Apéline-R dans différents organes et les effets aquarétique, hypotenseur et inotrope positif de l'apéline ainsi que son effet bénéfique sur la tolérance au glucose, il serait intéressant de développer des agonistes biaisés de l'Apéline-R. Pour cela il faudra identifier les voies de signalisations impliquées dans chaque effet biologique et développer des composés agissant préférentiellement sur l'une des voies impliquées dans un effet biologique donné. Dans ce but, nous avons montré au laboratoire que K16P (dont la séquence d'acides aminés correspond à celle de K17F déletée de la phénylalanine C-terminale), qui a la même affinité que K17F pour l'Apéline-R, la même capacité à inhiber la production d'AMPc, est beaucoup moins actif que K17F pour induire la mobilisation de la β -arrestine et l'internalisation de l'Apéline-R (Iturrioz et al., 2010; Ceraudo et al., 2014). K16P peut être considéré comme un agoniste biaisé vis-à-vis du couplage à la protéine Gi. *In vivo*, contrairement à K17F, K16P ne diminue pas la PA (El Messari et al., 2004) et n'a pas d'effet inotrope positif sur une préparation de cœur isolé perfusé mais augmente comme K17F la diurèse aqueuse (résultats non publiés). Suite à ces données, en collaboration avec l'équipe du Dr D. Bonnet, le composé fluoro-K16P (addition d'une chaîne fluorocarbonée à l'extrémité N-terminale de K16P) a été synthétisé et nous avons évalué ses effets sur la diurèse chez le rat normonatémique. Comparé au LIT01-196, le fluoro-K16P présente la même affinité pour l'Apéline-R, la même capacité à inhiber la production d'AMPc et comme K16P, il est moins actif sur le recrutement de la β -arrestine. Administré *in vivo* par voie *s.c.* chez le rat normonatémique à une dose équimolaire au LIT01-196, le fluoro-K16P induit un effet aquarétique légèrement plus élevé. Il reste à évaluer son effet sur la PA et la contractilité cardiaque et définir ainsi s'il pourrait constituer un analogue métaboliquement stable de l'apéline, biaisé vis-à-vis de Gi et utile pour le traitement de l'hyponatémie. Concernant le développement et les effets *in vivo* des agonistes de l'ApélineR, biaisés vis-à-vis de la β -arrestine, plusieurs études ont déjà été réalisées dont celles de Murza *et coll.*, De Oliveira *et coll.* ainsi que celle de notre laboratoire, pour montrer l'importance de la partie C-terminale de l'apéline dans la mobilisation de la β -arrestine et l'internalisation et la baisse de PA (Murza et al., 2015; Girault-Sotias et al., 2021; de Oliveira et al., 2022). Des agonistes non peptidiques biaisés sur la β -arrestine ne semblent pas montrer ce

profil (Read et al., 2016). Des expériences supplémentaires *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires pour comprendre ces différences.

Etude du mécanisme d'action du LIT01-196, en particulier des voies de signalisation régulées par le composé :

Nous avons émis différentes théories concernant le mécanisme d'action du LIT01-196 tout au long de ce travail de thèse. Cependant, de nombreuses voies de signalisation auraient pu également être étudiées. Pour cela, une nouvelle étude pourrait être mise en place afin d'évaluer les effets du LIT01-196 sur des cellules cardiaques isolées en culture comme par exemple des cellules iPS humaines dérivées des cardiomyocytes et incubées en présence du LIT01-196. L'analyse des flux calciques sur cellules isolées-patch clamp et imagerie calcique serait possible sur ces cellules mais également l'étude par Western blot de la phosphorylation/déphosphorylation de différentes protéines comme par exemple, le phospholamban, régulant l'ouverture et la fermeture des pompes calciques de type SERCA ou la protéine EPAC 1 et 2. L'ensemble de ces expériences permettrait d'approfondir les voies de signalisation de l'Apéline-R impliquées dans les effets bénéfiques du LIT01-196.

Analyse des effets du LIT01-196 sur la fonction rénale corrélée à l'IC.

De nombreuses études s'intéressent de plus en plus à la corrélation entre le cœur et le rein notamment dans le cadre pathologique de l'IC. Ce travail de thèse correspond totalement à cette thématique d'association cœur/rein puisque qu'il repose sur le développement d'un composé capable d'agir à la fois sur le rein dans le cadre de la correction de l'hyponatrémie, et sur la cardioprotection dans l'IC après IM. Chez les animaux en IC, seule la fonction cardiaque a été étudiée. Une nouvelle série d'expériences pourrait être effectuée afin d'étudier la fonction rénale sur ces souris après IM. Pour cela, il faudrait placer en cage métabolique des souris en IC en début et en fin de traitement par le LIT01-196 et les comparer à des souris recevant uniquement le sérum physiologique après IM afin de recueillir les urines, étudier l'osmolalité urinaire et plasmatique, et mesurer les électrolytes. Une étude histologique des reins (coloration composée d'acide périodique et de réactif de Schiff) pourrait également être réalisée.

Etude de l'effet angiogénique du LIT01-196 et sa capacité à revasculariser la zone infarctée.

Nous avons montré une amélioration de la fibrose et une réduction de la taille de l'IM chez des souris après 4 semaines de traitement par le LIT01-196, à la dose de 9mg/kg. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le LIT01-196 pourrait entraîner l'inhibition de la SphK1, de α -SMA

et du CTGF afin de réduire significativement la fibrose. De par l'effet angiogénique de l'apéline, le LIT01-196 pourrait également avoir un effet bénéfique sur la néo-angiogénèse et permettre notamment une revascularisation de la zone infarctée et améliorer ainsi la survie des cardiomyocytes. Cette observation est corrélée avec la hausse de l'expression relative de HIF-1 α , indicateur de l'hypoxie des cardiomyocytes, détectée dans les cœurs traités par le LIT01-196. Afin d'étudier l'effet angiogénique potentiel du LIT01-196, il pourrait être intéressant de réaliser un immunomarquage CD31 sur des coupes de cœur congelées afin de réaliser par la suite un comptage des vaisseaux. En effet, le CD31 est une protéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines, exprimée par l'endothélium (artères, artérioles, veinules, veines, capillaires non sinusoïdaux). L'immunomarquage permettrait de comparer le nombre de vaisseaux dans différentes zones du cœur : zone infarctée, zone péri-infarctée, zone saine après traitement par le LIT01-196 ou du sérum physiologique et ainsi vérifier notre hypothèse.

Association du LIT01-196 avec un autre médicament couramment utilisé dans l'IC.

Les médicaments prescrits dans le traitement de l'IC chronique sont de plusieurs types :

- Ceux **qui inhibent la formation ou l'action de l'Ang-II**, une substance qui participe au contrôle du volume et de la pression du sang (inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou IEC, antagonistes des récepteurs à l'Ang-II) ;
- Ceux **qui renforcent et soutiennent le travail du cœur** (bêtabloquants, digoxine, ivabradine, dérivés nitrés) ;
- Ceux **qui préviennent la rétention d'eau** (diurétiques « classiques », antagonistes de l'aldostérone).
- Parfois, il est nécessaire de prescrire également des traitements **anticoagulants** (en cas d'infarctus, de fibrillation auriculaire), ou des médicaments destinés à **traiter l'angine de poitrine** (angor).

La combinaison de ces traitements aura différents effets sur le cœur. Les IEC sont des vasodilatateurs artériels et veineux, qui diminuent la précharge et la postcharge, et luttent contre le remodelage ventriculaire gauche (limitation de la formation de fibrose). Ils vont donc induire une amélioration de la fonction cardiaque à court et moyen terme. Les diurétiques luttent contre la rétention hydrosodée et permettent donc d'améliorer les signes congestifs. Ils vont baisser la volémie et éviter les oedèmes. Les bêtabloquants s'opposent aux effets délétères de la stimulation sympathique et abaissent la FC afin d'éviter au cœur une tachycardie adaptative trop prolongée.

Ils réduisent le nombre d'hospitalisations, améliorent les capacités fonctionnelles et diminuent la mortalité à long terme.

Le LIT01-196, de par ses effets bénéfiques sur le cœur (amélioration de la fonction cardiaque, réduction de la fibrose et de la dilatation cardiaques, effet aquarétique, abaissement de la précharge) pourraient remplacer plusieurs de ces traitements. De plus, nous avons montré que le traitement par le LIT01-196 chez la souris après IM n'a pas d'effet sur l'activité sympathique. Cependant la combinaison du LIT01-196 avec différents composés n'a pas été déterminée. Il serait intéressant d'évaluer les effets du LIT01-196 combiné avec un bêtabloquant, un IEC, ou un nouveau composé comme l'Entresto (combinaison du valsartan et du vacubitril). Dans notre laboratoire, un nouveau composé a été développé, le firibastat (initialement nommé RB150), qui pénètre dans le cerveau après administration orale et inhibe spécifiquement et sélectivement l'aminopeptidase A dans le cerveau et bloque ainsi l'hyperactivité du SRA cérébral. Le firibastat a montré son efficacité à diminuer la PA chez le rat hypertendu et a amélioré la fonction cardiaque chez le rongeur en IC après IM mais également chez les patients. Une nouvelle série d'expériences pourrait être l'évaluation d'un traitement chronique par la combinaison du firibastat et du LIT01-196 chez des souris en IC après IM. Le firibastat qui bloquerait au niveau central l'hyperactivité du SRA cérébral, responsable de l'hyperactivité sympathique observée dans ce modèle, avec les effets cardioprotecteurs du LIT01-196 qui agirait au niveau systémique, pourrait aboutir à des résultats intéressants.

PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse ouvrent la voie à plusieurs autres applications thérapeutiques potentielles.

Le traitement par des agonistes de l'Apéline-R pourrait également être utile pour le traitement de pathologies rénales comme la polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD). C'est la maladie rénale héréditaire la plus fréquente, menant à long terme à une insuffisance rénale terminale. Deux gènes sont principalement impliqués, PKD1 et PKD2, responsables respectivement de la synthèse de la polycystine 1 et de polycystine 2. Ces deux protéines se dimérisent et sont situées à la base du cil primaire des cellules épithéliales rénales. L'une des fonctions des cils primaires dans la lumière tubulaire pourraient être de réagir comme rhéostat mécanosensoriel au flux urinaire. En réponse à un flux liquidien latéral, les cils se courbent permettant l'entrée du Ca^{2+} dans les cellules. Cet effet est aboli en présence d'une mutation des polycystines. Au sein des cils primaires des cellules épithéliales rénales, le complexe polycystine réagit au flux liquidien en augmentant l'influx calcique local qui participe à contrôler le diamètre et la différenciation tubulaires *via* l'augmentation de la production d'AMPc et l'activation de la voie des MAPK, impliquées dans la prolifération. Les mutations au sein des polycystines vont lever le frein sur l'AMPc et la voie des MAPK et induire le développement des kystes.

La PKRAD se manifeste par le développement et l'expansion de kystes rénaux douloureux, entraînant des infections du système urogénital, de l'HTA et une insuffisance rénale. Il a été mis en évidence que l'augmentation de la production d'AMPc jouait un rôle central dans la mise en place de la PKRAD. En effet, l'AMPc joue un rôle majeur dans la formation et l'expansion des kystes rénaux. Chaque kyste est une cavité liquidienne bordée d'un épithélium dérivé des cellules tubulaires rénales. L'AVP *via* son action sur le V2-R, est l'agoniste le plus puissant pour la génération d'AMPc dans les canaux collecteurs. L'utilisation du tolvaptan chez des patients porteurs de PKRAD a montré une diminution de la croissance du volume rénal ainsi qu'une diminution de l'altération de la fonction rénale. Son utilisation dans la PKRAD a donc été validée, mais son utilisation est toutefois limitée par ses effets secondaires, en particulier le syndrome polyuro-polydipsie et des cas de toxicité hépatique (étude clinique TEMPO).

La régulation du système apélinergique a été peu étudiée dans la PKRAD. Une seule étude rapporte une augmentation du rapport apéline/copeptine au cours du développement de la pathologie (Lacquaniti et al., 2013). Du fait de l'importance de la production d'AMPc dans les cellules tubulaires impliquées dans le développement des kystes rénaux, l'activation de l'Apéline-R par le LIT01-196, ou même mieux, par un agoniste de l'Apéline-R biaisé sur Gi

pourrait, en inhibant la production d'AMPc et la phosphorylation de ERK, constituer une nouvelle approche pour ralentir le développement des kystes rénaux dans la PKRAD. Ce traitement n'aurait pas les effets indésirables du tolvaptan comme le syndrome polyuro-polydipsie ou la toxicité hépatique et pourrait être utilisé chez les diabétiques puisque, à l'inverse du tolvaptan, il diminue la glycémie et augmente l'utilisation du glucose par les muscles (Dray et al., 2008).

Une autre application pour l'utilisation d'agonistes de l'Apéline-R au niveau rénal pourrait être dans le syndrome néphrogénique d'antidiurèse inappropriée (SNAI). Cette affection est due à l'activation constitutive du V2-R par des mutations à gain de fonction, qui sont dues à une substitution, dans la séquence du V2-R, du résidu arginine en position 137 par une leucine ou une cystéine (R137L/C) ou de la phénylalanine en position 229 par une valine (F229V) (Rochdi et al., 2010; Carpentier et al., 2012). La mutation R137C s'est avérée être la plus fréquente. Les patients atteints du SNAI présentent une diminution de la diurèse ainsi qu'une osmolalité urinaire élevée et une hyponatrémie, malgré des taux plasmatiques d'AVP faibles, voire indétectables. Cette activation constitutive du V2-R va entraîner une internalisation ainsi qu'une production d'AMPc constitutives. Cette production accrue va favoriser l'insertion des AQP2 vers la membrane apicale des cellules du canal collecteur et augmenter la réabsorption d'eau. Des données *in vitro* ont montré que le tolvaptan et le satavaptan (antagonistes sélectifs du V2-R) ne réduisent par l'augmentation constitutive des niveaux d'AMPc chez les mutants du V2-R R137L/C (Erdélyi et al., 2015; Ranieri et al., 2019).

L'utilisation d'un agoniste de l'apéline dans la prise en charge du SNAI pourrait présenter un intérêt thérapeutique potentiel en raison de son mode d'action. L'activation de l'Apéline-R couplé à la protéine Gi permet de réduire la production d'AMPc, diminuant ainsi l'insertion des AQP2 à la membrane apicale des cellules du canal collecteur, diminuant la réabsorption d'eau et augmentant la diurèse. Pour évaluer cette hypothèse, il faudrait étudier l'effet potentiel de l'apéline ainsi que de ses analogues pour leur capacité à inhiber, dans les cellules CHO exprimant de façon stable l'Apéline-R ou mpkCCD, la production d'AMPc induite par la surexpression du mutant V2-R R137L/C (constitutivement actif) ainsi que la mobilisation des AQP2 à la membrane apicale. Il serait aussi intéressant de voir si ces mutations modifient l'hétérodimerisation entre le V2-R et l'Apéline-R et les conséquences sur l'activation des voies de signalisation de l'Apéline-R. Par la suite, si ces données sont confirmées, il serait intéressant d'évaluer *in vivo* dans un modèle de souris génétiquement modifiées qui exprimerait le V2-R

muté R137L/C, les effets d'un traitement par le LIT-01-190 sur la diurèse, l'osmolalité urinaire, la prise de boisson et la concentration plasmatique de sodium.

L'apéline affecte positivement le métabolisme des lipides et améliore le contrôle de la glycémie en renforçant la sensibilité à l'insuline et en favorisant l'utilisation du glucose (Castan-Laurell et al., 2019).

Ces effets protecteurs sur le métabolisme énergétique sont particulièrement intéressants pour les patients atteints de néphropathie diabétique entraînant à long terme une insuffisance rénale chronique.

La néphropathie diabétique (ND) est la cause la plus fréquente d'insuffisance rénale dans le monde. L'hyperglycémie modifie l'hémodynamique glomérulaire, entraînant une hypertrophie glomérulaire, une altération de la barrière de filtration et le développement de l'albuminurie. Des études précliniques suggèrent que l'expression du système apélinergique est altérée dans la ND. Certaines études sur des modèles animaux de diabète de type 2 ont montré une réduction de l'expression rénale de l'Apéline-R et de l'apéline (Guo et al., 2015), tandis que d'autres études montraient le contraire (Müller et al., 2018).

Dans les podocytes de souris en culture, l'apéline-13 a eu des effets anti-apoptotiques. Dans le modèle de souris diabétiques Akita (modèle de diabète de type 1) (Müller et al., 2018), l'apéline-13 a préservé l'architecture glomérulaire, réduit la protéinurie et inhibé l'inflammation rénale (Chen et al., 2014a). Les chercheurs ont découvert que cette protection était due, en partie, à un effet inhibiteur de l'apéline sur l'hyperacétylation des histones induites par le diabète. Une protection similaire a été observée chez les souris Ove26 atteintes de diabète de type 1, chez qui l'apéline-13 a eu des effets antioxydants et a empêché la perte d'expression de la mégaline dans le tubule proximal, ce qui a permis d'améliorer l'albuminurie (Day et al., 2013). Dans l'ensemble, les données précliniques disponibles suggèrent que l'apéline aurait un rôle protecteur dans la ND (de Oliveira et al., 2022). Il serait intéressant d'évaluer *in vitro* sur les podocytes en culture et *in vivo* dans les modèles de souris diabétiques décrits ci-dessus, les effets anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et anti-oxydants du LIT01-196.

BIBLIOGRAPHIE

- Adrogué, H. J., and Madias, N. E. (2000). Hyponatremia. *N Engl J Med* 342, 1581–1589. doi:10.1056/NEJM200005253422107.
- Akcilar, R., Turgut, S., Caner, V., Akcilar, A., Ayada, C., Elmas, L., et al. (2013). Apelin effects on blood pressure and RAS in DOCA-salt-induced hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 35, 550–557. doi:10.3109/10641963.2013.764889.
- Alukal, J. J., John, S., and Thuluvath, P. J. (2020). Hyponatremia in Cirrhosis: An Update. *Am J Gastroenterol* 115, 1775–1785. doi:10.14309/ajg.0000000000000786.
- Ambrosy, A. P., Fonarow, G. C., Butler, J., Chioncel, O., Greene, S. J., Vaduganathan, M., et al. (2014). The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries. *J Am Coll Cardiol* 63, 1123–1133. doi:10.1016/j.jacc.2013.11.053.
- Andersen, C. U., Hilberg, O., Mellekjaer, S., Nielsen-Kudsk, J. E., and Simonsen, U. (2011). Apelin and pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 1, 334–346. doi:10.4103/2045-8932.87299.
- Armstrong, P. W., Pieske, B., Anstrom, K. J., Ezekowitz, J., Hernandez, A. F., Butler, J., et al. (2020). Vericiguat in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med* 382, 1883–1893. doi:10.1056/NEJMoa1915928.
- Ashley, E. A., Powers, J., Chen, M., Kundu, R., Finsterbach, T., Caffarelli, A., et al. (2005). The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 65, 73–82. doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.018.
- Ason, B., Chen, Y., Guo, Q., Hoagland, K. M., Chui, R. W., Fielden, M., et al. (2020). Cardiovascular response to small-molecule APJ activation. *JCI Insight* 5, 132898. doi:10.1172/jci.insight.132898.
- Attar, B. (2019). Approach to Hyponatremia in Cirrhosis. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 13, 98–101. doi:10.1002/cld.790.
- Azizi, M., Iturrioz, X., Blanchard, A., Peyrard, S., De Mota, N., Chartrel, N., et al. (2008). Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 1015–1024. doi:10.1681/ASN.2007070816.
- Azizi, Y., Faghihi, M., Imani, A., Roghani, M., and Nazari, A. (2013). Post-infarct treatment with [Pyr1]-apelin-13 reduces myocardial damage through reduction of oxidative injury and nitric oxide enhancement in the rat model of myocardial infarction. *Peptides* 46, 76–82. doi:10.1016/j.peptides.2013.05.006.
- Bai, B., Cai, X., Jiang, Y., Karteris, E., and Chen, J. (2014a). Heterodimerization of apelin receptor and neurotensin receptor 1 induces phosphorylation of ERK(1/2) and cell proliferation via Gαq-mediated mechanism. *J Cell Mol Med* 18, 2071–2081. doi:10.1111/jcmm.12404.
- Bai, B., Liu, L., Zhang, N., Wang, C., Jiang, Y., and Chen, J. (2014b). Heterodimerization of human apelin and bradykinin 1 receptors: novel signal transduction characteristics. *Cell Signal* 26, 1549–1559. doi:10.1016/j.cellsig.2014.03.022.
- Bai, B., Tang, J., Liu, H., Chen, J., Li, Y., and Song, W. (2008). Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the Gi2 pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 311–318. doi:10.1111/j.1745-7270.2008.00403.x.
- Bellos, I., Kontzoglou, K., Psyrris, A., and Pergialiotis, V. (2020). Tolvaptan Response Improves Overall Survival in Patients with Refractory Ascites: A Meta-Analysis. *Dig Dis* 38, 320–328. doi:10.1159/000503559.
- Benjamin, E. J., Virani, S. S., Callaway, C. W., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., et al. (2018). Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 137, e67–e492. doi:10.1161/CIR.0000000000000558.
- Berl, T., Quittnat-Pelletier, F., Verbalis, J. G., Schrier, R. W., Bichet, D. G., Ouyang, J., et al. (2010). Oral tolvaptan is safe and effective in chronic hyponatremia. *J Am Soc Nephrol* 21, 705–712. doi:10.1681/ASN.2009080857.
- Berry, M. F., Pirolli, T. J., Jayasankar, V., Burdick, J., Morine, K. J., Gardner, T. J., et al. (2004). Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 110, 1187–1193.

doi:10.1161/01.CIR.0000138382.57325.5c.

- Besserer-Offroy, É., Bérubé, P., Côté, J., Murza, A., Longpré, J.-M., Dumaine, R., et al. (2018). The hypotensive effect of activated apelin receptor is correlated with β -arrestin recruitment. *Pharmacol. Res.* 131, 7–16. doi:10.1016/j.phrs.2018.02.032.
- Bibbins-Domingo, K., Pletcher, M. J., Lin, F., Vittinghoff, E., Gardin, J. M., Arynchyn, A., et al. (2009). Racial differences in incident heart failure among young adults. *N Engl J Med* 360, 1179–1190. doi:10.1056/NEJMoa0807265.
- Blanchard, A., Steichen, O., De Mota, N., Curis, E., Gauci, C., Frank, M., et al. (2013). An abnormal apelin/vasopressin balance may contribute to water retention in patients with the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone (SIADH) and heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 2084–2089. doi:10.1210/jc.2012-3794.
- Boal, F., Timotin, A., Roumegoux, J., Alfarano, C., Calise, D., Anesia, R., et al. (2016). Apelin-13 administration protects against ischaemia/reperfusion-mediated apoptosis through the FoxO1 pathway in high-fat diet-induced obesity. *Br J Pharmacol* 173, 1850–1863. doi:10.1111/bph.13485.
- Bodineau, L., Taveau, C., Lê Quan Sang, H.-H., Osterstock, G., Queguiner, I., Moos, F., et al. (2011). Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. *Endocrinology* 152, 3492–3503. doi:10.1210/en.2011-0206.
- Boertien, W. E., Meijer, E., de Jong, P. E., ter Horst, G. J., Renken, R. J., van der Jagt, E. J., et al. (2015). Short-term Effects of Tolvaptan in Individuals With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease at Various Levels of Kidney Function. *Am J Kidney Dis* 65, 833–841. doi:10.1053/j.ajkd.2014.11.010.
- Boulkeroua, C., Ayari, H., Khalfaoui, T., Lafrance, M., Besserer-Offroy, É., Ekindi, N., et al. (2019). Apelin-13 Regulates Vasopressin-Induced Aquaporin-2 Expression and Trafficking in Kidney Collecting Duct Cells. *Cell Physiol Biochem* 53, 687–700. doi:10.33594/000000165.
- Brailoiu, G. C., Dun, S. L., Yang, J., Ohsawa, M., Chang, J. K., and Dun, N. J. (2002). Apelin-immunoreactivity in the rat hypothalamus and pituitary. *Neurosci. Lett.* 327, 193–197.
- Brame, A. L., Maguire, J. J., Yang, P., Dyson, A., Torella, R., Cheriyan, J., et al. (2015). Design, characterization, and first-in-human study of the vascular actions of a novel biased apelin receptor agonist. *Hypertension* 65, 834–840. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05099.
- Brownstein, M. J., Russell, J. T., and Gainer, H. (1980). Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207, 373–378.
- Busch, R., Strohbach, A., Pennewitz, M., Lorenz, F., Bahls, M., Busch, M. C., et al. (2015). Regulation of the endothelial apelin/APJ system by hemodynamic fluid flow. *Cell Signal* 27, 1286–1296. doi:10.1016/j.cellsig.2015.03.011.
- Cai, X., Bai, B., Zhang, R., Wang, C., and Chen, J. (2017). Apelin receptor homodimer-oligomers revealed by single-molecule imaging and novel G protein-dependent signaling. *Sci Rep* 7, 40335. doi:10.1038/srep40335.
- Carpentier, E., Greenbaum, L. A., Rochdi, D., Abrol, R., Goddard, W. A., Bichet, D. G., et al. (2012). Identification and characterization of an activating F229V substitution in the V2 vasopressin receptor in an infant with NSIAD. *J Am Soc Nephrol* 23, 1635–1640. doi:10.1681/ASN.2012010077.
- Castan-Laurell, I., Masri, B., and Valet, P. (2019). The apelin/APJ system as a therapeutic target in metabolic diseases. *Expert Opin Ther Targets* 23, 215–225. doi:10.1080/14728222.2019.1561871.
- Ceraudo, E., Galanth, C., Carpentier, E., Banegas-Font, I., Schonegge, A.-M., Alvear-Perez, R., et al. (2014). Biased signaling favoring g_i over β -arrestin promoted by an apelin fragment lacking the C-terminal phenylalanine. *J. Biol. Chem.* 289, 24599–24610. doi:10.1074/jbc.M113.541698.
- Chamberland, C., Barajas-Martinez, H., Haufe, V., Fecteau, M.-H., Delabre, J.-F., Burashnikov, A., et al. (2010). Modulation of canine cardiac sodium current by Apelin. *J Mol Cell Cardiol* 48, 694–701. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.12.011.
- Charo, D. N., Ho, M., Fajardo, G., Kawana, M., Kundu, R. K., Sheikh, A. Y., et al. (2009). Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1904–1913. doi:10.1152/ajpheart.00686.2009.

- Chen, H., Li, J., Jiao, L., Petersen, R. B., Li, J., Peng, A., et al. (2014a). Apelin inhibits the development of diabetic nephropathy by regulating histone acetylation in Akita mouse. *J Physiol* 592, 505–521. doi:10.1113/jphysiol.2013.266411.
- Chen, H., Wang, L., Wang, W., Cheng, C., Zhang, Y., Zhou, Y., et al. (2017). ELABELA and an ELABELA Fragment Protect against AKI. *J Am Soc Nephrol* 28, 2694–2707. doi:10.1681/ASN.2016111210.
- Chen, X., Bai, B., Tian, Y., Du, H., and Chen, J. (2014b). Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling. *J Biol Chem* 289, 31173–31187. doi:10.1074/jbc.M114.574020.
- Chen, Y., Xu, C., Hu, J., Deng, M., Qiu, Q., Mo, S., et al. (2021). Diuretic Action of Apelin-13 Mediated by Inhibiting cAMP/PKA/sPRR Pathway. *Front Physiol* 12, 642274. doi:10.3389/fphys.2021.642274.
- Chen, Z., Wu, C., Liu, Y., Li, H., Zhu, Y., Huang, C., et al. (2020). ELABELA attenuates deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension and renal injury by inhibition of NADPH oxidase/ROS/NLRP3 inflammasome pathway. *Cell Death Dis* 11, 698. doi:10.1038/s41419-020-02912-0.
- Cheng, C.-C., Weerateerangkul, P., Lu, Y.-Y., Chen, Y.-C., Lin, Y.-K., Chen, S.-A., et al. (2013). Apelin regulates the electrophysiological characteristics of atrial myocytes. *Eur J Clin Invest* 43, 34–40. doi:10.1111/eci.12012.
- Chng, S. C., Ho, L., Tian, J., and Reversade, B. (2013). ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Dev Cell* 27, 672–680. doi:10.1016/j.devcel.2013.11.002.
- Choe, W., Albright, A., Sulcove, J., Jaffer, S., Hesselgesser, J., Lavi, E., et al. (2000). Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol* 6 Suppl 1, S61-69.
- Chong, K. S., Gardner, R. S., Morton, J. J., Ashley, E. A., and McDonagh, T. A. (2006). Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 8, 355–360. doi:10.1016/j.ejheart.2005.10.007.
- Chun, H. J., Ali, Z. A., Kojima, Y., Kundu, R. K., Sheikh, A. Y., Agrawal, R., et al. (2008). Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest* 118, 3343–3354. doi:10.1172/JCI34871.
- Clarke, K. J., Whitaker, K. W., and Reyes, T. M. (2009). Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 21, 83–89. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01815.x.
- Conrad, N., Judge, A., Tran, J., Mohseni, H., Hedgecote, D., Crespillo, A. P., et al. (2018). Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. *Lancet* 391, 572–580. doi:10.1016/S0140-6736(17)32520-5.
- Coquerel, D., Chagnon, F., Sainsily, X., Dumont, L., Murza, A., Côté, J., et al. (2017). ELABELA Improves Cardio-Renal Outcome in Fatal Experimental Septic Shock. *Crit Care Med* 45, e1139–e1148. doi:10.1097/CCM.0000000000002639.
- Couvineau, P., Llorens-Cortes, C., and Iturrioz, X. (2020). Elabela/Toddler and apelin bind differently to the apelin receptor. *FASEB J* 34, 7989–8000. doi:10.1096/fj.201903029R.
- Cox, C. M., D’Agostino, S. L., Miller, M. K., Heimark, R. L., and Krieg, P. A. (2006). Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 296, 177–189. doi:10.1016/j.ydbio.2006.04.452.
- Dai, T., Ramirez-Correa, G., and Gao, W. D. (2006). Apelin increases contractility in failing cardiac muscle. *Eur J Pharmacol* 553, 222–228. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.034.
- D’Aniello, C., Lonardo, E., Iaconis, S., Guardiola, O., Liguoro, A. M., Liguori, G. L., et al. (2009). G protein-coupled receptor APJ and its ligand apelin act downstream of Cripto to specify embryonic stem cells toward the cardiac lineage through extracellular signal-regulated kinase/p70S6 kinase signaling pathway. *Circ Res* 105, 231–238. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201186.
- Day, R. T., Cavaglieri, R. C., and Feliers, D. (2013). Apelin retards the progression of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F788-800. doi:10.1152/ajprenal.00306.2012.
- De Falco, M., De Luca, L., Onori, N., Cavallotti, I., Artigiano, F., Esposito, V., et al. (2002). Apelin expression in normal human tissues. *In Vivo* 16, 333–336.

- De Mota, N., Lenkei, Z., and Llorens-Cortès, C. (2000). Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 72, 400–407. doi:10.1159/000054609.
- De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., et al. (2004). Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10464–10469. doi:10.1073/pnas.0403518101.
- de Oliveira, A. A., Vergara, A., Wang, X., Vederas, J. C., and Oudit, G. Y. (2022). Apelin pathway in cardiovascular, kidney, and metabolic diseases: Therapeutic role of apelin analogs and apelin receptor agonists. *Peptides* 147, 170697. doi:10.1016/j.peptides.2021.170697.
- De Peretti, C., Pérel, C., Tuppin, P., Iliou, M.-C., Juillièrre, Y., Gabet, A., et al. (2014). Article - Bulletin épidémiologique hebdomadaire. *Bull. Epidémiol. Hebd* 9–10, 172–81.
- Deng, C., Chen, H., Yang, N., Feng, Y., and Hsueh, A. J. W. (2015). Apela Regulates Fluid Homeostasis by Binding to the APJ Receptor to Activate Gi Signaling*. *Journal of Biological Chemistry* 290, 18261–18268. doi:10.1074/jbc.M115.648238.
- Denninger, J. W., and Marletta, M. A. (1999). Guanylate cyclase and the ·NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411, 334–350. doi:10.1016/S0005-2728(99)00024-9.
- Denton, D. A., McKinley, M. J., and Weisinger, R. S. (1996). Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7397–7404. doi:10.1073/pnas.93.14.7397.
- Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (1999). Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mech Dev* 84, 199–203. doi:10.1016/s0925-4773(99)00081-7.
- Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buléon, M., et al. (2008). Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8, 437–445. doi:10.1016/j.cmet.2008.10.003.
- Dunlap, M. E., Hauptman, P. J., Amin, A. N., Chase, S. L., Chiodo, J. A., Chiong, J. R., et al. (2017). Current Management of Hyponatremia in Acute Heart Failure: A Report From the Hyponatremia Registry for Patients With Euvolemic and Hypervolemic Hyponatremia (HN Registry). *J Am Heart Assoc* 6, e005261. doi:10.1161/JAHA.116.005261.
- El Messari, S., Iturrioz, X., Fassot, C., De Mota, N., Roesch, D., and Llorens-Cortés, C. (2004). Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J. Neurochem.* 90, 1290–1301. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02591.x.
- Ellison, D. H., and Berl, T. (2007). Clinical practice. The syndrome of inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med* 356, 2064–2072. doi:10.1056/NEJMc066837.
- Erdélyi, L. S., Mann, W. A., Morris-Rosendahl, D. J., Groß, U., Nagel, M., Várnai, P., et al. (2015). Mutation in the V2 vasopressin receptor gene, AVPR2, causes nephrogenic syndrome of inappropriate diuresis. *Kidney Int* 88, 1070–1078. doi:10.1038/ki.2015.181.
- Esteban-Martínez, R. L., Pérez-Razo, J. C., Vargas-Alarcón, G., Martínez-Rodríguez, N., Cano-Martínez, L. J., López-Hernández, L. B., et al. (2016). Polymorphisms of APLN-APLNR system are associated with essential hypertension in Mexican-Mestizo individuals. *Exp Mol Pathol* 101, 105–109. doi:10.1016/j.yexmp.2016.07.007.
- Evans, N. A., Groarke, D. A., Warrack, J., Greenwood, C. J., Dodgson, K., Milligan, G., et al. (2001). Visualizing differences in ligand-induced beta-arrestin-GFP interactions and trafficking between three recently characterized G protein-coupled receptors. *J Neurochem* 77, 476–485. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00269.x.
- Eyries, M., Siegfried, G., Ciumas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F., et al. (2008). Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res* 103, 432–440. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.179333.
- Falcão-Pires, I., Gonçalves, N., Henriques-Coelho, T., Moreira-Gonçalves, D., Roncon-Albuquerque, R., and Leite-Moreira, A. F. (2009). Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H2007-2014.

- doi:10.1152/ajpheart.00089.2009.
- Farkasfalvi, K., Stagg, M. A., Coppen, S. R., Siedlecka, U., Lee, J., Soppa, G. K., et al. (2007). Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 889–895. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.017.
- Filippatos, T. D., and Elisaf, M. S. (2013). Hyponatremia in patients with heart failure. *World J Cardiol* 5, 317–328. doi:10.4330/wjc.v5.i9.317.
- Fischer, C., Lamer, T., Fernandez, K., Gheblawi, M., Wang, W., Pascoe, C., et al. (2020). Optimizing PEG-Extended Apelin Analogues as Cardioprotective Drug Leads: Importance of the KFRR Motif and Aromatic Head Group for Improved Physiological Activity. *J Med Chem* 63, 12073–12082. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01395.
- Fischer, C., Lamer, T., Wang, W., McKinnie, S. M. K., Iturrioz, X., Llorens-Cortes, C., et al. (2019). Plasma kallikrein cleaves and inactivates apelin-17: Palmitoyl- and PEG-extended apelin-17 analogs as metabolically stable blood pressure-lowering agents. *Eur J Med Chem* 166, 119–124. doi:10.1016/j.ejmech.2019.01.040.
- Flahault, A., Girault-Sotias, P.-E., Keck, M., Alvear-Perez, R., De Mota, N., Estéouille, L., et al. (2021). A metabolically stable apelin-17 analog decreases AVP-induced antidiuresis and improves hyponatremia. *Nat Commun* 12, 305. doi:10.1038/s41467-020-20560-y.
- Flather, M. D., Shibata, M. C., Coats, A. J. S., Van Veldhuisen, D. J., Parkhomenko, A., Borbola, J., et al. (2005). Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J* 26, 215–225. doi:10.1093/eurheartj/ehi115.
- Fleming, I., and Busse, R. (1999). Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 43, 532–541. doi:10.1016/s0008-6363(99)00094-2.
- Foussal, C., Lairez, O., Calise, D., Pathak, A., Guilbeau-Frugier, C., Valet, P., et al. (2010). Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 584, 2363–2370. doi:10.1016/j.febslet.2010.04.025.
- Fowler, M. B. (1997). Effects of beta blockers on symptoms and functional capacity in heart failure. *Am J Cardiol* 80, 55L–58L. doi:10.1016/s0002-9149(97)00849-7.
- Gabet, A., Lamarche-Vadel, A., Chin, F., Juillièrre, Y., De Peretti, C., and Olié, V. (2014). Mortalité due à l'insuffisance cardiaque en France, évolutions 2000-2010. *Bull Epidémiol Hebd* 21–22, 386–394.
- Galanth, C., Hus-Citharel, A., Li, B., and Llorens-Cortès, C. (2012). Apelin in the control of body fluid homeostasis and cardiovascular functions. *Curr. Pharm. Des.* 18, 789–798.
- Galon-Tilleman, H., Yang, H., Bednarek, M. A., Spurlock, S. M., Paavola, K. J., Ko, B., et al. (2017). Apelin-36 Modulates Blood Glucose and Body Weight Independently of Canonical APJ Receptor Signaling. *J Biol Chem* 292, 1925–1933. doi:10.1074/jbc.M116.748103.
- Gargalovic, P., Wong, P., Onorato, J., Finlay, H., Wang, T., Yan, M., et al. (2021). In Vitro and In Vivo Evaluation of a Small-Molecule APJ (Apelin Receptor) Agonist, BMS-986224, as a Potential Treatment for Heart Failure. *Circ Heart Fail* 14, e007351. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007351.
- Gerbier, R., Alvear-Perez, R., Margathe, J.-F., Flahault, A., Couvineau, P., Gao, J., et al. (2017). Development of original metabolically stable apelin-17 analogs with diuretic and cardiovascular effects. *FASEB J* 31, 687–700. doi:10.1096/fj.201600784R.
- Gerbier, R., Leroux, V., Couvineau, P., Alvear-Perez, R., Maignret, B., Llorens-Cortes, C., et al. (2015). New structural insights into the apelin receptor: identification of key residues for apelin binding. *FASEB J.* 29, 314–322. doi:10.1096/fj.14-256339.
- Gheorghide, M., Rossi, J. S., Cotts, W., Shin, D. D., Hellkamp, A. S., Piña, I. L., et al. (2007). Characterization and prognostic value of persistent hyponatremia in patients with severe heart failure in the ESCAPE Trial. *Arch Intern Med* 167, 1998–2005. doi:10.1001/archinte.167.18.1998.
- Gibson, E. M., Henson, E. S., Haney, N., Villanueva, J., and Gibson, S. B. (2002). Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *Cancer Res* 62, 488–496.
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation.

- Physiol Rev* 81, 629–683. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.629.
- Ginés, P., Berl, T., Bernardi, M., Bichet, D. G., Hamon, G., Jiménez, W., et al. (1998). Hyponatremia in cirrhosis: from pathogenesis to treatment. *Hepatology* 28, 851–864. doi:10.1002/hep.510280337.
- Girault-Sotias, P.-E., Gerbier, R., Flahault, A., de Mota, N., and Llorens-Cortes, C. (2021). Apelin and Vasopressin: The Yin and Yang of Water Balance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12, 735515. doi:10.3389/fendo.2021.735515.
- Goldsmith, S. R., Francis, G. S., and Cowley, A. W. (1986). Arginine vasopressin and the renal response to water loading in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 58, 295–299. doi:10.1016/0002-9149(86)90065-2.
- Gouzènes, L., Desarménien, M. G., Hussy, N., Richard, P., and Moos, F. C. (1998). Vasopressin regularizes the phasic firing pattern of rat hypothalamic magnocellular vasopressin neurons. *J Neurosci* 18, 1879–1885.
- Guo, C., Liu, Y., Zhao, W., Wei, S., Zhang, X., Wang, W., et al. (2015). Apelin promotes diabetic nephropathy by inducing podocyte dysfunction via inhibiting proteasome activities. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19, 2273–2285. doi:10.1111/jcmm.12619.
- Gurzu, B., Petrescu, B. C., Costuleanu, M., and Petrescu, G. (2006). Interactions between apelin and angiotensin II on rat portal vein. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7, 212–216. doi:10.3317/jraas.2006.040.
- Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., et al. (1999). Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta* 1452, 25–35. doi:10.1016/s0167-4889(99)00114-7.
- Hashimoto, T., Kihara, M., Ishida, J., Imai, N., Yoshida, S., Toya, Y., et al. (2006). Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1267–1272. doi:10.1161/01.ATV.0000218841.39828.91.
- Hjalmarson, A., Goldstein, S., Fagerberg, B., Wedel, H., Waagstein, F., Kjeksus, J., et al. (2000). Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *JAMA* 283, 1295–1302. doi:10.1001/jama.283.10.1295.
- Ho, L., van Dijk, M., Chye, S. T. J., Messerschmidt, D. M., Chng, S. C., Ong, S., et al. (2017). ELABELA deficiency promotes preeclampsia and cardiovascular malformations in mice. *Science* 357, 707–713. doi:10.1126/science.aam6607.
- Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., et al. (2000). Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 275, 21061–21067. doi:10.1074/jbc.M908417199.
- Huang, F., Zhu, P., Huang, Q., Yuan, Y., Lin, F., and Li, Q. (2016). Associations between gene polymorphisms of the apelin-APJ system and the risk of hypertension. *Blood Press* 25, 257–262. doi:10.3109/08037051.2016.1156905.
- Hurbin, A., Boissin-Agasse, L., Orcel, H., Rabié, A., Joux, N., Desarménien, M. G., et al. (1998). The V1a and V1b, but not V2, vasopressin receptor genes are expressed in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus, and the transcripts are essentially colocalized in the vasopressinergic magnocellular neurons. *Endocrinology* 139, 4701–4707. doi:10.1210/endo.139.11.6320.
- Hus-Citharel, A., Bodineau, L., Frugière, A., Joubert, F., Bouby, N., and Llorens-Cortes, C. (2014). Apelin counteracts vasopressin-induced water reabsorption via cross talk between apelin and vasopressin receptor signaling pathways in the rat collecting duct. *Endocrinology* 155, 4483–4493. doi:10.1210/en.2014-1257.
- Hus-Citharel, A., Bouby, N., Frugière, A., Bodineau, L., Gasc, J.-M., and Llorens-Cortes, C. (2008). Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int.* 74, 486–494. doi:10.1038/ki.2008.199.
- Ishida, J., Hashimoto, T., Hashimoto, Y., Nishiwaki, S., Iguchi, T., Harada, S., et al. (2004). Regulatory Roles for APJ, a Seven-transmembrane Receptor Related to Angiotensin-type 1 Receptor in Blood Pressure in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 279, 26274–26279. doi:10.1074/jbc.M404149200.
- Iturrioz, X., Gerbier, R., Leroux, V., Alvear-Perez, R., Maigret, B., and Llorens-Cortes, C. (2010). By interacting

- with the C-terminal Phe of apelin, Phe255 and Trp259 in helix VI of the apelin receptor are critical for internalization. *J. Biol. Chem.* 285, 32627–32637. doi:10.1074/jbc.M110.127167.
- Jackson, A. M., Dewan, P., Anand, I. S., Bělohávek, J., Bengtsson, O., de Boer, R. A., et al. (2020). Dapagliflozin and Diuretic Use in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction in DAPA-HF. *Circulation* 142, 1040–1054. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047077.
- Japp, A. G., Cruden, N. L., Amer, D. A. B., Li, V. K. Y., Goudie, E. B., Johnston, N. R., et al. (2008). Vascular Effects of Apelin In Vivo in Man. *Journal of the American College of Cardiology* 52, 908–913. doi:10.1016/j.jacc.2008.06.013.
- Japp, A. G., Cruden, N. L., Barnes, G., van Gemeren, N., Mathews, J., Adamson, J., et al. (2010). Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation* 121, 1818–1827. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.911339.
- Japp, A. G., and Newby, D. E. (2008). The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 75, 1882–1892. doi:10.1016/j.bcp.2007.12.015.
- Jia, Y. X., Lu, Z. F., Zhang, J., Pan, C. S., Yang, J. H., Zhao, J., et al. (2007). Apelin activates l-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Peptides* 28, 2023–2029. doi:10.1016/j.peptides.2007.07.016.
- Jia, Z. Q., Hou, L., Leger, A., Wu, I., Kudej, A. B., Stefano, J., et al. (2012). Cardiovascular effects of a PEGylated apelin. *Peptides* 38, 181–188. doi:10.1016/j.peptides.2012.09.003.
- John, S., and Thuluvath, P. J. (2015). Hyponatremia in cirrhosis: pathophysiology and management. *World J Gastroenterol* 21, 3197–3205. doi:10.3748/wjg.v21.i11.3197.
- Johnson, A. K., Cunningham, J. T., and Thunhorst, R. L. (1996). Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23, 183–191. doi:10.1111/j.1440-1681.1996.tb02594.x.
- Juhl, C., Els-Heindl, S., Schönauer, R., Redlich, G., Haaf, E., Wunder, F., et al. (2016). Development of Potent and Metabolically Stable APJ Ligands with High Therapeutic Potential. *ChemMedChem* 11, 2378–2384. doi:10.1002/cmdc.201600307.
- Kalra, P. R., Anker, S. D., and Coats, A. J. (2001). Water and sodium regulation in chronic heart failure: the role of natriuretic peptides and vasopressin. *Cardiovasc Res* 51, 495–509. doi:10.1016/s0008-6363(01)00297-8.
- Kang, Y., Kim, J., Anderson, J. P., Wu, J., Gleim, S. R., Kundu, R. K., et al. (2013). Apelin-APJ Signaling Is a Critical Regulator of Endothelial MEF2 Activation in Cardiovascular Development. *Circulation Research* 113, 22–31. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301324.
- Katugampola, S. D., Maguire, J. J., Matthewson, S. R., and Davenport, A. P. (2001). [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br J Pharmacol* 132, 1255–1260. doi:10.1038/sj.bjp.0703939.
- Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., et al. (2001). Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 1538, 162–171. doi:10.1016/s0167-4889(00)00143-9.
- Kido, M., Du, L., Sullivan, C. C., Li, X., Deutsch, R., Jamieson, S. W., et al. (2005). Hypoxia-inducible factor 1- α reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J Am Coll Cardiol* 46, 2116–2124. doi:10.1016/j.jacc.2005.08.045.
- Kim, W. R., Biggins, S. W., Kremers, W. K., Wiesner, R. H., Kamath, P. S., Benson, J. T., et al. (2008). Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *N Engl J Med* 359, 1018–1026. doi:10.1056/NEJMoa0801209.
- Kleinz, M. J., and Baxter, G. F. (2008). Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase. *Regul Pept* 146, 271–277. doi:10.1016/j.regpep.2007.10.002.
- Kleinz, M. J., and Davenport, A. P. (2004). Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regulatory Peptides* 118, 119–125. doi:10.1016/j.regpep.2003.11.002.
- Kleinz, M. J., Skepper, J. N., and Davenport, A. P. (2005). Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept* 126,

- 233–240. doi:10.1016/j.regpep.2004.10.019.
- Koguchi, W., Kobayashi, N., Takeshima, H., Ishikawa, M., Sugiyama, F., and Ishimitsu, T. (2012). Cardioprotective effect of apelin-13 on cardiac performance and remodeling in end-stage heart failure. *Circ J* 76, 137–144. doi:10.1253/circj.cj-11-0689.
- Konstam, M. A., Gheorghiade, M., Burnett, J. C., Grinfeld, L., Maggioni, A. P., Swedberg, K., et al. (2007). Effects of oral tolvaptan in patients hospitalized for worsening heart failure: the EVEREST Outcome Trial. *JAMA* 297, 1319–1331. doi:10.1001/jama.297.12.1319.
- Kovesdy, C. P., Lott, E. H., Lu, J. L., Malakauskas, S. M., Ma, J. Z., Molnar, M. Z., et al. (2012). Hyponatremia, hypernatremia, and mortality in patients with chronic kidney disease with and without congestive heart failure. *Circulation* 125, 677–684. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.065391.
- Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., Arab, S., Chen, M., Maekawa, Y., et al. (2007). Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res* 101, e32–42. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.158659.
- Lacquaniti, A., Chirico, V., Lupica, R., Buemi, A., Loddo, S., Caccamo, C., et al. (2013). Apelin and copeptin: two opposite biomarkers associated with kidney function decline and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Peptides* 49, 1–8. doi:10.1016/j.peptides.2013.08.007.
- Lee, C. R., Watkins, M. L., Patterson, J. H., Gattis, W., O’connor, C. M., Gheorghiade, M., et al. (2003). Vasopressin: a new target for the treatment of heart failure. *Am Heart J* 146, 9–18. doi:10.1016/S0002-8703(02)94708-3.
- Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., et al. (2000). Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 74, 34–41. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x.
- Lee, D. K., Ferguson, S. S. G., George, S. R., and O’Dowd, B. F. (2010). The fate of the internalized apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with beta-arrestin. *Biochem Biophys Res Commun* 395, 185–189. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.151.
- Lee, D. K., Saldivia, V. R., Nguyen, T., Cheng, R., George, S. R., and O’Dowd, B. F. (2005). Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 146, 231–236. doi:10.1210/en.2004-0359.
- Leenen, F. H. H., Wang, H.-W., and Hamlyn, J. M. (2020). Sodium pumps, ouabain and aldosterone in the brain: A neuromodulatory pathway underlying salt-sensitive hypertension and heart failure. *Cell Calcium* 86, 102151. doi:10.1016/j.ceca.2019.102151.
- Li, B., Fang, D., Qian, C., Feng, H., and Wang, Y. (2017). The Efficacy and Safety of Tolvaptan in Patients with Hyponatremia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Clin Drug Investig* 37, 327–342. doi:10.1007/s40261-016-0470-3.
- Li, G., Sun, X., Zhao, D., He, L., Zheng, L., Xue, J., et al. (2016). A promoter polymorphism in APJ gene is significantly associated with blood pressure changes and hypertension risk in Chinese women. *Oncotarget* 7, 86257–86265. doi:10.18632/oncotarget.13370.
- Li, L., Zeng, H., and Chen, J.-X. (2012a). Apelin-13 increases myocardial progenitor cells and improves repair postmyocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303, H605–618. doi:10.1152/ajpheart.00366.2012.
- Li, L., Zeng, H., Hou, X., He, X., and Chen, J.-X. (2013). Myocardial injection of apelin-overexpressing bone marrow cells improves cardiac repair via upregulation of Sirt3 after myocardial infarction. *PLoS One* 8, e71041. doi:10.1371/journal.pone.0071041.
- Li, Y., Chen, J., Bai, B., Du, H., Liu, Y., and Liu, H. (2012b). Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal* 24, 991–1001. doi:10.1016/j.cellsig.2011.12.012.
- Liu, J., Liu, M., and Chen, L. (2017). Novel pathogenesis: regulation of apoptosis by Apelin/APJ system. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 49, 471–478. doi:10.1093/abbs/gmx035.
- Liu, R., Zhao, H., Wang, Y., Wang, Y., Lu, C., Xiao, Y., et al. (2014). The contributory role of angiotensin receptor-like 1 gene multiple polymorphisms in hypertension among northeastern Han Chinese. *PLoS One* 9, e86095. doi:10.1371/journal.pone.0086095.
- Llorens-Cortes, C., and Moos, F. (2012). Apelin and vasopressin: two work better than one. *J.*

- Neuroendocrinol.* 24, 1085–1086. doi:10.1111/j.1365-2826.2012.02316.x.
- Lu, Q., Jiang, Y.-R., Qian, J., and Tao, Y. (2013). Apelin-13 regulates proliferation, migration and survival of retinal Müller cells under hypoxia. *Diabetes Res Clin Pract* 99, 158–167. doi:10.1016/j.diabres.2012.09.045.
- Ludwig, M. (1998). Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J Neuroendocrinol* 10, 881–895. doi:10.1046/j.1365-2826.1998.00279.x.
- Luo, X., Jin, Q., and Wu, Y. (2020). Tolvaptan add-on therapy in patients with acute heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Res Perspect* 8, e00614. doi:10.1002/prp2.614.
- Lv, W., Zhang, L., Cheng, X., Wang, H., Qin, W., Zhou, X., et al. (2020). Apelin Inhibits Angiotensin II-Induced Atrial Fibrosis and Atrial Fibrillation via TGF- β 1/Smad2/ α -SMA Pathway. *Front Physiol* 11, 583570. doi:10.3389/fphys.2020.583570.
- Ma, Y., Yue, Y., Ma, Y., Zhang, Q., Zhou, Q., Song, Y., et al. (2017). Structural Basis for Apelin Control of the Human Apelin Receptor. *Structure* 25, 858-866.e4. doi:10.1016/j.str.2017.04.008.
- Maguire, J. J., Klein, M. J., Pitkin, S. L., and Davenport, A. P. (2009). [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* 54, 598–604. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134619.
- Malhotra, I., Gopinath, S., Janga, K. C., Greenberg, S., Sharma, S. K., and Tarkovsky, R. (2014). Unpredictable nature of tolvaptan in treatment of hypervolemic hyponatremia: case review on role of vaptans. *Case Rep Endocrinol* 2014, 807054. doi:10.1155/2014/807054.
- Manning, M., Lowbridge, J., Haldar, J., and Sawyer, W. H. (1977). Design of neurohypophyseal peptides that exhibit selective agonistic and antagonistic properties. *Fed Proc* 36, 1848–1852.
- Masri, B., Lahlou, H., Mazarguil, H., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2002). Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 539–545. doi:10.1006/bbrc.2001.6230.
- Masri, B., Morin, N., Pedebnarde, L., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2006). The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments. *J Biol Chem* 281, 18317–18326. doi:10.1074/jbc.M600606200.
- McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M., et al. (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 42, 3599–3726. doi:10.1093/eurheartj/ehab368.
- McKinnie, S. M. K., Fischer, C., Tran, K. M. H., Wang, W., Mosquera, F., Oudit, G. Y., et al. (2016). The Metalloprotease Neprilysin Degrades and Inactivates Apelin Peptides. *Chembiochem* 17, 1495–1498. doi:10.1002/cbic.201600244.
- McKinnie, S. M. K., Wang, W., Fischer, C., McDonald, T., Kalin, K. R., Iturrioz, X., et al. (2017). Synthetic Modification within the “RPRL” Region of Apelin Peptides: Impact on Cardiovascular Activity and Stability to Neprilysin and Plasma Degradation. *J. Med. Chem.* 60, 6408–6427. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00723.
- McMurray, J. J. V., Packer, M., Desai, A. S., Gong, J., Lefkowitz, M. P., Rizkala, A. R., et al. (2014). Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 371, 993–1004. doi:10.1056/NEJMoa1409077.
- Medhurst, A. D., Jennings, C. A., Robbins, M. J., Davis, R. P., Ellis, C., Winborn, K. Y., et al. (2003). Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 84, 1162–1172. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01587.x.
- Ménard, J. (2004). The 45-year story of the development of an anti-aldosterone more specific than spironolactone. *Mol Cell Endocrinol* 217, 45–52. doi:10.1016/j.mce.2003.10.008.
- Miyazaki, T., Yamamura, Y., Onogawa, T., Nakamura, S., Kinoshita, S., Nakayama, S., et al. (2005). Therapeutic effects of tolvaptan, a potent, selective nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist, in rats with acute and chronic severe hyponatremia. *Endocrinology* 146, 3037–3043. doi:10.1210/en.2004-1590.
- Morello, J. P., and Bichet, D. G. (2001). Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* 63, 607–630. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.607.

- Morgenthaler, N. G., Struck, J., Jochberger, S., and Dünser, M. W. (2008). Copeptin: clinical use of a new biomarker. *Trends Endocrinol Metab* 19, 43–49. doi:10.1016/j.tem.2007.11.001.
- Mughal, A., and O'Rourke, S. T. (2018). Vascular effects of apelin: Mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 190, 139–147. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.05.013.
- Mughal, A., Sun, C., and O'Rourke, S. T. (2018). Activation of Large Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels by Nitric Oxide Mediates Apelin-Induced Relaxation of Isolated Rat Coronary Arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 366, 265–273. doi:10.1124/jpet.118.248682.
- Müller, T., Kalea, A. Z., Marquez, A., Hsieh, I., Haque, S., Ye, M., et al. (2018). Apelinergic system in the kidney: implications for diabetic kidney disease. *Physiological Reports* 6, e13939. doi:10.14814/phy2.13939.
- Murata, K., Ishida, J., Ishimaru, T., Mizukami, H., Hamada, J., Saito, C., et al. (2016). Lactation Is a Risk Factor of Postpartum Heart Failure in Mice with Cardiomyocyte-specific Apelin Receptor (APJ) Overexpression. *J Biol Chem* 291, 11241–11251. doi:10.1074/jbc.M115.699009.
- Murza, A., Belleville, K., Longpré, J.-M., Sarret, P., and Marsault, É. (2014). Stability and degradation patterns of chemically modified analogs of apelin-13 in plasma and cerebrospinal fluid. *Biopolymers* 102, 297–303. doi:10.1002/bip.22498.
- Murza, A., Besserer-Offroy, É., Côté, J., Bérubé, P., Longpré, J.-M., Dumaine, R., et al. (2015). C-Terminal modifications of apelin-13 significantly change ligand binding, receptor signaling, and hypotensive action. *J Med Chem* 58, 2431–2440. doi:10.1021/jm501916k.
- Murza, A., Sainsily, X., Coquerel, D., Côté, J., Marx, P., Besserer-Offroy, É., et al. (2016). Discovery and Structure-Activity Relationship of a Bioactive Fragment of ELABELA that Modulates Vascular and Cardiac Functions. *J Med Chem* 59, 2962–2972. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01549.
- Murza, A., Sainsily, X., Côté, J., Bruneau-Cossette, L., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.-M., et al. (2017). Structure-activity relationship of novel macrocyclic biased apelin receptor agonists. *Org Biomol Chem* 15, 449–458. doi:10.1039/c6ob02247b.
- Nagano, K., Kwon, C., Ishida, J., Hashimoto, T., Kim, J.-D., Kishikawa, N., et al. (2019). Cooperative action of APJ and α 1A-adrenergic receptor in vascular smooth muscle cells induces vasoconstriction. *J Biochem* 166, 383–392. doi:10.1093/jb/mvz071.
- Nielsen, S., Chou, C. L., Marples, D., Christensen, E. I., Kishore, B. K., and Knepper, M. A. (1995). Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1013–1017. doi:10.1073/pnas.92.4.1013.
- Niu, W., Wu, S., Zhang, Y., Li, W., Ji, K., Gao, P., et al. (2010). Validation of genetic association in apelin-AGTRL1 system with hypertension in a larger Han Chinese population. *J Hypertens* 28, 1854–1861. doi:10.1097/HJH.0b013e32833b1fad.
- Nowzari, Z., Masoumi, M., Nazari-Robati, M., Akbari, H., Shahrokhi, N., and Asadikaram, G. (2018). Association of polymorphisms of leptin, leptin receptor and apelin receptor genes with susceptibility to coronary artery disease and hypertension. *Life Sci* 207, 166–171. doi:10.1016/j.lfs.2018.06.007.
- Nyimanu, D., Kuc, R. E., Williams, T. L., Bednarek, M., Amberly, P., Jermutus, L., et al. (2019). Apelin-36-[L28A] and Apelin-36-[L28C(30kDa-PEG)] peptides that improve diet induced obesity are G protein biased ligands at the apelin receptor. *Peptides* 121, 170139. doi:10.1016/j.peptides.2019.170139.
- O'Carroll, A. M., Selby, T. L., Palkovits, M., and Lolait, S. J. (2000). Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 1492, 72–80. doi:10.1016/s0167-4781(00)00072-5.
- O'Carroll, A.-M., and Lolait, S. J. (2003). Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli. *J Neuroendocrinol* 15, 661–666. doi:10.1046/j.1365-2826.2003.01044.x.
- O'Carroll, A.-M., Salih, S., Griffiths, P. R., Bijabhai, A., Knepper, M. A., and Lolait, S. J. (2017). Expression and functional implications of the renal apelinergic system in rodents. *PLoS One* 12, e0183094. doi:10.1371/journal.pone.0183094.
- O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., et al. (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136,

- 355–360. doi:10.1016/0378-1119(93)90495-o.
- O’Harte, F., Paul, Mary, and Flatt, P., Raymond (2015). Patent: Apelin analogues - WO 2015/165936 A1.
- Oren, R. M. (2005). Hyponatremia in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 95, 2B-7B. doi:10.1016/j.amjcard.2005.03.002.
- Oster, J. R., Preston, R. A., and Materson, B. J. (1994). Fluid and electrolyte disorders in congestive heart failure. *Semin Nephrol* 14, 485–505.
- Ostrowski, N. L., Lolait, S. J., Bradley, D. J., O’Carroll, A. M., Brownstein, M. J., and Young, W. S. (1992). Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology* 131, 533–535. doi:10.1210/endo.131.1.1535312.
- Owen, N. E., Nyimanu, D., Kuc, R. E., Upton, P. D., Morrell, N. W., Alexander, G. J., et al. (2021). Plasma levels of apelin are reduced in patients with liver fibrosis and cirrhosis but are not correlated with circulating levels of bone morphogenetic protein 9 and 10. *Peptides* 136, 170440. doi:10.1016/j.peptides.2020.170440.
- Packer, M., Anker, S. D., Butler, J., Filippatos, G., Pocock, S. J., Carson, P., et al. (2020). Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med* 383, 1413–1424. doi:10.1056/NEJMoa2022190.
- Packer, M., Fowler, M. B., Roecker, E. B., Coats, A. J. S., Katus, H. A., Krum, H., et al. (2002). Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation* 106, 2194–2199. doi:10.1161/01.cir.0000035653.72855.bf.
- Packer, M., Poole-Wilson, P. A., Armstrong, P. W., Cleland, J. G., Horowitz, J. D., Massie, B. M., et al. (1999). Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. ATLAS Study Group. *Circulation* 100, 2312–2318. doi:10.1161/01.cir.100.23.2312.
- Parikh, V. N., Liu, J., Shang, C., Woods, C., Chang, A. C., Zhao, M., et al. (2018). Apelin and APJ orchestrate complex tissue-specific control of cardiomyocyte hypertrophy and contractility in the hypertrophy-heart failure transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315, H348–H356. doi:10.1152/ajpheart.00693.2017.
- Pauli, A., Norris, M. L., Valen, E., Chew, G.-L., Gagnon, J. A., Zimmerman, S., et al. (2014). Toddler: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science* 343, 1248636. doi:10.1126/science.1248636.
- Pchejetski, D., Foussal, C., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Guilbeau-Frugier, C., et al. (2012). Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur Heart J* 33, 2360–2369. doi:10.1093/eurheartj/ehr389.
- Peri, A. (2019). Management of hyponatremia: causes, clinical aspects, differential diagnosis and treatment. *Expert Rev Endocrinol Metab* 14, 13–21. doi:10.1080/17446651.2019.1556095.
- Perjés, Á., Skoumal, R., Tenhunen, O., Kónyi, A., Simon, M., Horváth, I. G., et al. (2014). Apelin increases cardiac contractility via protein kinase C ϵ - and extracellular signal-regulated kinase-dependent mechanisms. *PLoS One* 9, e93473. doi:10.1371/journal.pone.0093473.
- Peyronnet, R., Bollensdorff, C., Capel, R. A., Rog-Zielinska, E. A., Woods, C. E., Charo, D. N., et al. (2017). Load-dependent effects of apelin on murine cardiomyocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 130, 333–343. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2017.09.013.
- Picault, F.-X., Chaves-Almagro, C., Progetti, F., Prats, H., Masri, B., and Audigier, Y. (2014). Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. *Eur J Cancer* 50, 663–674. doi:10.1016/j.ejca.2013.11.017.
- Pisarenko, O. I., Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Serebryakova, L. I., Shulzhenko, V. S., Timoshin, A. A., et al. (2014). Apelin-12 and its structural analog enhance antioxidant defense in experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 391, 241–250. doi:10.1007/s11010-014-2008-4.
- Pitkin, S. L., Maguire, J. J., Kuc, R. E., and Davenport, A. P. (2010). Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man. *Br J Pharmacol* 160, 1785–1795. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00821.x.

- Pitt, B., Zannad, F., Remme, W. J., Cody, R., Castaigne, A., Perez, A., et al. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341, 709–717. doi:10.1056/NEJM199909023411001.
- Pope, G. R., Roberts, E. M., Lolait, S. J., and O’Carroll, A.-M. (2012). Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides* 33, 139–148. doi:10.1016/j.peptides.2011.12.005.
- Poulain, D. A., Wakerley, J. B., and Dyball, R. E. (1977). Electrophysiological differentiation of oxytocin- and vasopressin-secreting neurones. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 196, 367–384. doi:10.1098/rspb.1977.0046.
- Ranieri, M., Tamma, G., Pellegrino, T., Vezzi, V., Ambrosio, C., Grò, C., et al. (2019). Gain-of-function mutations of the V2 vasopressin receptor in nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (NSIAD): a cell-based assay to assess constitutive water reabsorption. *Pflugers Arch* 471, 1291–1304. doi:10.1007/s00424-019-02307-x.
- Rastaldo, R., Cappello, S., Folino, A., Berta, G. N., Sprio, A. E., Losano, G., et al. (2011). Apelin-13 limits infarct size and improves cardiac postischemic mechanical recovery only if given after ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H2308–2315. doi:10.1152/ajpheart.01177.2010.
- Read, C., Fitzpatrick, C. M., Yang, P., Kuc, R. E., Maguire, J. J., Glen, R. C., et al. (2016). Cardiac action of the first G protein biased small molecule apelin agonist. *Biochem Pharmacol* 116, 63–72. doi:10.1016/j.bcp.2016.07.018.
- Read, C., Nyimamu, D., Williams, T. L., Huggins, D. J., Sulentic, P., Macrae, R. G. C., et al. (2019). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVII. Structure and Pharmacology of the Apelin Receptor with a Recommendation that Elabela/Toddler Is a Second Endogenous Peptide Ligand. *Pharmacol Rev* 71, 467–502. doi:10.1124/pr.119.017533.
- Reaux, A., De Mota, N., Skultetyova, I., Lenkei, Z., El Messari, S., Gallatz, K., et al. (2001). Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.* 77, 1085–1096.
- Reaux, A., Gallatz, K., Palkovits, M., and Llorens-Cortes, C. (2002). Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 113, 653–662.
- Reaux-Le Goazigo, A., Morinville, A., Burlet, A., Llorens-Cortes, C., and Beaudet, A. (2004). Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* 145, 4392–4400. doi:10.1210/en.2004-0384.
- Ripoll, E., Pluvinet, R., Torras, J., Olivar, R., Vidal, A., Franquesa, M., et al. (2011). In vivo therapeutic efficacy of intra-renal CD40 silencing in a model of humoral acute rejection. *Gene Ther* 18, 945–952. doi:10.1038/gt.2011.39.
- Roberts, E. M., Pope, G. R., Newson, M. J. F., Landgraf, R., Lolait, S. J., and O’Carroll, A.-M. (2010). Stimulus-specific neuroendocrine responses to osmotic challenges in apelin receptor knockout mice. *J Neuroendocrinol* 22, 301–308. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.01968.x.
- Rochdi, M. D., Vargas, G. A., Carpentier, E., Oligny-Longpré, G., Chen, S., Kovoov, A., et al. (2010). Functional characterization of vasopressin type 2 receptor substitutions (R137H/C/L) leading to nephrogenic diabetes insipidus and nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: implications for treatments. *Mol Pharmacol* 77, 836–845. doi:10.1124/mol.109.061804.
- Ronkainen, V.-P., Ronkainen, J. J., Hänninen, S. L., Leskinen, H., Ruas, J. L., Pereira, T., et al. (2007). Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J* 21, 1821–1830. doi:10.1096/fj.06-7294com.
- Roth, G. A., Forouzanfar, M. H., Moran, A. E., Barber, R., Nguyen, G., Feigin, V. L., et al. (2015). Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *N Engl J Med* 372, 1333–1341. doi:10.1056/NEJMoa1406656.
- Sainsily, X., Coquerel, D., Giguère, H., Dumont, L., Tran, K., Noll, C., et al. (2021). Elabela Protects Spontaneously Hypertensive Rats From Hypertension and Cardiorenal Dysfunctions Exacerbated by Dietary High-Salt Intake. *Front Pharmacol* 12, 709467. doi:10.3389/fphar.2021.709467.
- Salcedo, A., Garijo, J., Monge, L., Fernández, N., Luis García-Villalón, A., Sánchez Turrión, V., et al. (2007). Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids. *Regul Pept* 144, 50–55.

doi:10.1016/j.regpep.2007.06.005.

- Sands, J. M., Naruse, M., Baum, M., Jo, I., Hebert, S. C., Brown, E. M., et al. (1997). Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* 99, 1399–1405. doi:10.1172/JCI119299.
- Savarese, G., and Lund, L. H. (2017). Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev* 3, 7–11. doi:10.15420/cfr.2016:25:2.
- Schrier, R. W., Gross, P., Gheorghide, M., Berl, T., Verbalis, J. G., Czerwiec, F. S., et al. (2006). Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2-receptor antagonist, for hyponatremia. *N Engl J Med* 355, 2099–2112. doi:10.1056/NEJMoa065181.
- Scimia, M. C., Hurtado, C., Ray, S., Metzler, S., Wei, K., Wang, J., et al. (2012). APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature* 488, 394–398. doi:10.1038/nature11263.
- Sen, J., Chung, E., and McGill, D. (2018). Tolvaptan for Heart Failure in Chronic Kidney Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Heart Lung Circ* 27, 928–939. doi:10.1016/j.hlc.2017.12.013.
- Seo, K., Parikh, V. N., and Ashley, E. A. (2020). Stretch-Induced Biased Signaling in Angiotensin II Type 1 and Apelin Receptors for the Mediation of Cardiac Contractility and Hypertrophy. *Front Physiol* 11, 181. doi:10.3389/fphys.2020.00181.
- Shin, K., Pandey, A., Liu, X.-Q., Anini, Y., and Rainey, J. K. (2013). Preferential apelin-13 production by the proprotein convertase PCSK3 is implicated in obesity. *FEBS Open Bio* 3, 328–333. doi:10.1016/j.fob.2013.08.001.
- Siddiquee, K., Hampton, J., McAnally, D., May, L., and Smith, L. (2013). The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br J Pharmacol* 168, 1104–1117. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02192.x.
- Simpkin, J. C., Yellon, D. M., Davidson, S. M., Lim, S. Y., Wynne, A. M., and Smith, C. C. T. (2007). Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 102, 518–528. doi:10.1007/s00395-007-0671-2.
- Soulet, F., Bodineau, C., Hooks, K. B., Descarpentrie, J., Alves, I., Dubreuil, M., et al. (2020). ELA/APELA precursor cleaved by furin displays tumor suppressor function in renal cell carcinoma through mTORC1 activation. *JCI Insight* 5. doi:10.1172/jci.insight.129070.
- Sun, X., Iida, S., Yoshikawa, A., Senbonmatsu, R., Imanaka, K., Maruyama, K., et al. (2011). Non-activated APJ suppresses the angiotensin II type 1 receptor, whereas apelin-activated APJ acts conversely. *Hypertens Res* 34, 701–706. doi:10.1038/hr.2011.19.
- Swedberg, K., Komajda, M., Böhm, M., Borer, J., Robertson, M., Tavazzi, L., et al. (2012). Effects on outcomes of heart rate reduction by ivabradine in patients with congestive heart failure: is there an influence of beta-blocker dose?: findings from the SHIFT (Systolic Heart failure treatment with the I(f) inhibitor ivabradine Trial) study. *J Am Coll Cardiol* 59, 1938–1945. doi:10.1016/j.jacc.2012.01.020.
- Szokodi, I., Tavi, P., Földes, G., Voutilainen-Myllylä, S., Ilves, M., Tokola, H., et al. (2002). Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ. Res.* 91, 434–440.
- Tao, J., Zhu, W., Li, Y., Xin, P., Li, J., Liu, M., et al. (2011). Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H1471-1486. doi:10.1152/ajpheart.00097.2011.
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M. X., et al. (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 471–476. doi:10.1006/bbrc.1998.9489.
- Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M.-X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., et al. (2001). The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regulatory Peptides* 99, 87–92. doi:10.1016/S0167-0115(01)00236-1.
- Teerlink, J. R., Diaz, R., Felker, G. M., McMurray, J. J. V., Metra, M., Solomon, S. D., et al. (2021). Cardiac Myosin Activation with Omecamtiv Mecarbil in Systolic Heart Failure. *N Engl J Med* 384, 105–116. doi:10.1056/NEJMoa2025797.
- Terada, Y., Tomita, K., Nonoguchi, H., Yang, T., and Marumo, F. (1993). Different localization and regulation

- of two types of vasopressin receptor messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 92, 2339–2345. doi:10.1172/JCI116838.
- Tham, Y. K., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Weeks, K. L., and McMullen, J. R. (2015). Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* 89, 1401–1438. doi:10.1007/s00204-015-1477-x.
- Trân, K., Murza, A., Sainsily, X., Coquerel, D., Côté, J., Belleville, K., et al. (2018). A Systematic Exploration of Macrocyclization in Apelin-13: Impact on Binding, Signaling, Stability, and Cardiovascular Effects. *J Med Chem* 61, 2266–2277. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01353.
- Trân, K., Van Den Hauwe, R., Sainsily, X., Couvineau, P., Côté, J., Simard, L., et al. (2021). Constraining the Side Chain of C-Terminal Amino Acids in Apelin-13 Greatly Increases Affinity, Modulates Signaling, and Improves the Pharmacokinetic Profile. *J. Med. Chem.* 64, 5345–5364. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01941.
- Tzoulis, P., Waung, J. A., Bagkeris, E., Carr, H., Khoo, B., Cohen, M., et al. (2016). Real-life experience of tolvaptan use in the treatment of severe hyponatraemia due to syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion. *Clin Endocrinol (Oxf)* 84, 620–626. doi:10.1111/cen.12943.
- Uretsky, B. F., Verbalis, J. G., Generalovich, T., Valdes, A., and Reddy, P. S. (1985). Plasma vasopressin response to osmotic and hemodynamic stimuli in heart failure. *Am J Physiol* 248, H396–402. doi:10.1152/ajpheart.1985.248.3.H396.
- Ustunel, I., Acar, N., Gemici, B., Ozbey, O., Edizer, I., Soyulu, H., et al. (2014). The effects of water immersion and restraint stress on the expressions of apelin, apelin receptor (APJR) and apoptosis rate in the rat heart. *Acta Histochem* 116, 675–681. doi:10.1016/j.acthis.2013.12.004.
- van Riet, E. E. S., Hoes, A. W., Limburg, A., Landman, M. A. J., van der Hoeven, H., and Rutten, F. H. (2014). Prevalence of unrecognized heart failure in older persons with shortness of breath on exertion. *Eur J Heart Fail* 16, 772–777. doi:10.1002/ejhf.110.
- van Riet, E. E. S., Hoes, A. W., Wagenaar, K. P., Limburg, A., Landman, M. A. J., and Rutten, F. H. (2016). Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *Eur J Heart Fail* 18, 242–252. doi:10.1002/ejhf.483.
- Verbalis, J. G. (2019). Euvolemic Hyponatremia Secondary to the Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *Front Horm Res* 52, 61–79. doi:10.1159/000493238.
- Verbalis, J. G., Goldsmith, S. R., Greenberg, A., Korzelius, C., Schrier, R. W., Sterns, R. H., et al. (2013). Diagnosis, evaluation, and treatment of hyponatremia: expert panel recommendations. *Am J Med* 126, S1–42. doi:10.1016/j.amjmed.2013.07.006.
- Verbrugge, F. H., Steels, P., Grieten, L., Nijst, P., Tang, W. H. W., and Mullens, W. (2015). Hyponatremia in acute decompensated heart failure: depletion versus dilution. *J Am Coll Cardiol* 65, 480–492. doi:10.1016/j.jacc.2014.12.010.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., et al. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 277, 14838–14843. doi:10.1074/jbc.M200581200.
- Waikar, S. S., Mount, D. B., and Curhan, G. C. (2009). Mortality after hospitalization with mild, moderate, and severe hyponatremia. *Am J Med* 122, 857–865. doi:10.1016/j.amjmed.2009.01.027.
- Wang, C., Du, J.-F., Wu, F., and Wang, H.-C. (2008). Apelin decreases the SR Ca²⁺ content but enhances the amplitude of [Ca²⁺]_i transient and contractions during twitches in isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2540–2546. doi:10.1152/ajpheart.00046.2008.
- Wang, M., Gupta, R. C., Rastogi, S., Kohli, S., Sabbah, M. S., Zhang, K., et al. (2013a). Effects of acute intravenous infusion of apelin on left ventricular function in dogs with advanced heart failure. *J Card Fail* 19, 509–516. doi:10.1016/j.cardfail.2013.05.004.
- Wang, T., Liu, C., Jia, L., and Ding, J. (2019). The association between apelin polymorphisms and hypertension in China: A meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 20, 1470320319827204. doi:10.1177/1470320319827204.
- Wang, W., McKinnie, S. M. K., Farhan, M., Paul, M., McDonald, T., McLean, B., et al. (2016). Angiotensin-

- Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: Physiological Effects in the Cardiovascular System. *Hypertension* 68, 365–377. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06892.
- Wang, W., McKinnie, S. M. K., Patel, V. B., Haddad, G., Wang, Z., Zhabyeyev, P., et al. (2013b). Loss of Apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic Apelin analogues. *J Am Heart Assoc* 2, e000249. doi:10.1161/JAHA.113.000249.
- Wu, X.-D., Zhang, N., Liang, M., Liu, W.-L., Lin, B.-B., Xiao, Y.-R., et al. (2018). Gender-specific association between Apelin/APJ gene polymorphisms and hypertension risk in Southeast China. *Gene* 669, 63–68. doi:10.1016/j.gene.2018.05.079.
- Xie, H., Luo, G., Zheng, Y., Hu, D., Peng, F., and Xie, L. (2017). Lowered circulating apelin is significantly associated with an increased risk for hypertension: A meta-analysis. *Clin Exp Hypertens* 39, 435–440. doi:10.1080/10641963.2016.1267199.
- Xu, C., Wang, F., Chen, Y., Xie, S., Sng, D., Reversade, B., et al. (2020). ELABELA antagonizes intrarenal renin-angiotensin system to lower blood pressure and protects against renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 318, F1122–F1135. doi:10.1152/ajprenal.00606.2019.
- Yang, P., Kuc, R. E., Brame, A. L., Dyson, A., Singer, M., Glen, R. C., et al. (2017a). [Pyr1]Apelin-13(1-12) Is a Biologically Active ACE2 Metabolite of the Endogenous Cardiovascular Peptide [Pyr1]Apelin-13. *Front Neurosci* 11, 92. doi:10.3389/fnins.2017.00092.
- Yang, P., Read, C., Kuc, R. E., Buonincontri, G., Southwood, M., Torella, R., et al. (2017b). Elabela/Toddler Is an Endogenous Agonist of the Apelin APJ Receptor in the Adult Cardiovascular System, and Exogenous Administration of the Peptide Compensates for the Downregulation of Its Expression in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 135, 1160–1173. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023218.
- Yoshikawa, M., Asaba, K., and Nakayama, T. (2020). The APLNR gene polymorphism rs7119375 is associated with an increased risk of development of essential hypertension in the Chinese population. *Medicine (Baltimore)* 99, e22418. doi:10.1097/MD.00000000000022418.
- Zannad, F., McMurray, J. J. V., Krum, H., van Veldhuisen, D. J., Swedberg, K., Shi, H., et al. (2011). Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 364, 11–21. doi:10.1056/NEJMoa1009492.
- Zeng, H., He, X., Hou, X., Li, L., and Chen, J.-X. (2014). Apelin gene therapy increases myocardial vascular density and ameliorates diabetic cardiomyopathy via upregulation of sirtuin 3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H585–597. doi:10.1152/ajpheart.00821.2013.
- Zeng, X. J., Zhang, L. K., Wang, H. X., Lu, L. Q., Ma, L. Q., and Tang, C. S. (2009). Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides* 30, 1144–1152. doi:10.1016/j.peptides.2009.02.010.
- Zeng, X., Yu, S. P., Taylor, T., Ogle, M., and Wei, L. (2012). Protective effect of apelin on cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells against apoptosis. *Stem Cell Res* 8, 357–367. doi:10.1016/j.scr.2011.12.004.
- Zhang, J., Ren, C. X., Qi, Y. F., Lou, L. X., Chen, L., Zhang, L. K., et al. (2006). Exercise training promotes expression of apelin and APJ of cardiovascular tissues in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 1153.
- Zhang, Z., Yu, B., and Tao, G. (2009). Apelin protects against cardiomyocyte apoptosis induced by glucose deprivation. *Chin Med J (Engl)* 122, 2360–2365.
- Zhong, J.-C., Yu, X.-Y., Huang, Y., Yung, L.-M., Lau, C.-W., and Lin, S.-G. (2007). Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 74, 388–395. doi:10.1016/j.cardiores.2007.02.002.
- Zhong, S., Guo, H., Wang, H., Xing, D., Lu, T., Yang, J., et al. (2020). Apelin-13 alleviated cardiac fibrosis via inhibiting the PI3K/Akt pathway to attenuate oxidative stress in rats with myocardial infarction-induced heart failure. *Biosci Rep* 40, BSR20200040. doi:10.1042/BSR20200040.
- Zhou, N., Fan, X., Mukhtar, M., Fang, J., Patel, C. A., DuBois, G. C., et al. (2003a). Cell-cell fusion and internalization of the CNS-based, HIV-1 co-receptor, APJ. *Virology* 307, 22–36. doi:10.1016/s0042-6822(02)00021-1.

- Zhou, N., Zhang, X., Fan, X., Argyris, E., Fang, J., Acheampong, E., et al. (2003b). The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology* 317, 84–94. doi:10.1016/j.virol.2003.08.026.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11968–11973. doi:10.1073/pnas.93.21.11968.
- Zsarnovszky, A., and Belcher, S. M. (2004). Spatial, temporal, and cellular distribution of the activated extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in the developing and mature rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 150, 199–209. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.03.012.

**ANNEXE I: ARTICLE “LIT01-196, A
METABOLICALLY STABLE APELIN-17 ANALOG,
NORMALIZES BLOOD PRESSURE IN
HYPERTENSIVE DOCA-SALT RATS *VIA* A NO
SYNTHASE-DEPENDENT MECHANISM”**



LIT01-196, a Metabolically Stable Apelin-17 Analog, Normalizes Blood Pressure in Hypertensive DOCA-Salt Rats *via* a NO Synthase-dependent Mechanism

Adrien Flahault¹, Mathilde Keck¹, Pierre-Emmanuel Girault-Sotias¹, Lucie Esteouille², Nadia De Mota¹, Dominique Bonnet² and Catherine Llorens-Cortes^{1*}

¹College de France, Laboratory of Central Neuropeptides in the Regulation of Body Fluid Homeostasis and Cardiovascular Functions, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), INSERM U1050/CNRS UMR7241, Paris, France, ²Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR7200 CNRS/Université de Strasbourg, Labex MEDALIS, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Concepción Peiró,
Autonomous University of Madrid,
Spain

Reviewed by:

Javier Angulo,
Ramón y Cajal University Hospital,
Spain
Srinivas Srinamula,
The Brody School of Medicine at East
Carolina University, United States

*Correspondence:

Catherine Llorens-Cortes
c.llorens-cortes@college-de-
france.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cardiovascular and Smooth Muscle
Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 26 May 2021

Accepted: 13 July 2021

Published: 26 July 2021

Citation:

Flahault A, Keck M, Girault-Sotias P-E, Esteouille L, De Mota N, Bonnet D and Llorens-Cortes C (2021) LIT01-196, a Metabolically Stable Apelin-17 Analog, Normalizes Blood Pressure in Hypertensive DOCA-Salt Rats *via* a NO Synthase-dependent Mechanism. *Front. Pharmacol.* 12:715095. doi: 10.3389/fphar.2021.715095

Apelin is a neuro-vasoactive peptide that plays a major role in the control of cardiovascular functions and water balance, but has an *in-vivo* half-life in the minute range, limiting its therapeutic use. We previously developed LIT01-196, a systemically active metabolically stable apelin-17 analog, produced by chemical addition of a fluorocarbon chain to the N-terminal part of apelin-17. LIT01-196 behaves as a potent full agonist for the apelin receptor and has an *in vivo* half-life in the bloodstream of 28 min after intravenous (i.v.) and 156 min after subcutaneous (s.c.) administrations in conscious normotensive rats. We aimed to investigate the effects of LIT01-196 following systemic administrations on arterial blood pressure, heart rate, fluid balance and electrolytes in conscious normotensive and hypertensive deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt rats. Acute i.v. LIT01-196 administration, in increasing doses, dose-dependently decreases arterial blood pressure with ED₅₀ values of 9.8 and 3.1 nmol/kg in normotensive and hypertensive rats, respectively. This effect occurs for both via a nitric oxide-dependent mechanism. Moreover, acute s.c. LIT01-196 administration (90 nmol/kg) normalizes arterial blood pressure in conscious hypertensive DOCA-salt rats for more than 7 h. The LIT01-196-induced blood pressure decrease remains unchanged after 4 consecutive daily s.c. administrations of 90 nmol/kg, and does not induce any alteration of plasma sodium and potassium levels and kidney function as shown by the lack of change in plasma creatinine and urea nitrogen levels. Activating the apelin receptor with LIT01-196 may constitute a novel approach for the treatment of hypertension.

Keywords: apelin, metabolically stable apelin analogs, APJ receptor, hypertension, DOCA-salt hypertensive rats

Abbreviations: ACE2, angiotensin converting enzyme 2; ApelinR, apelin receptor; AVP, arginine-vasopressin; BP, blood pressure; DOCA, deoxycorticosterone acetate; HR, heart rate; K17F, apelin-17; L-NAME, N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester; MABP, mean arterial blood pressure; NO, nitric oxide; pE13F, pyroglutamyl form of apelin-13; RAS, renin-angiotensin system; SD, Sprague-Dawley; WKY, Wistar-Kyoto.

INTRODUCTION

Hypertension is a major risk factor for cardiovascular diseases, with a prevalence of 37.2% (Brouwers et al., 2021). Optimal blood pressure (BP) control is difficult to achieve, and BP remains uncontrolled in 70% of patients treated for hypertension in the world (Walli-Attaei et al., 2020). The development of new therapeutic agents acting on new targets via different modes of action is therefore required to improve BP control.

Apelin is a (neuro)-vasoactive peptide first identified as the endogenous ligand of the human orphan APJ receptor (O'Dowd et al., 1993), a seven-transmembrane domain G-protein coupled receptor (GPCR) that has been renamed the apelin receptor (ApelinR) (O'Dowd et al., 1993; Tatemoto et al., 1998). Apelin is derived from preproapelin, a 77-aminoacid precursor, the last C-terminal 17 aminoacids (corresponding to apelin-17 or K17F) which are strictly conserved in all mammalian species studied. K17F is identified in plasma and tissues *in vivo* (Azizi et al., 2008). Apelin and its receptor are present in the brain, heart, kidney, and blood vessels (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2001, 2002).

Apelin has an aquaretic effect, through both the central inhibition of arginine-vasopressin (AVP) release from the posterior pituitary into the bloodstream (De Mota et al., 2004), and the renal blockade of the AVP antidiuretic effect (Hus-Citharel et al., 2008; Hus-Citharel et al., 2014; Flahault et al., 2017). Finally, apelin has vasorelaxant properties. Intravenous (i.v.) administrations of apelin decreases arterial BP via a nitric oxide (NO)-dependent mechanism in anesthetized normotensive rats (Reaux et al., 2001; Tatemoto et al., 2001; El Messari et al., 2004), and cause a NO-dependent arterial vasodilation *in vivo* in man (Japp et al., 2008). A meta-analysis (Xie et al., 2017) has reported lower plasma apelin concentrations in patients with hypertension. Given the BP-lowering effect of apelin, targeting the ApelinR may constitute a potential approach for the treatment of hypertension.

The *in vivo* half-life of K17F in the rat blood circulation is 50 s following i.v. administration (Flahault et al., 2021), accounting for the short-lasting (about 2 min) and modest (-12.8 mmHg for 3 nmol/kg) effect of i.v. K17F on BP in anesthetized normotensive rats (El Messari et al., 2004), which limits its use as therapeutic agent. We developed a metabolically stable K17F analog, LIT01-196, by the original chemical addition of a fluorocarbon chain to the N-terminal part of K17F (Gerbier et al., 2017). This chemical modification increased the *in vivo* half-life of LIT01-196 in the bloodstream to 28 min after i.v. and 156 min after subcutaneous (s.c.) administrations in conscious rats (Flahault et al., 2021) without altering its pharmacological properties in terms of the affinity for the ApelinR, inhibition of cAMP production, ApelinR internalization, β -arrestin-2 recruitment and ERK phosphorylation (Gerbier et al., 2017). Like K17F, LIT01-196 induced a NO-dependent vasorelaxation of rat aorta pre-contracted with norepinephrine and rat glomerular arterioles pre-contracted with angiotensin II (Gerbier et al., 2017).

Together, this suggests that sustained activation of the ApelinR with LIT01-196 may constitute a potential new approach to decrease high BP in experimental models of hypertension. In agreement with this hypothesis, low apelin expression in

hypertensive deoxycorticosterone acetate (DOCA) -salt rats (Zhang et al., 2006; Akcilar et al., 2013) and hypertensive patients (Xie et al., 2017) has been reported. Moreover, whether ApelinR activation still induces a NO-dependent arterial BP decrease in case of salt-dependent hypertension, remains to be determined. With this aim, we studied the effects of LIT01-196 on arterial BP, heart rate (HR), fluid balance and electrolytes, following i.v. and s.c. administrations in conscious normotensive (Sprague-Dawley, SD and Wistar-Kyoto, WKY) and hypertensive DOCA-salt rats, a salt- and volume-dependent model of hypertension, with low plasma renin levels, resistant to treatment with systemic renin-angiotensin system (RAS) blockers and exhibiting low NO-synthase activity (Lee et al., 1999; Basting and Lazartigues, 2017).

MATERIALS AND METHODS

Drugs, Antibodies and Reagents

K17F was synthesized by GL Biochem (Shanghai, China). LIT01-196 (300 mg) was synthesized by the *Laboratoire d'Innovation Thérapeutique* (CNRS UMR7200, Illkirch, France), as previously described (Gerbier et al., 2017). [125 I]-pE13F (monoiodinated on Lys⁸ with Bolton-Hunter reagent, 2,200 Ci/mmol) was purchased from PerkinElmer (Wellesley, MA, United States). DOCA pellets (50 mg, 21-days release) were obtained from Innovative Research of America (Sarasota, FL, United States). Sodium heparinate, lithium heparinate, EDTA and N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were obtained from SIGMA-ALDRICH (Saint-Quentin Fallavier, France). Rabbit polyclonal antibodies directed against the apelin fragment K17F were produced in the laboratory, as previously described (Reaux et al., 2001).

Animals

Hypertensive DOCA-salt rats were obtained as follows: male WKY (250–300 g, 8 weeks of age) rats underwent unilateral nephrectomy under isoflurane anesthesia (Isovet[®], 3% for induction, 1–2% for maintenance anesthesia) and were implanted with a s.c. DOCA pellet (50 mg, 21-days release) in the rodent surgical facility of Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). They were given free access to normal chow and water supplemented with 0.9% NaCl and 0.2% KCl, and were shipped to our animal facility 1 week later. Hypertension occurred after 2 weeks.

Normotensive male and female SD (250–300 g) and male WKY rats (250–300 g) were also obtained from Charles River Laboratories and were given free access to normal chow and water.

Animals were maintained under a 12 h light/12 h dark cycle. All experiments were carried out in accordance with current international guidelines for the care and use of experimental animals, and the experimental protocols were approved by the national animal ethics committee (CEEA, reference numbers 01966.02, 01962.02 and 2016-10#3672). All experiments

involving animals took place in the animal facility of the Collège de France, Paris, France.

Drug Administration, BP and HR Measurements

Rats were anesthetized with isoflurane (Isovet[®], 3% for induction, 1–2% for maintenance), and they were pain relieved with lidocaine (Laocaïne[®], 4 mg/kg, s.c. injection). They were implanted with a right femoral artery catheter (0.011" × .024" .0065") and, for i. v. injection, with a right femoral venous catheter (0.023" × .038" × .0075"), which were passed beneath the skin under isoflurane anesthesia. BP was recorded in conscious unrestrained animals after a recovery period of at least 24 h, with a PowerLab/Labchart system (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) connected to the arterial catheter via a pressure transducer. Mean arterial BP (MABP) and HR were calculated from the arterial pressure signal (Reaux et al., 1999). The compound was administered i.v. or s.c. (1 ml/kg in NaCl 0.9%) after baseline BP recording for at least 30 min. BP was measured for at least 2 h after drug administration (longer if no return to baseline values was observed). When appropriate, BP was measured again 24 h after administration. At the end of the experiment, animals were killed with a lethal dose of pentobarbital (Dolethal[®], 150 mg/kg). Animals were randomly assigned to treatment groups. It was specified before the study that hypertensive DOCA-salt animals were excluded in case baseline MABP was lower than 150 mmHg.

NO-Synthase Inhibition

To determine the effect of NO synthase inhibition on LIT01-196 hypotensive effect, we recorded BP following i.v. administration of L-NAME, a NO synthase inhibitor, at the dose of 30 mg/kg (111 μmol/kg), either together with or 10 min after the administration of LIT01-196, both in normotensive and hypertensive DOCA-salt rats, after a stabilization period of at least 30 min.

Angiotensin Converting Enzyme 2 Enzymatic Activity Measurement

ACE2 enzymatic activity was determined on cardiac homogenates and the fluorogenic substrate (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Mca-Ala-Pro-Lys (2,4-dinitrophenyl) (Dnp)-OH (Mca-APK(Dnp)), as previously described (Pedersen et al., 2011; Ye et al., 2012). The rats received saline or LIT01-196 (90 nmol/kg, s. c. for 4 days), under a volume of 250 μl. We used five rats for each set of conditions. After sacrifice of the animals by decapitation, hearts were removed without the atria, rinsed in cold saline, frozen in liquid nitrogen and then stored at –80°C. The hearts were then thawed in 6 ml of cold ACE2 buffer (50 mM 4-morpholineethanesulfonic acid, 300 mM NaCl, 10 μM ZnCl₂, and 0.01% Triton-X-100, pH 6.5) and homogenized by sonication. Aliquots of the heart homogenates (20 μl) were added to wells containing 10 μM Mca-APK(Dnp) (10 μl), in the presence or absence of 1 μM MLN4760, a specific and selective ACE2 inhibitor (10 μl) in a total volume of 100 μl ACE2 buffer. Plates

were incubated for 30 min at 37°C and subjected to repeated reading with the Victor Nivo multilabel reader (PerkinElmer), with fluorescence emission at 405 nm and excitation at 320 nm. To estimate the specific ACE2 activity, the arbitrary fluorescence units from the assay with MLN4760 was subtracted from the fluorescence units without the inhibitor. The activities were expressed in RFU per μg protein per min."

Apelin Radioimmunoassay

Trunk blood was collected after decapitation of the animal on ice (50 μl of 0.3 M EDTA (pH 7.4) for 1 ml of blood). Plasma samples (0.5 ml) were acidified with 0.175 ml of 3 M HCl and stored at –80°C until apelin RIA. After thawing the sample on ice, 0.05% BSA was added and the samples were centrifuged at 20,000 × g and 4°C for 10 min. The supernatants were collected and the pH was adjusted to 6.5 with 10 M NaOH and 2 M Tris-HCl buffer (pH 7.4). Apelin was extracted from plasma by mixing 0.3 ml of the supernatant with 0.3 ml of 1% trifluoroacetic acid (TFA)—0.1% BSA, and loading it onto a Sep-Pak C18 cartridge (Waters, Massachusetts, United States) previously washed with 2 ml 100% acetonitrile and equilibrated with 5 ml 1% TFA—0.1% BSA. The columns then were washed with 3 ml 1% TFA - 0.1% BSA and apelin was eluted with 1.5 ml 100% acetonitrile. The samples were dried and dissolved in 0.32 ml of RIA buffer (19 mM NaH₂PO₄ ·H₂O, 81 mM Na₂HPO₄ ·2H₂O, 50 mM NaCl, 0.1% TritonX-100, 0.01% NaN₃, 0.1% BSA).

Plasma apelin levels were determined by RIA on 0.1 ml of plasma, with a polyclonal K17F antiserum (0.05 ml at a dilution of 1:4,500) and ¹²⁵I-labeled pE13F (iodinated on Lys⁸ by the Bolton and Hunter method, 2,200 Ci/mmol, Perkin-Elmer, Waltham, MA; 0.05 ml, 19,000 dpm) as a tracer, incubated at 4°C overnight. Samples were mixed with ¹²⁵I-labeled pE13F and polyclonal K17F antiserum (dilution: 1: 4,500) to give a total volume of 0.2 ml, and were incubated at 4°C overnight. We then added 0.5 ml of Amerlex (Amersham RPN 510), and the resulting mixture was incubated for 10 min at room temperature. The tubes were centrifuged at 2,600 × g at 4°C for 20 min. The supernatant was removed and the radioactivity of the precipitates was measured. We assessed the cross-reactivity of the apelin antiserum with various N- and C-terminally truncated fragments of K17F and several other bioactive peptides. K17F (200% cross-reactivity), the pyroglutamyl form of apelin-13 (pE13F) and apelin-36 (100% cross-reactivity) were well recognized by the antiserum, whereas the removal of the phenylalanine residue at the extreme end of the C-terminus of K17F (forming K16P) decreased recognition to barely detectable levels (<0.3% cross-reactivity). Negligible cross-reactivity was observed for angiotensin II, angiotensin III, neuropeptide Y and AVP. This antiserum identified the apelin present in the plasma of rodents as pE13F and, to a lesser extent, K17F (De Mota et al., 2004). Most of the apelin in human plasma was K17F, followed by pE13F, and, to a lesser extent, apelin-36 (Azizi et al., 2008).

Metabolic Studies

For metabolic studies, animals were individually housed in metabolic cages (Techniplast). After acclimatization over a

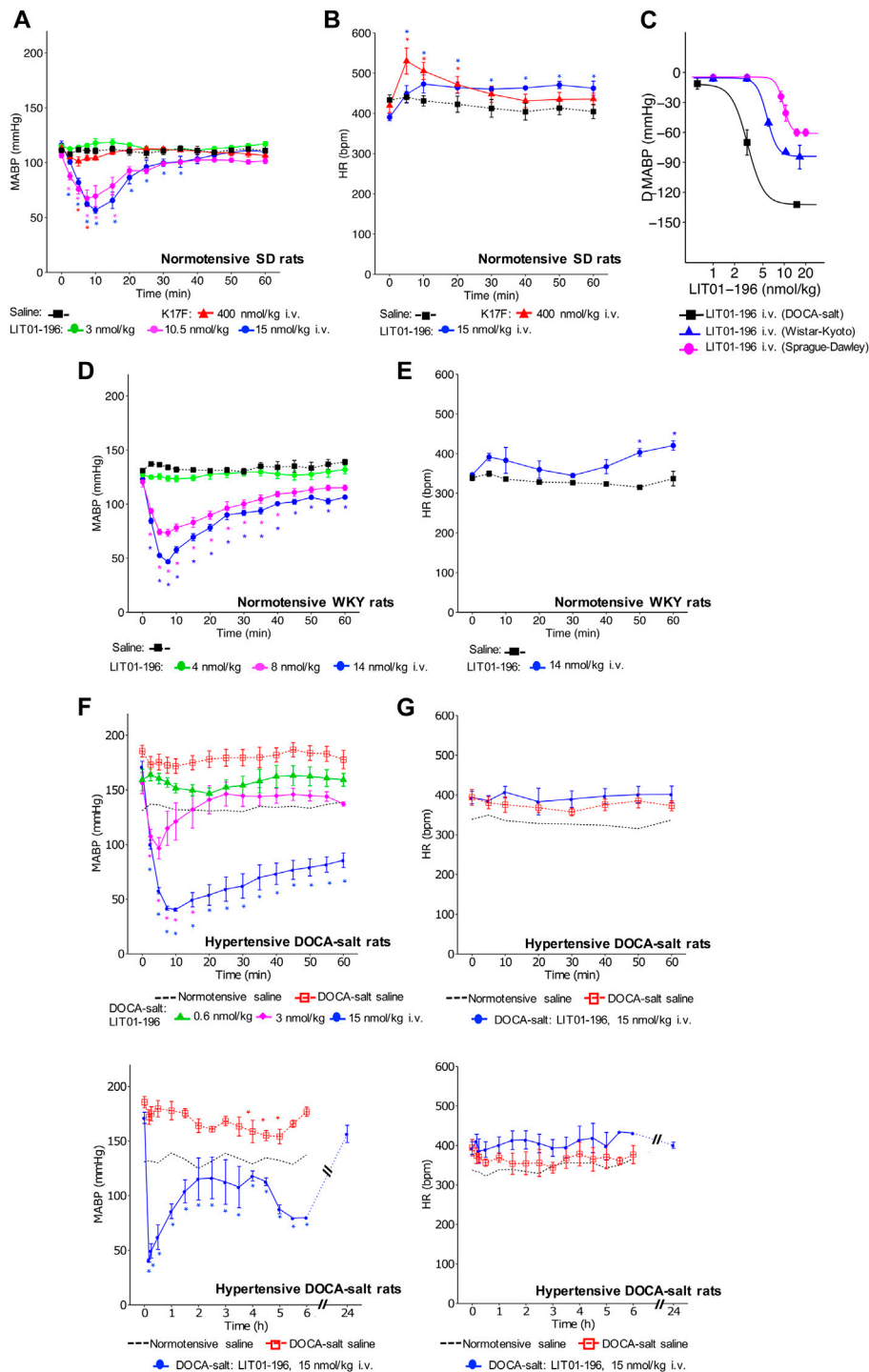


FIGURE 1 | Hemodynamic effects of the intravenous administration of apelin-17 (K17F) or LIT01-196 in conscious normotensive and hypertensive DOCA-salt rats. Effects of the i.v. administration of saline, K17F (400 nmol/kg) or LIT01-196 (3, 10.5, and 15 nmol/kg) in conscious normotensive SD rats on **(A)** MABP and **(B)** HR recorded for 1 h and respectively expressed in millimeters of mercury (mmHg) and beats per minute (bpm). **(C)** Dose-response curve of LIT01-196 administered by the i. v. route, for MABP changes in conscious normotensive SD, WKY and hypertensive DOCA-salt rats. Effects of the i.v. administration of saline, or LIT01-196 (4, 8, and 14 nmol/kg) in conscious normotensive WKY rats on **(D)** MABP and **(E)** HR recorded for 1 h and respectively expressed in mmHg and bpm. **(F)** MABP and **(G)** HR recorded for 1 h after i. v. administration of saline into conscious normotensive WKY and hypertensive DOCA-salt rats or LIT01-196 (0.6, 3, and 15 nmol/kg) into conscious hypertensive DOCA-salt rats. **(H)** MABP and **(I)** HR recorded for 6 and 24 h after i. v. administration of saline into conscious normotensive WKY and hypertensive DOCA-salt rats or LIT01-196 (15 nmol/kg) into conscious hypertensive DOCA-salt rats. Comparisons of repeated measurements in linear mixed-effects models followed by Dunn's test with Holm's adjustment, * $p < 0.05$ vs baseline values of MABP or HR, $n \geq 4$ /group.

period of 24 h, animals received an i.v. or s.c. injection of the compound or of an equivalent volume (1 ml/kg) of normotonic saline (NaCl 0.9%). They were kept in metabolic cages for 24 h, during which time water intake and diuresis were measured. Twenty-four hours after drug administration, urine samples were collected for the determination of urine osmolality and electrolytes (Na^+ , K^+ , Cl^-), blood was collected by intracardiac puncture (10 μl of lithium heparinate (1600 IU/ml) per ml of blood) under isoflurane anesthesia, and the animals were immediately killed by carbon monoxide inhalation. Plasma and urine electrolytes were determined with an ISE 3000 analyzer (Caretium Medical Instruments, Shenzhen, China). Urine osmolality was determined with a Cryobasic 1 osmometer (AstoriTecnica, Poncarale, Italy). Plasma and urine urea, creatinine and glucose were determined using a Konelab 20I analyzer (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Water excretion fraction was determined as (Plasma creatinine/Urine creatinine) * 100.

Statistical Analysis

Comparisons between groups were performed with *t*-tests (2 groups) or ANOVA followed by Dunnett's or Sidak's test (>2 groups). For the comparison of repeated measurements over time, we used a linear mixed effects model with time and the measured parameter as fixed effects and the unique animal identification number as a random effect, followed by Dunn's post-hoc comparison, using the baseline value of each group as the reference. Data are represented as the means, with error bars to indicate the standard error of the mean (SEM). Each group included at least 4 separate measurements. Statistical analysis was conducted with R software version 3.4.3 (Team R Core, 2018) and additional packages (Wickham, 2009; Ritz et al., 2015).

RESULTS

LIT01-196 Intravenous Administration Decreases BP and Increases HR in Conscious Normotensive SD and WKY Rats

In conscious normotensive SD rats, basal MABP was 112 ± 1 mm of mercury (mmHg) and basal HR was 405 ± 8 beats per minute (bpm). The i.v. administration of a supra maximal dose of 400 nmol/kg K17F in conscious SD rats led to a maximal decrease in MABP of 12 ± 4 mmHg, lasting approximately 10 min (Figure 1A). In contrast, the i.v. administration of LIT01-196, in conscious SD rats at a much lower dose (15 nmol/kg), was associated with a maximal decrease in MABP of 59 ± 3 mmHg at 10 min. This hypotensive effect lasted for up to 45 min (Figure 1A). K17F (400 nmol/kg) and LIT01-196 (15 nmol/kg) induced a compensatory increase in HR of 111 ± 33 and 100 ± 19 bpm, respectively, and the effect on HR lasted longer for LIT01-196 (65 min) than for K17F (20 min) (Figure 1B). The i.v. administration of LIT01-196 in increasing doses in conscious SD male and female rats elicited a dose-dependent decrease in MABP, with ED_{50} (median effective dose) values of 9.8 ± 0.5 nmol/kg and 6.9 ± 0.5 nmol/kg, respectively (Figure 1C and Supplementary Figure 1). The i.v. administration of LIT01-196 in increasing

doses in conscious normotensive male WKY rats, also induced a dose-dependent decrease in MABP (Figure 1D) with a significantly 1.7 fold lower ED_{50} value (5.7 ± 0.4 nmol/kg, Figure 1C) than the value obtained for normotensive SD male rats of the same age and different genetic backgrounds. LIT01-196 (14 nmol/kg) also induced an increase in HR in male WKY rats (maximal increase of 74 ± 12 bpm, Figure 1E).

LIT01-196 Intravenous Administration Decreases BP but Does Not Change HR in Conscious Hypertensive DOCA-Salt Rats

We then evaluated the hemodynamic effects of LIT01-196 in conscious male hypertensive DOCA-salt rats derived from the WKY strain. In hypertensive rats, baseline MABP was 176 ± 3 mmHg and baseline HR was 403 ± 7 bpm. The i.v. administration of LIT01-196 at 15 nmol/kg led to a maximal MABP decrease of 125 ± 1 mmHg, 12 min after LIT01-196 administration (Figure 1F). LIT01-196 acute treatment (15 nmol/kg, i.v.) did not significantly modify HR (maximal increase of 11 ± 14 bpm) (Figure 1G). At this dose, MABP was normalized (around 100 mmHg), remained stable between 2 and 6 h after i.v. administration and returned to baseline value after 24 h (157 ± 8 vs 164 ± 6 mmHg, $p = 0.5$) (Figure 1H), whereas HR was not modified (Figure 1I). Lower doses of LIT01-196 resulted in a smaller initial hypotensive effect, with a shorter effect on MABP (Figure 1F). The i.v. injection of 3 nmol/kg LIT01-196 into hypertensive DOCA-salt rats induced a decrease in MABP (maximal decrease of 60 ± 10 mmHg, Figure 1F) with no change in HR (maximal increase of 4 ± 7 bpm, Figure 1G), whereas the i.v. administration of LIT01-196 at 4 nmol/kg into normotensive WKY rats did not decrease MABP (maximal decrease of 4 ± 3 mmHg, Figure 1D). LIT01-196, i.v. administered in increasing doses, in conscious hypertensive DOCA-salt rats dose-dependently decreased MABP, with a significantly lower ED_{50} value than that obtained for normotensive WKY rats of the same age and genetic background (ED_{50} value: 3.1 ± 0.6 nmol/kg versus 5.7 ± 0.4 nmol/kg, $p = 0.007$) (Figure 1C). In contrast, the i.v. administration of K17F at a dose of 20 nmol/kg in conscious hypertensive DOCA-salt rats did not significantly modify MABP and HR (Figures 2A,B).

BP Decrease Induced by LIT01-196 Intravenous Administration is Inhibited in the Presence of a NO-Synthase Inhibitor in Normotensive and Hypertensive DOCA-Salt Rats

When LIT01-196 (15 nmol/kg) and L-NAME (111 $\mu\text{mol/kg}$) were concomitantly administered *via* the i.v. route in conscious normotensive SD rats, the decrease in BP induced by LIT01-196 was drastically reduced. Only a transient initial decrease in MABP (maximal decrease in MABP of -19 ± 4 mmHg) lasting for less than 1 min was observed (Figure 3A). We found similar results in hypertensive DOCA-salt rats, in which L-NAME fully inhibited the BP decrease induced by LIT01-196 (3 nmol/kg) when the two

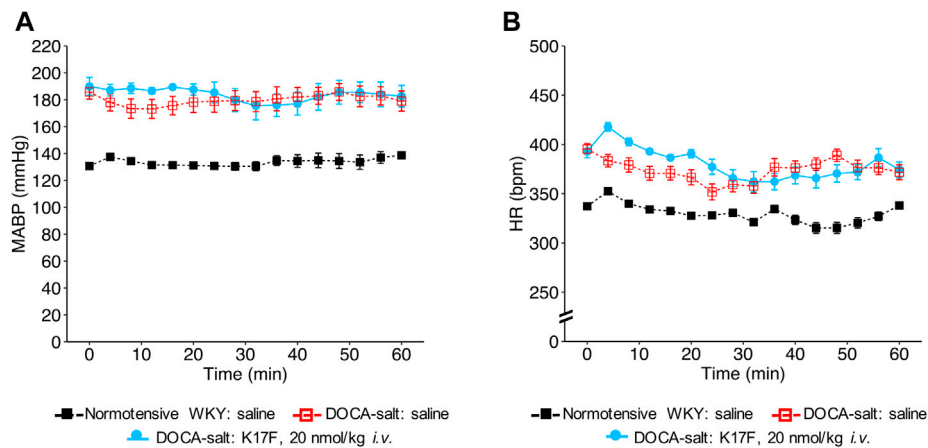


FIGURE 2 | Hemodynamic effects of the intravenous administration of apelin-17 (K17F) in conscious hypertensive DOCA-salt rats. Effects of the i.v. administration of saline in conscious normotensive WKY rats and hypertensive DOCA-salt rats or K17F (20 nmol/kg) in conscious hypertensive DOCA-salt rats on **(A)** MABP and **(B)** HR recorded for 1 h and respectively expressed in mmHg and bpm. Comparisons of repeated measurements in linear mixed-effects models followed by Dunn's test with Holm's adjustment, * $p < 0.05$ vs baseline values of MABP or HR, $n \geq 5$ /group.

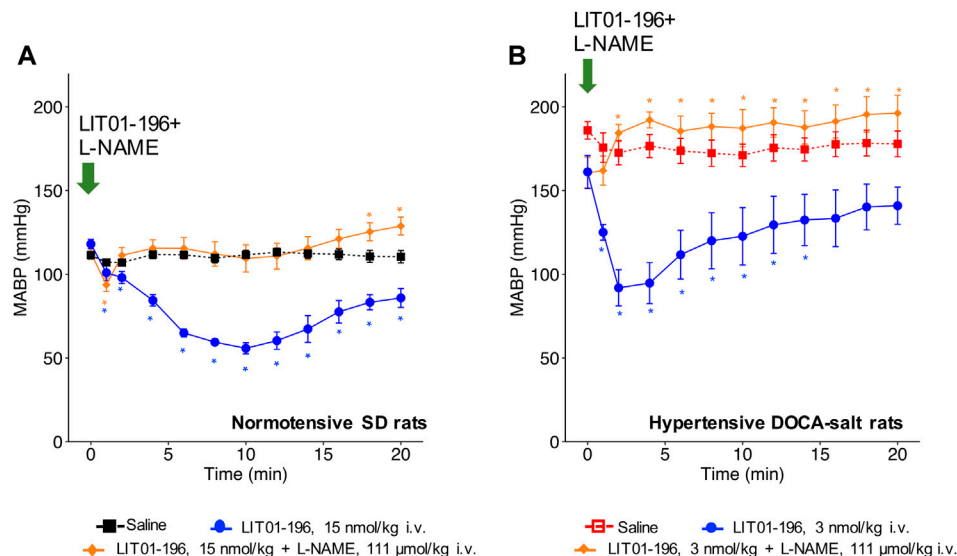


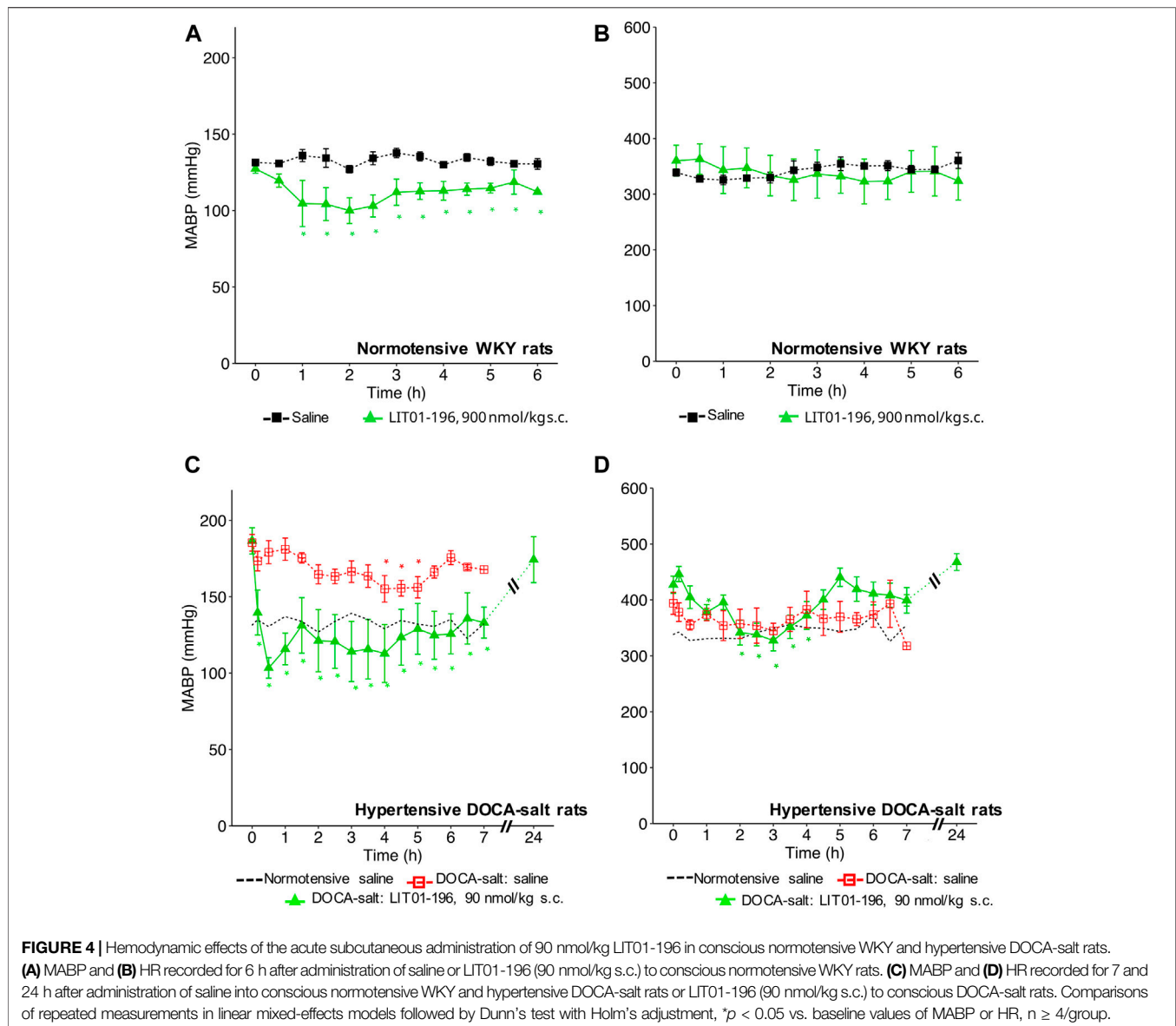
FIGURE 3 | NOS inhibition and hemodynamic effects of LIT01-196. **(A)** Effects of the i.v. administration of saline, LIT01-196 (15 nmol/kg) and the simultaneous administration of LIT01-196 and L-NAME (111 μ mol/kg) in conscious normotensive SD rats on MABP, recorded for 20 min. **(B)** Effects of the i.v. administration of saline, LIT01-196 (3 nmol/kg) and the simultaneous administration of LIT01-196 and L-NAME (111 μ mol/kg) in conscious hypertensive DOCA-salt rats on MABP, recorded for 20 min. Comparisons of repeated measurements in linear mixed-effects model followed by Dunn's test with Holm's adjustment, * $p < 0.05$, vs. the baseline value of MABP, $n \geq 5$ /group.

compounds were concomitantly administered by i.v. route (Figure 3B).

Prolonged and Long-Lasting BP Decrease Induced by LIT01-196 Subcutaneous Administration in Conscious Normotensive WKY Rats

With a view to prevent the intense initial decrease in BP induced by i.v. LIT01-196 administration and to increase the duration of action of

this peptide, we first investigated the effects of LIT01-196 s.c. administration on MABP and HR in normotensive WKY rats. The s.c. administration of 90 nmol/kg LIT01-196 in conscious normotensive WKY rats resulted in a maximal decrease in MABP of 30 ± 8 mmHg (Figure 4A), and did not alter HR (Figure 4B). The BP decrease was maximal at 120 min and persisted at least 6 h after the s.c. administration (Figure 4A). The dose of LIT01-196 (90 nmol/kg) given by s.c. route inducing a maximal BP decrease of 30 ± 8 mmHg was 11-fold higher than that required (8 nmol/kg) to have a similar hypotensive effect after i.v.



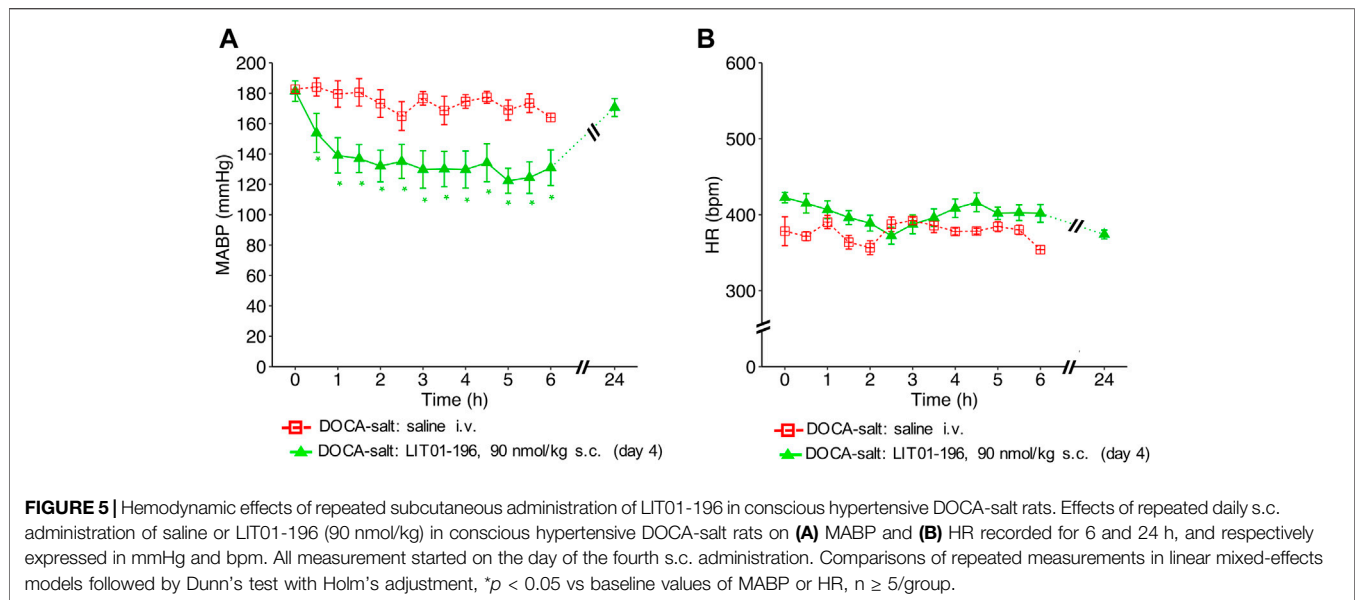
LIT01-196. The duration of the hypotensive effect induced by LIT01-196 (90 nmol/kg) after s. c. administration was significantly longer (at least 6-fold) than that recorded after i. v. administration (8 nmol/kg) (Figures 1D, 4A).

Prolonged and Long-Lasting Antihypertensive Action of LIT01-196 After Acute or Chronic Subcutaneous Administration in Conscious Hypertensive DOCA-Salt Rats

We then evaluated the effects of LIT01-196 administered via the s.c. route in conscious hypertensive DOCA-salt rats. Following the s.c. injection of 90 nmol/kg LIT01-196, a decrease in MABP was observed that was smoother than after i.v. injection (Figure 4C). At the time of maximal effect, 20 min after s. c. administration,

MABP was 97 ± 14 mmHg (Figure 4C). The s.c. administration of 90 nmol/kg LIT01-196 allowed a prolonged normalization of MABP, which remained between 97 ± 14 and 136 ± 15 mmHg from the injection until the end of recording, 7 hours later (Figure 4C). MABP returned to baseline levels, 24 h after the s. c. injection of 90 nmol/kg LIT01-196 (174 ± 14 vs 187 ± 9 mmHg, $p = 0.84$). The dose of LIT01-196 (90 nmol/kg) given by s. c. route, normalizing BP around 100 mmHg (Figure 4C) was 6 fold higher than that of LIT01-196 (15 nmol/kg) given by i.v. route in DOCA-salt hypertensive rats (Figure 1H). Subcutaneous administration of 90 nmol/kg LIT01-196 did not significantly increase HR, and was followed by a significant decrease in HR from the second hour to the 4th hour following administration (maximal decrease of 99 ± 18 bpm) (Figure 4D).

The antihypertensive effect of LIT01-196 remained after 4 consecutive daily s.c. injections of 90 nmol/kg of the compound



with a BP decrease that lasted at least 6 h, and a maximal decrease in MABP of 59 ± 8 mmHg (Figure 5A), without modification of HR (Figure 5B).

Cardiac ACE2 Activity After Chronic Subcutaneous Administration of LIT01-196 in Conscious Hypertensive DOCA-Salt Rats

Cardiac ACE2 activity in hypertensive DOCA-salt rats is decreased by 37% compared to cardiac ACE2 activity measured in control WKY rats (10.3 ± 0.8 RFU/min/ μ g protein, $n = 5$ vs 16.4 ± 0.6 RFU/min/ μ g protein, $n = 5$, $p < 0.0001$). LIT01-196 given during four consecutive days at the dose of 90 nmol/kg by s.c. route to DOCA-salt rats does not modified cardiac ACE2 activity compared to that measured in DOCA-salt rats treated with saline (10.8 ± 0.3 RFU/min/ μ g protein, $n = 5$ vs 10.3 ± 0.8 RFU/min/ μ g protein, $n = 5$). Cardiac ACE2 activity in DOCA-salt rats treated with LIT01-196 was significantly lower than that measured in the control WKY group (10.3 ± 0.8 RFU/min/ μ g protein, $n = 5$ vs 16.4 ± 0.6 RFU/min/ μ g protein, $n = 5$, Supplementary Figure 2).

Plasma Apelin Levels in Normotensive and Hypertensive DOCA-Salt Rats

Plasma apelin levels were lower in hypertensive DOCA-salt rats than in normotensive WKY rats of the same age and genetic background (0.509 ± 0.04 versus 0.781 ± 0.10 pmol/ml respectively, $p = 0.029$) (Figure 6).

Metabolic Effects of Repeated LIT01-196 Subcutaneous Administrations in Hypertensive DOCA-Salt Rats

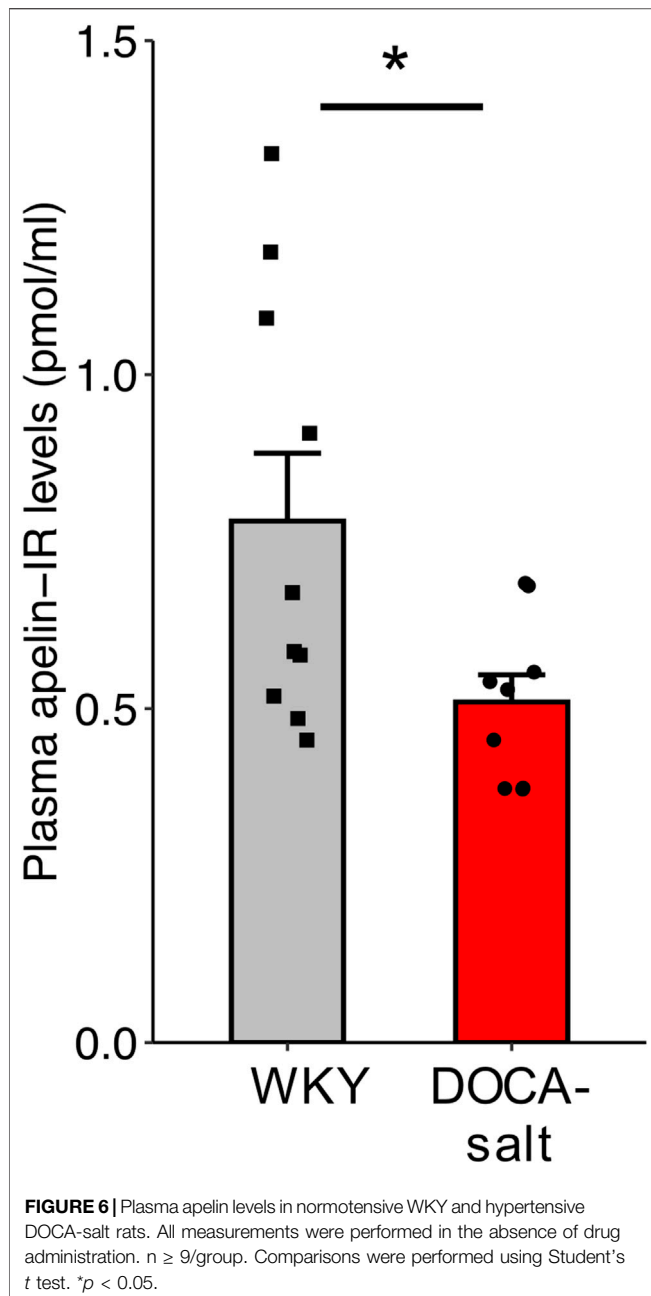
We then evaluated the effects of repeated doses of LIT01-196 (daily s.c. administrations of 90 nmol/kg for 4 days) on metabolic parameters in DOCA-salt rats housed in metabolic cages. After

chronic treatment for 4 days, LIT01-196 did not induce any significant change in urine output, urine osmolality, water and food intake, plasma sodium and potassium levels, kidney function (plasma creatinine and urea nitrogen), plasma glucose levels and water excretion fraction versus DOCA-salt rats receiving saline (Figures 7A–J). Animals treated with LIT01-196 had a significant 31% higher daily urinary sodium excretion ($p = 0.047$) and a similar daily urinary potassium excretion when compared to DOCA-salt rats receiving saline (Figures 7K,L).

DISCUSSION

This study describes a way of normalizing BP in an experimental salt-dependent model of hypertension, by activating the ApelinR, using a systemically active metabolically stable K17F analog, LIT01-196. We first show the hypotensive effect of an acute LIT01-196 administration by i.v. and by s.c. route in normotensive rats. We then show that acute LIT01-196 administration by s.c. route at a dose in the nmol/kg range normalizes arterial BP in conscious hypertensive DOCA-salt rats for at least 7 h, via a NO-dependent mechanism. The antihypertensive effect of LIT01-196 is maintained after 4 consecutive days of treatment, and does not alter plasma sodium and potassium levels and kidney function as shown by the lack of change in plasma creatinine and urea nitrogen levels. This shows for the first time that LIT01-196, a metabolically stable analog of the endogenous peptide K17F acts as a potent and long-lasting antihypertensive agent.

We first found that, LIT01-196 administered in increasing doses by the i. v. route in conscious normotensive male and female SD and male WKY rats decreased BP in a dose-dependent manner, with ED₅₀ values of 9.8, 6.9 and 5.7 nmol/kg respectively, showing a slight higher sensitivity of female SD and male WKY rats to LIT01-196 treatment compared to male SD rats. These data on male and female SD rats are to put in line with data showing in healthy volunteers

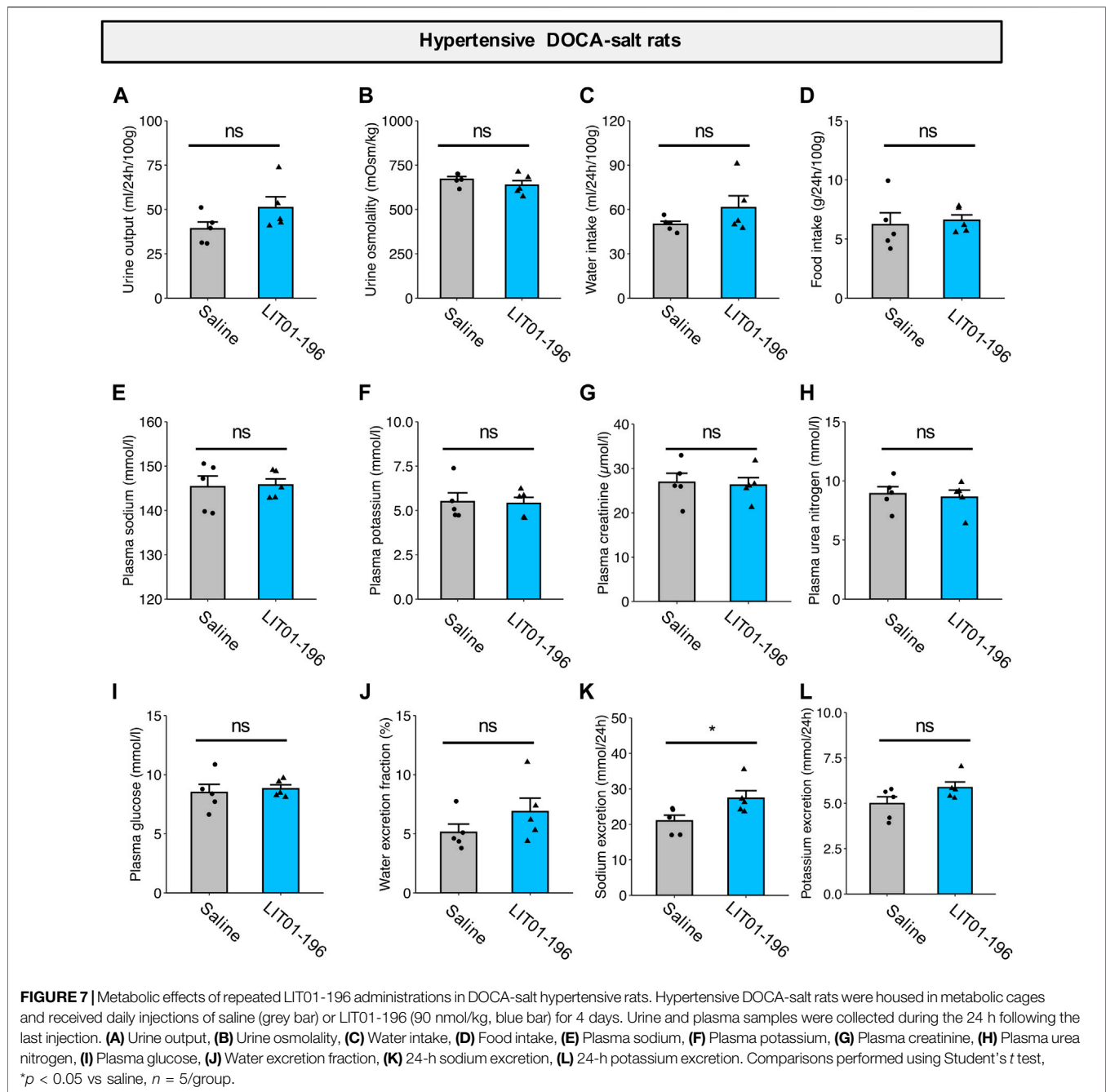


higher age-adjusted plasma apelin concentrations in men than in women (Blanchard et al., 2013). We have then pursued our animal studies with male normotensive and hypertensive DOCA-salt rats. However, it would be important to further investigate the effects of LIT01-196 on BP in female as compared to male hypertensive DOCA-salt rats since a male susceptibility and female resilience to developing hypertension have been observed in the vast majority of animal models of hypertension, regardless of whether it is induced or genetic (Arnold et al., 2017).

The i.v. administration of LIT01-196 (14–15 nmol/kg) in conscious male WKY and SD rats elicited a rapid, marked decrease in BP (–75 and –59 mmHg respectively) that was

sustained for at least 60 and 45 min respectively whereas, at the same dose, K17F induced no significant change in BP. Nevertheless, when administered i. v. at a dose of 400 nmol/kg (27 times higher) in conscious SD rats, K17F induced a –12 mmHg decrease in BP that lasted 10 min. These results are in line with the previously reported *in vivo* LIT01-196 half-life of 28 min in the bloodstream, versus 50 s for K17F, in SD male rats after i.v. administration (Flahault et al., 2021). The LIT01-196-induced BP decrease does not result from the action of the compound at the brain level since LIT01-196 was previously shown not to cross the blood-brain barrier and enter the brain after systemic administration to control rats (Flahault et al., 2021). Other metabolically stable apelin analogs have been developed to increase the half-life of the peptide and its *in vivo* activity. *In vivo* effects on BP have been evaluated for only a few of these analogs. Murza et al. showed that a Tyr (OBn) apelin-13 analog, administered i.v. at a dose of 620 nmol/kg in anesthetized normotensive rats, induced a higher BP decrease (–50 mmHg, return to baseline after 45 min) compared to pE13F (Murza et al., 2015). Wang et al. designed the Nle-Aib-BrF-pyr-apelin-13 peptide, which decreased BP by –25 mmHg for more than 120 min (no return to baseline MABP was observed) when administered i.v. at a high dose (1,400 nmol/kg) in normotensive anesthetized mice (Wang et al., 2016). Thus, at a dose lower than those used in these previous studies (by a factor of 41–93), and in conscious rather than anesthetized rats, LIT01-196 was more active than the apelin-13 analogs. LIT01-196 may, therefore, be considered as a potent hypotensive apelin analog *in vivo*.

We then investigated the effects of LIT01-196, on BP in conscious hypertensive DOCA-salt rats, a salt- and volume-dependent model of hypertension, with low plasma renin levels, resistant to treatment with systemic RAS blockers (Morton et al., 1979). The DOCA-salt rat has a high BP, with high plasma AVP levels, water and salt retention, hyperactivity of the brain RAS but a low activity of the systemic RAS (Basso et al., 1981; Ganten et al., 1983). We first showed that plasma apelin levels were lower in DOCA-salt rats than in normotensive rats, consistent with low apelin expression in experimental models of hypertension (Zhang et al., 2006; Akcilar et al., 2013) and hypertensive patients (Xie et al., 2017). We then found that LIT01-196 i.v. administered in increasing doses to conscious DOCA-salt rats, potently decreased BP in a dose-dependent manner, with an ED₅₀ value of 3.1 ± 0.6 nmol/kg, significantly lower than the value obtained for normotensive WKY rats of the same age and genetic background. The i.v. administration of LIT01-196 (15 nmol/kg) in conscious DOCA-salt rats elicited a high decrease in BP (–125 mmHg), versus –75 mmHg in normotensive WKY rats, that was sustained for 6 h versus 1 h in WKY rats. Hypertensive DOCA-salt rats appear to be more sensitive to the antihypertensive effects of LIT01-196 treatment than normotensive WKY rats. Indeed, following the i.v. administration of LIT01-196 at a dose of 3 nmol/kg, MABP decreased markedly (–60 mmHg) for at least 6 h in DOCA-salt rats but remained unchanged in normotensive WKY rats. Similarly, Lee et al. reported that, for the same dose of apelin-13 (10 nmol/kg), the decrease in MABP was stronger in anesthetized hypertensive SHR (–60%) than in



normotensive WKY rats (−30%) (Lee et al., 2005). They also reported a short duration of the effects of apelin (6 min) in SHR.

ACE2 was previously shown to be involved in the metabolism of K17F (Wang et al., 2016) and LIT01-196 (data not shown). Since a decrease in renal ACE2 mRNA expression and brain ACE2 enzymatic activity have been observed in hypertensive DOCA-salt rats compared to normotensive rats (Crackower et al., 2002; Hmazzou et al., 2021), we have shown, in the present study, that cardiac ACE2 activity in hypertensive DOCA-salt rats was decreased compared to that measured in normotensive WKY

rats. Moreover, LIT01-196 given by s.c. route during 4 days at the dose of 90 nmol/kg did not modified cardiac ACE2 activity compared to that measured in DOCA-salt rats treated with saline but was significantly lower than that measured in control normotensive rats. This shows that metabolism of LIT01-196 by ACE2 was decreased in hypertensive rats compared to normotensive rats and could be responsible for higher LIT01-196 levels available for ApelinR activation. This could explain the higher sensitivity of hypertensive DOCA-salt rats to LIT01-196 treatment than normotensive rats. Moreover, Akcilar et al. (2013) showed in DOCA-salt hypertensive rats, that

plasma apelin levels and apelin-APJ mRNA expression levels were reduced. Consequently treatment with LIT01-196 may compensate the decrease activity of the vascular apelinergic system and could participate for normalization of arterial BP. Considering the low activity of the systemic RAS in DOCA-salt rats (Lee et al., 1999; Basting and Lazartigues, 2017) and the fact that apelin inhibits angiotensin II-induced BP increase (Ishida et al., 2004), the dose of LIT01-196 required to counterbalance the stimulatory effect of angiotensin II on BP in hypertensive DOCA-salt rats is weaker than that required in normotensive rats. Finally, an impairment of the baroreflex has been reported in DOCA-salt rats (Takeda et al., 1988). In this study, despite the large amplitude of the BP decrease induced by LIT01-196 in DOCA-salt rats, HR was not increased. This could account for the higher sensitivity of DOCA-salt rats to the antihypertensive effect of LIT01-196, due to a lack of counteracting resistance adjustment by the baroreflex.

With a view to preventing the intense initial decrease in BP induced by LIT01-196 and to increase the duration of action of this peptide, we investigated the hypotensive response to the s.c. administration of this compound in normotensive and hypertensive rats. As expected, the dose required to induce a decrease in BP in conscious normotensive and hypertensive rats was larger for administration via the s.c. route than for the i.v. route. In normotensive WKY rats, the s.c. administration of 90 nmol/kg LIT01-196 induced a decrease in BP (−30 mmHg) that was smaller than that induced by its i.v. administration, but this effect lasted for at least 6 h, as opposed to 45 min for the effects of i.v. administration in normotensive animals. These results are in line with the prolonged *in vivo* half-life of LIT01-196 (156 min) in the bloodstream after s.c. administration in normotensive rats as previously reported (Flahault et al., 2021).

In cases of chronic, severe or resistant hypertension, the objective is to obtain a long-lasting effect with a progressive decrease in BP. The acute s.c. administration of LIT01-196 at a dose of 90 nmol/kg in conscious hypertensive DOCA-salt rats with a basal MABP around 176 mmHg, normalized MABP at about 100–120 mmHg for at least 7 h without the initial drastic decrease in BP observed after i.v. administration. Despite this sustained decrease in BP, MABP measured 24 h after the s.c. administration of LIT01-196 s.c. had returned to levels similar to those at baseline before treatment. In addition, repeated daily s.c. administrations of LIT01-196 did not alter the antihypertensive effect of the compound, and were not associated with alterations in plasma sodium and potassium levels and in kidney function. This suggests that there is no tolerance to the antihypertensive effect of LIT01-196 and no desensitization of ApelinR after chronic LIT01-196 administration. This is in agreement with the results of Akcilar *et al.* who showed that repeated intraperitoneal injection of apelin-13 for 17 days in DOCA-salt hypertensive rats, did not modified ApelinR mRNA expression in vascular tissue, relative to DOCA-salt rats receiving saline (Akcilar et al., 2013). Overall, these results indicate that LIT01-196, a metabolically stable analog of the endogenous peptide K17F, acts as a potent and long-lasting antihypertensive agent.

We also investigated the mechanism of action of LIT01-196 in the DOCA-salt model. K17F (Gerbier et al., 2017) and pE13F (Tatemoto et al., 2001; Japp et al., 2008) decrease BP through a NO-dependent mechanism in normotensive conditions, both in rodents and humans. In line with these results, we demonstrated *in vivo* that the BP decrease induced by LIT01-196 is fully inhibited by a NO synthase inhibitor, L-NAME in conscious normotensive rats. This is in agreement with the vasorelaxant activity of LIT01-196 on isolated rat aorta that were precontracted by incubation with noradrenaline and on glomerular arterioles that were precontracted with angiotensin II. In both preparations, LIT01-196, as K17F, induced a dose-dependent relaxation of the vessels (Gerbier et al., 2017), consistent with the presence of ApelinR binding sites in human aorta (Katugampola et al., 2002) and of ApelinR mRNA in the endothelial cells lining the large conductance vessels of various organs (Hus-Citharel et al., 2008; Japp and Newby, 2008). The relaxant effects of K17F and LIT01-196 on rat aorta were significantly inhibited by prior treatment of the vessels with L-NAME, suggesting that LIT01-196, similar to K17F, acted via a NO-dependent mechanism (Gerbier et al., 2017).

However, BP regulation by NO may be altered in hyperaldosteronism conditions. Studies have previously shown in DOCA-salt and 2-kidneys-1-clip rats, which are respectively models of primary and secondary hyperaldosteronism (Hashimoto et al., 1983), that plasma nitrite/nitrate ratio and aortic expression of endothelial NO synthase were decreased (Lee et al., 1999). In contrast, SHR rats exhibit an increase in NO synthase activity (Lee et al., 1999). It was thus critical to assess whether activating ApelinR by LIT01-196 in hypertensive DOCA-salt rats was also efficient to decrease BP through a NO-dependent mechanism. We show that, similarly to normotensive rats, the antihypertensive effect of LIT01-196 is fully inhibited by L-NAME in DOCA-salt rats, suggesting that LIT01-196, by activating ApelinR, decreases BP in DOCA-salt rats *via* a NO-dependent mechanism.

The fast-acting nature of the hypotensive effect of LIT01-196 suggests it mainly occurs through vasodilation. However, whether extracellular volume reduction could contribute to a longer-acting effect remained to be investigated. Indeed, the i.v. injection of K17F has been shown to increase aqueous diuresis in anesthetized lactating female rats (Hus-Citharel et al., 2008), and LIT01-196 given by i.v. or s.c. route in control rats increases urine output and decreases urine osmolality (Flahault et al., 2021). We therefore evaluated the effects of LIT01-196 administration on diuresis and urinary sodium excretion in hypertensive DOCA-salt rats after 4 days of treatment. The repeated s.c. administration of 90 nmol/kg LIT01-196 in conscious DOCA-salt rats induced a slight increase in urinary sodium excretion, with no significant increase in urine output. In contrast with prior studies in normotensive rats (De Mota et al., 2004; Hus-Citharel et al., 2014; Flahault et al., 2021), we did not observe an aquaretic effect of the compound, indeed, urine osmolality was similar in DOCA-salt rats treated with saline and LIT01-196. Due to the fact that LIT01-196 does not enter the brain and cannot inhibit AVP release in the bloodstream, the high circulating AVP levels (Morris et al., 1981; Keck et al., 2019),

which promote water reabsorption by the kidney, may in turn inhibit the ability of LIT01-196 to induce water excretion.

CONCLUSION

In conclusion, LIT01-196, a metabolically stable analog of the endogenous peptide K17F, is a potent and long-lasting antihypertensive agent that can be administered intravenously to decrease BP rapidly, in a dose-dependent manner, or subcutaneously, to obtain a sustained and long-lasting effect. This agent acts as a vasodilator, via a NO-dependent mechanism, and, although associated with an aquaretic effect in normotensive but not in hypertensive DOCA-salt rats, it has no impact on plasma sodium or potassium levels and kidney function in DOCA-salt rats. Treatment by LIT01-196 could constitute a new approach to regulate high BP via activation of the ApelinR.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All supporting data are included within the main article. Raw data is available upon request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the French national animal ethics committee (CEEA, reference numbers 01966.02, 01962.02 and 2016-10#3672).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CL-C and AF contributed to the conception and design of the studies. Experimental work was carried out by AF, MK, P-EG-S, and NM. Data analysis was performed by AF, MK, P-EG-S.

REFERENCES

- Akçılar, R., Turgut, S., Caner, V., Akçılar, A., Ayada, C., Elmas, L., et al. (2013). Apelin Effects on Blood Pressure and RAS in DOCA-Salt-Induced Hypertensive Rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 35, 550–557. doi:10.3109/10641963.2013.764889
- Arnold, A. P., Cassis, L. A., Eghbali, M., Reue, K., and Sandberg, K. (2017). Sex Hormones and Sex Chromosomes Cause Sex Differences in the Development of Cardiovascular Diseases. *Atvb* 37, 746–756. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307301
- Azizi, M., Iturrioz, X., Blanchard, A., Peyrard, S., De Mota, N., Chartrel, N., et al. (2008). Reciprocal Regulation of Plasma Apelin and Vasopressin by Osmotic Stimuli. *Jasn* 19, 1015–1024. doi:10.1681/ASN.2007070816
- Basso, N., Ruiz, P., Mangiarua, E., and Taquini, A. C. (1981). Renin-like Activity in the Rat Brain during the Development of DOC-Salt Hypertension. *Hypertension* 3, II-14–17. doi:10.1161/01.hyp.3.6_pt_2.ii-14
- Basting, T., and Lazartigues, E. (2017). DOCA-salt Hypertension: an Update. *Curr. Hypertens. Rep.* 19, 32. doi:10.1007/s11906-017-0731-4
- Blanchard, A., Steichen, O., De Mota, N., Curis, E., Gauci, C., Frank, M., et al. (2013). An Abnormal Apelin/vasopressin Balance May Contribute to Water Retention in Patients with the Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone (SIADH) and Heart Failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 2084–2089. doi:10.1210/jc.2012-3794

LIT01-196 design was performed by DB and LIT01-196 synthesis was performed by LE. CL-C, AF, and MK wrote the first draft of the manuscript. Resources and funding acquisition CL-C and DB. All authors read and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM) (Annual dotation), including the financial support for Proof of Concept, CoPoc from INSERM Transfert, the CNRS, the *Université de Strasbourg*, the *Collège de France*, the *Agence Nationale de la Recherche* “Vie, santé et bien-être 2016” (ANR-16-CE18-0030, FluoroPEP) and the *Federation Française de Cardiologie*. The LabEx MEDALIS (ANR-10-LABX-0034) was used for the purchase of HPLC equipment. LE was supported by a fellowship from the *Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*. AF was supported by the fellowship from INSERM (Poste d'Accueil pour Hospitaliers). P-EG-S was supported by a fellowship from the *Fondation pour la Recherche Médicale*, grant number “PBR201810007643.”

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks goes to the animal facility of *Collège de France* and its staff for their help and guidance. The English text was edited by J. Sappa from Alex Edelman & Associates.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.715095/full#supplementary-material>

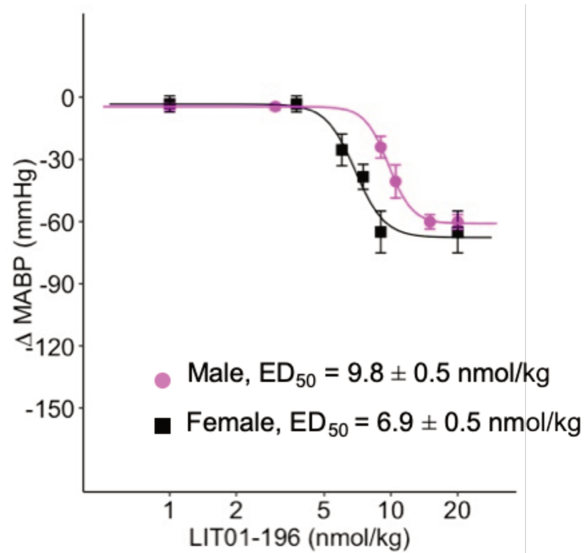
- Brouwers, S., Sudano, I., Kokubo, Y., and Sulaica, E. M. (2021). Arterial Hypertension. *Lancet* S0140-6736 (21), 00221–X. doi:10.1016/S0140-6736(21)00221-X
- Crackower, M. A., Sarao, R., Oudit, G. Y., Yagil, C., Koziaradzki, I., Scanga, S. E., et al. (2002). Angiotensin-converting Enzyme 2 Is an Essential Regulator of Heart Function. *Nature* 417, 822–828. doi:10.1038/nature00786
- De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., et al. (2004). Apelin, a Potent Diuretic Neuropeptide Counteracting Vasopressin Actions through Inhibition of Vasopressin Neuron Activity and Vasopressin Release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 10464–10469. doi:10.1073/pnas.0403518101
- Flahault, A., Couvineau, P., Alvear-Perez, R., Iturrioz, X., and Llorens-Cortes, C. (2017). Role of the Vasopressin/Apelin Balance and Potential Use of Metabolically Stable Apelin Analogs in Water Metabolism Disorders. *Front. Endocrinol.* 8, 120. doi:10.3389/fendo.2017.00120
- Flahault, A., Girault-Sotias, P.-E., Keck, M., Alvear-Perez, R., De Mota, N., Estéouille, L., et al. (2021). A Metabolically Stable Apelin-17 Analog Decreases AVP-Induced Antidiuresis and Improves Hyponatremia. *Nat. Commun.* 12, 305. doi:10.1038/s41467-020-20560-y
- Ganten, D., Hermann, K., Bayer, C., Unger, T., and Lang, R. (1983). Angiotensin Synthesis in the Brain and Increased Turnover in Hypertensive Rats. *Science* 221, 869–871. doi:10.1126/science.6879184

- Gerbier, R., Alvear-Perez, R., Margathe, J. F., Flahault, A., Couvineau, P., Gao, J., et al. (2017). Development of Original Metabolically Stable Apelin-17 Analogs with Diuretic and Cardiovascular Effects. *FASEB J.* 31, 687–700. doi:10.1096/fj.201600784R
- Hashimoto, H., Hiwada, K., and Kokubu, T. (1983). Different Mechanisms Maintaining High Blood Pressure in Chronic One-Kidney, One-Clip, and Two-Kidney, One-Clip Hypertensive Rats. *Clin. Exp. Hypertens. A: Theor. Pract.* 5, 429–445. doi:10.3109/10641968309069498
- Hmazou, R., Marc, Y., Flahault, A., Gerbier, R., De Mota, N., and Llorens-Cortes, C. (2021). Brain ACE2 Activation Following Brain Aminopeptidase A Blockade by Fibrinogen in Salt-dependent Hypertension. *Clin. Sci. (Lond)* 135, 775–791. doi:10.1042/CS20201385
- Hus-Citharel, A., Bodineau, L., Frugière, A., Joubert, F., Bouby, N., and Llorens-Cortes, C. (2014). Apelin Counteracts Vasopressin-Induced Water Reabsorption via Cross Talk between Apelin and Vasopressin Receptor Signaling Pathways in the Rat Collecting Duct. *Endocrinology* 155, 4483–4493. doi:10.1210/en.2014-1257
- Hus-Citharel, A., Bouby, N., Frugière, A., Bodineau, L., Gasc, J.-M., and Llorens-Cortes, C. (2008). Effect of Apelin on Glomerular Hemodynamic Function in the Rat Kidney. *Kidney Int.* 74, 486–494. doi:10.1038/ki.2008.199
- Ishida, J., Hashimoto, T., Hashimoto, Y., Nishiwaki, S., Iguchi, T., Harada, S., et al. (2004). Regulatory Roles for APJ, a Seven-Transmembrane Receptor Related to Angiotensin-type 1 Receptor in Blood Pressure *In Vivo*. *J. Biol. Chem.* 279, 26274–26279. doi:10.1074/jbc.M404149200
- Japp, A. G., Cruden, N. L., Amer, D. A. B., Li, V. K. Y., Goudie, E. B., Johnston, N. R., et al. (2008). Vascular Effects of Apelin *In Vivo* in Man. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 908–913. doi:10.1016/j.jacc.2008.06.013
- Japp, A. G., and Newby, D. E. (2008). The Apelin-APJ System in Heart Failure. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1882–1892. doi:10.1016/j.bcp.2007.12.015
- Katugampola, S. D., Maguire, J. J., Kuc, R. E., Wiley, K. E., and Davenport, A. P. (2002). Discovery of Recently Adopted Orphan Receptors for Apelin, Urotensin II, and Ghrelin Identified Using Novel Radioligands and Functional Role in the Human Cardiovascular System. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80, 369–374. doi:10.1139/y02-029
- Keck, M., De Almeida, H., Compère, D., Inguibert, N., Flahault, A., Balavoine, F., et al. (2019). NI956/QGC006, a Potent Orally Active, Brain-Penetrating Aminopeptidase A Inhibitor for Treating Hypertension. *Hypertension* 73, 1300–1307. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12499
- Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., et al. (2000). Characterization of Apelin, the Ligand for the APJ Receptor. *J. Neurochem.* 74, 34–41. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x
- Lee, D. K., Saldivia, V. R., Nguyen, T., Cheng, R., George, S. R., and O'Dowd, B. F. (2005). Modification of the Terminal Residue of Apelin-13 Antagonizes its Hypotensive Action. *Endocrinology* 146, 231–236. doi:10.1210/en.2004-0359
- Lee, J. U., Kang, D. G., Kook, H., Kim, I. K., and Oh, B. S. (1999). Differentially-altered Vascular Guanylate Cyclase Isoforms in Experimental Hypertensive Rats. *J. Korean Med. Sci.* 14, 386–392. doi:10.3346/jkms.1999.14.4.386
- Messari, S. E., Iturrioz, X., Fassot, C., De Mota, N., Roesch, D., and Llorens-Cortes, C. (2004). Functional Dissociation of Apelin Receptor Signaling and Endocytosis: Implications for the Effects of Apelin on Arterial Blood Pressure. *J. Neurochem.* 90, 1290–1301. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02591.x
- Morris, M., Wren, J. A., and Sundberg, D. K. (1981). Central Neural Peptides and Catecholamines in Spontaneous and DOCA/salt Hypertension. *Peptides* 2, 207–211. doi:10.1016/s0196-9781(81)80035-6
- Morton, J., Casals-Stenzel, J., Lever, A., Millar, J., Riegger, A., and Tree, M. (1979). Inhibitors of the Renin-Angiotensin System in Experimental Hypertension, with a Note on the Measurement of Angiotensin I, II and III during Infusion of Converting-Enzyme Inhibitor. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 7 (Suppl. 2), 233S–241S. doi:10.1111/j.1365-2125.1979.tb04695.x
- Murza, A., Besserer-Offroy, É., Côté, J., Bérubé, P., Longpré, J.-M., Dumaine, R., et al. (2015). C-terminal Modifications of Apelin-13 Significantly Change Ligand Binding, Receptor Signaling, and Hypotensive Action. *J. Med. Chem.* 58, 2431–2440. doi:10.1021/jm501916k
- O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., et al. (1993). A Human Gene that Shows Identity with the Gene Encoding the Angiotensin Receptor Is Located on Chromosome 11. *Gene* 136, 355–360. doi:10.1016/0378-1119(93)90495-o
- Pedersen, K. B., Sriramula, S., Chhabra, K. H., Xia, H., and Lazartigues, E. (2011). Species-specific Inhibitor Sensitivity of Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and its Implication for ACE2 Activity Assays. *Am. J. Physiology-Regulatory, Integr. Comp. Physiol.* 301, R1293–R1299. doi:10.1152/ajpregu.00339.2011
- Reaux, A., De Mota, N., Skultetyova, I., Lenkei, Z., El Messari, S., Gallatz, K., et al. (2001). Physiological Role of a Novel Neuropeptide, Apelin, and its Receptor in the Rat Brain. *J. Neurochem.* 77, 1085–1096. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00320.x
- Reaux, A., Fournie-Zaluski, M. C., David, C., Zini, S., Roques, B. P., Corvol, P., et al. (1999). Aminopeptidase A Inhibitors as Potential central Antihypertensive Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13415–13420. doi:10.1073/pnas.96.23.13415
- Reaux, A., Gallatz, K., Palkovits, M., and Llorens-Cortes, C. (2002). Distribution of Apelin-Synthesizing Neurons in the Adult Rat Brain. *Neuroscience* 113, 653–662. doi:10.1016/s0306-4522(02)00192-6
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., and Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* 10, e0146021. doi:10.1371/journal.pone.0146021
- Takeda, K., Nakamura, Y., Hayashi, J., Kawasaki, S., Nakata, T., Oguro, M., et al. (1988). Effects of Salt and DOCA on Hypothalamic and Baroreflex Control of Blood Pressure. *Clin. Exp. Hypertens. Part A: Theor. Pract.* 10 (Suppl. 1), 289–299. doi:10.3109/10641968809075982
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.-X., et al. (1998). Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 251, 471–476. doi:10.1006/bbrc.1998.9489
- Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M.-X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., et al. (2001). The Novel Peptide Apelin Lowers Blood Pressure via a Nitric Oxide-dependent Mechanism. *Regul. Peptides* 99, 87–92. doi:10.1016/s0167-0115(01)00236-1
- Team, R. Core (2018). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available at: <https://www.R-project.org/>.
- Walli-Attaei, M., Joseph, P., Rosengren, A., Chow, C. K., Rangarajan, S., Lear, S. A., et al. (2020). Variations between Women and Men in Risk Factors, Treatments, Cardiovascular Disease Incidence, and Death in 27 High-Income, Middle-Income, and Low-Income Countries (PURE): a Prospective Cohort Study. *The Lancet* 396, 97–109. doi:10.1016/S0140-6736(20)30543-2
- Wang, W., McKinnie, S. M. K., Farhan, M., Paul, M., McDonald, T., McLean, B., et al. (2016). Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17. *Hypertension* 68, 365–377. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06892
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag. doi:10.1007/978-0-387-98141-3
- Xie, H., Luo, G., Zheng, Y., Hu, D., Peng, F., and Xie, L. (2017). Lowered Circulating Apelin Is Significantly Associated with an Increased Risk for Hypertension: A Meta-Analysis. *Clin. Exp. Hypertens.* 39, 435–440. doi:10.1080/10641963.2016.1267199
- Ye, M., Wysocki, J., Gonzalez-Pacheco, F. R., Salem, M., Evora, K., Garcia-Halpin, L., et al. (2012). Murine Recombinant Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Hypertension* 60, 730–740. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198622
- Zhang, J., Ren, C. X., Qi, Y. F., Lou, L. X., Chen, L., Zhang, L. K., et al. (2006). Exercise Training Promotes Expression of Apelin and APJ of Cardiovascular Tissues in Spontaneously Hypertensive Rats. *Life Sci.* 79, 1153–1159. doi:10.1016/j.lfs.2006.03.040

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

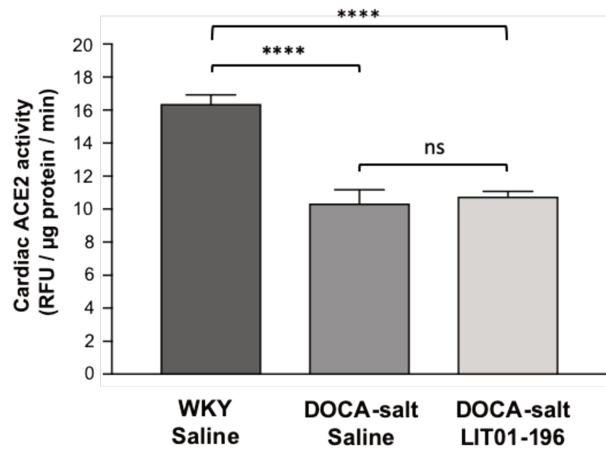
Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Flahault, Keck, Girault-Sotias, Esteouille, De Mota, Bonnet and Llorens-Cortes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Supplementary Figure 1: Effects of LIT01-196 given by intravenous route on arterial blood pressure in male and female Sprague-Dawley rats.

Dose-response curve of LIT01-196 administered by the i.v. route, for MAPB changes in conscious SD normotensive male (n=18) and female (n=17) rats.



Supplementary Figure 2: Effects of the s.c. administration of LIT01-196 on cardiac ACE2 activity in hypertensive DOCA-salt rats.

Cardiac ACE2 activity was measured in normotensive WKY rats and in DOCA-salt hypertensive rats receiving saline or LIT01-196 (90 nmoles/kg) by s.c. route during 4 days (n=5 for each group). Cardiac ACE2 activity in DOCA-salt rats receiving LIT01-196 were compared with those of DOCA-salt rats receiving saline. The values in DOCA-salt rats were compared with those in normotensive WKY rats receiving s.c. injections of saline. The mean \pm SEM values are presented for each set of conditions. One-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test ****P<0.0001.

**ANNEXE II: REVUE “APELIN AND VASOPRESSIN:
THE YIN AND YANG OF WATER BALANCE”**



Apelin and Vasopressin: The Yin and Yang of Water Balance

Pierre-Emmanuel Girault-Sotias, Romain Gerbier, Adrien Flahault, Nadia de Mota and Catherine Llorens-Cortes*

Laboratory of Central Neuropeptides in the Regulation of Body Fluid Homeostasis and Cardiovascular Functions, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), Unit U1050, National Center for Scientific Research (CNRS), Mixed Research Unit 7241, College de France, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Hubert Vaudry,
Université de Rouen,
France

Reviewed by:

Philippe Valet,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM),
France

Taka-aki Koshimizu,
Jichi Medical University, Japan

*Correspondence:

Catherine Llorens-Cortes
c.llorens-cortes@college-de-france.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 02 July 2021

Accepted: 19 October 2021

Published: 22 November 2021

Citation:

Girault-Sotias P-E, Gerbier R,
Flahault A, de Mota N and
Llorens-Cortes C (2021) Apelin and
Vasopressin: The Yin and
Yang of Water Balance.
Front. Endocrinol. 12:735515.
doi: 10.3389/fendo.2021.735515

Apelin, a (neuro)vasoactive peptide, plays a prominent role in controlling body fluid homeostasis and cardiovascular functions. Experimental data performed in rodents have shown that apelin has an aquaretic effect *via* its central and renal actions. In the brain, apelin inhibits the phasic electrical activity of vasopressinergic neurons and the release of vasopressin from the posterior pituitary into the bloodstream and in the kidney, apelin regulates renal microcirculation and counteracts in the collecting duct, the antidiuretic effect of vasopressin occurring *via* the vasopressin receptor type 2. In humans and rodents, if plasma osmolality is increased by hypertonic saline infusion/water deprivation or decreased by water loading, plasma vasopressin and apelin are conversely regulated to maintain body fluid homeostasis. In patients with the syndrome of inappropriate antidiuresis, in which vasopressin hypersecretion leads to hyponatremia, the balance between apelin and vasopressin is significantly altered. In order to re-establish the correct balance, a metabolically stable apelin-17 analog, LIT01-196, was developed, to overcome the problem of the very short half-life (in the minute range) of apelin *in vivo*. In a rat experimental model of vasopressin-induced hyponatremia, subcutaneously (s.c.) administered LIT01-196 blocks the antidiuretic effect of vasopressin and the vasopressin-induced increase in urinary osmolality, and induces a progressive improvement in hyponatremia, suggesting that apelin receptor activation constitutes an original approach for hyponatremia treatment.

Keywords: apelin, vasopressin, apelin receptor, metabolically stable apelin-17 analogs, diuresis, osmolality, hyponatremia

1 DISCOVERY

The apelin story began in 1993 with the cloning of a cDNA for an orphan receptor, given the name “APJ receptor” (putative receptor protein related to the type 1 (AT1) angiotensin receptor) from a human genomic library (1). This seven-transmembrane domain G-protein coupled receptor (GPCR) displays 31% amino-acid (aa) sequence identity to the human AT1 receptor and is encoded by a gene on chromosome 11. However, it does not bind radiolabeled angiotensin II (Ang II) (1), and stimulation of the rat APJ receptor by Ang II does not modify cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production, demonstrating that it is not an angiotensin receptor subtype (2). The gene encoding the APJ receptor has no introns in human and rodents (2–4). The human

and the rat APJ receptors are 380 and 377 aa long, respectively. The APJ receptor aa sequence is conserved across species, with more than 90% sequence identity between human and rodents, and up to 50% sequence identity with other non-mammalian species, such as zebrafish and frog (2–5).

In 1998, the endogenous ligand of the orphan APJ receptor was isolated from bovine stomach tissue extracts (6). This 36-aa peptide was called apelin for APJ Endogenous LIgANd, and the APJ receptor was renamed the apelin receptor (ApelinR).

2 SYNTHESIS AND METABOLISM OF APELIN

2.1 Processing of Preproapelin

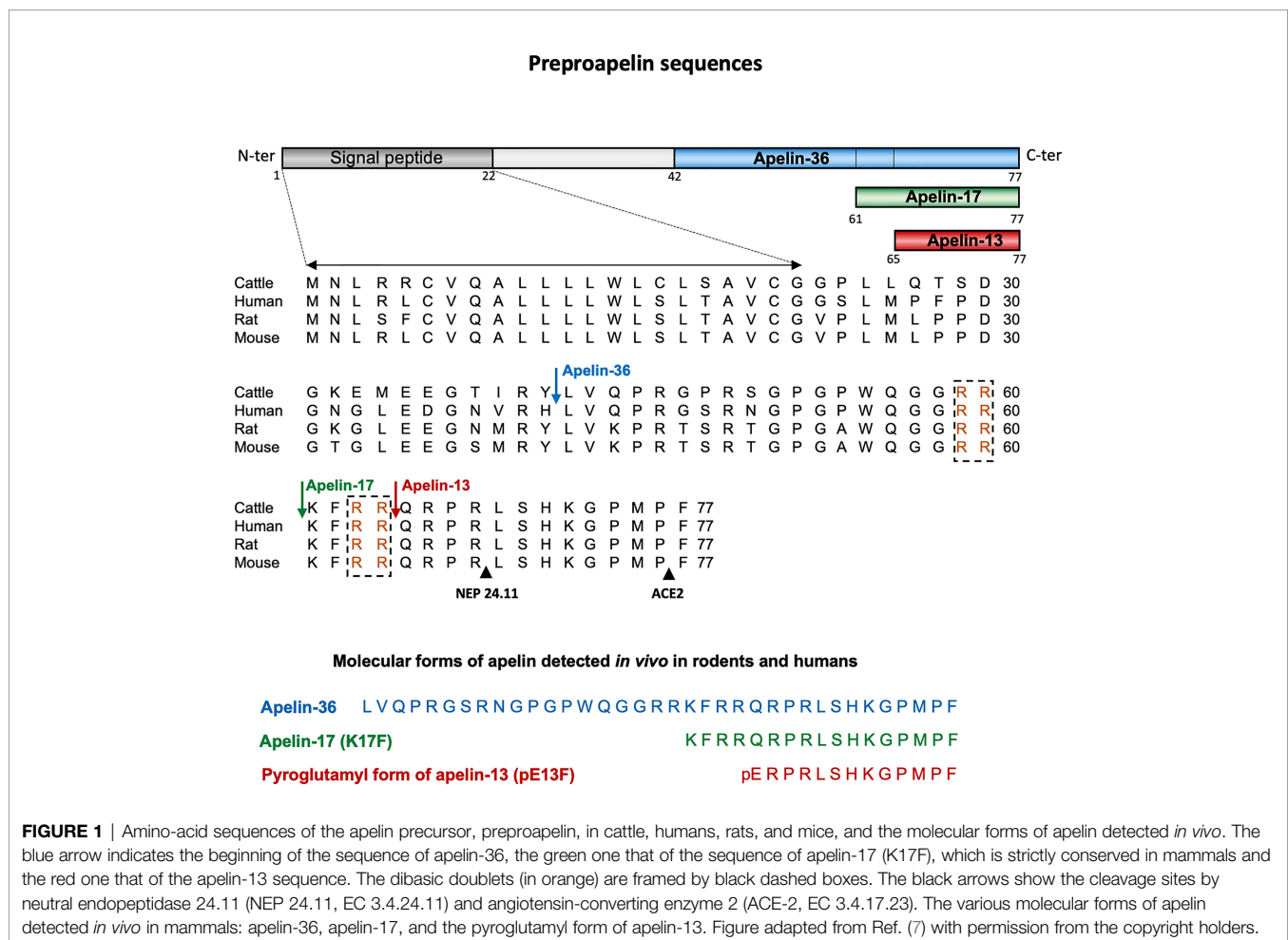
Apelin is generated from a 77-aa precursor, preproapelin (Figure 1). The human apelin gene contains three exons, with the coding region spanning exons 1 and 2. The 3' untranslated region also spans two exons (2 and 3) (8). This structure may account for the presence of transcripts of two different sizes (≈ 3 kb and ≈ 3.6 kb) in various tissues (3, 8). Alignment of the preproapelin aa sequences from cattle, humans, rats, and mice

revealed strict conservation of the C-terminal 17 aa (aa 61 to 77 of the preproapelin sequence), known as apelin-17 or K17F (Figure 1). Various molecular forms of apelin, differing only in length, are present *in vivo* (36, 17, or 13 aa at the C-terminal part of preproapelin) commonly called apelin-36, apelin-17, and apelin-13. Apelin-13 is naturally pyroglutamylated at its N-terminus (pyroglutamyl form of apelin-13 or pE13F) (4, 9–12) (Figure 1).

Pairs of basic residues are present within the cattle, human, rat, and mouse preproapelin sequences, leading to the suggestion that prohormone convertases are responsible for processing the precursor to generate K17F and pE13F. The proprotein convertase subtilisin/kexin 3 (also named furin) has been shown to cleave *in vitro* proapelin directly into apelin-13 without generating longer isoforms (13).

For apelin-36 (amino acids 42 to 77 of the preproapelin sequence), the maturation mechanism remains unclear because there are no dibasic motifs upstream from the apelin-36 cleavage site.

Apelin-36 predominates in rat lung, testis, uterus, and in bovine colostrum, whereas both apelin-36 and pE13F have been detected in rat mammary gland (4, 10). The predominant forms



of apelin in rat brain as well as in rat and human plasma are pE13F and K17F, with much lower concentrations of apelin-36 (11, 12). Apelin-13 is the most abundant form in the heart (14).

2.2 Metabolism of Apelin Peptides

The carboxypeptidase angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2, EC 3.4.17.23) removes the C-terminal phenylalanine residue of apelin-36, K17F or pE13F, both *in vitro* and *in vivo* (15, 16) (Figure 1). Moreover, it has recently been shown that neutral endopeptidase 24.11 or neprilysin (EC 3.4.24.11) hydrolyzes the scissile Arg⁸-Leu⁹ and Arg⁴-Leu⁵ peptide bonds of K17F and pE13F, respectively (Figure 1), generating two truncated peptides (17) unable to bind the ApelinR. NEP is, thus, the first protease shown to fully inactivate apelin. Synthetic analogs with the modified NEP degradation site (“RPRL” motif) have greater proteolytic stability *in vitro* while maintaining receptor affinities, highlighting the importance of this region for the full agonist activity of apelin (18).

3 ANOTHER ENDOGENOUS LIGAND FOR THE APELIN RECEPTOR: ELABELA/APELA

A second endogenous ligand of the ApelinR, apela (apelin receptor early endogenous ligand, also known as Elabela/Toddler (encoded by a gene on chromosome 4) was discovered in 2013 (19, 20). There is little sequence identity between apelin and apela, but both originate from precursors which are processed to generate several isoforms (21).

The gene for apela encoded a 54-amino acid precursor. The 22 aa signal peptide is removed to generate apela-32, which is secreted and bioactive (22, 23). The cleavage of apela-32 by furin to produce two fragments composed of 21 and 11 amino acids — apela-22 and apela-11, respectively — has been predicted (19, 20). The shortest C-terminal apela-11 fragment is fully conserved between species. Apela-32 and apela-22 display subnanomolar affinity for the ApelinR, whereas apela-11 is less active (22, 24). Apela is broadly expressed during development. In adults, apela mRNA levels are high in the prostate and kidney (25). In addition, the circulating apela in the bloodstream may originate at least partly from the endothelial cells of arterial vessels (22). For a review on apela see (21).

4 PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE APELIN RECEPTOR

The various molecular forms of apelin (apelin-36, K17F and pE13F) have subnanomolar affinities for the ApelinR (26, 27). Structure-function studies combining molecular modeling and site-directed mutagenesis have shown that the Arg², Arg⁴, and Lys⁸ residues of pE13F interact with acidic aa residues of the ApelinR, located at its surface: Glu 172, Asp 282 and Asp 92, respectively (28).

Numerous studies have described the ApelinR signaling pathways activated by the different molecular forms of apelin. Apelin-36, K17F, and pE13F have similar abilities (in the subnanomolar range) to inhibit forskolin-induced cAMP production in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells expressing the rat ApelinR and in Human Embryonic Kidney (HEK) cells expressing the human ApelinR (2, 9, 26, 29). Hosoya et al. showed that pertussis toxin blocked the inhibition of cAMP production induced by apelin-36 and pE13F, demonstrating the coupling of the ApelinR to G α_i (4). This finding was confirmed by Masri et al., who reported the preferential coupling of ApelinR to the G α_{i1} and G α_{i2} proteins (30, 31). Apelin-36, K17F, and pE13F also increase [Ca²⁺]_i mobilization in Ntera 2 human teratocarcinoma (NT2N) cells, in cells derived from basophils (RBL-2H3) and in HEK cells stably expressing the human ApelinR (26, 32–34). Moreover, Hus-Citharel et al. showed that K17F decreases (AngII)-induced [Ca²⁺]_i mobilization in glomerular arterioles through the production of nitric oxide (NO) (35). Interestingly, several studies have shown that the stimulation of the ApelinR by apelin (K17F, pE13F) induces vasodilation and modulates vascular tone through NO production (35–38).

Activation of the apelin/APJ system can also induce a cascade of intracellular signaling kinases that regulate cell function. In human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and in CHO cells expressing the mouse ApelinR, activation of the apelin/APJ system induces activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and the Extracellular Regulated Kinases (ERK1/2) pathways, stimulating phosphorylation of the S6 ribosomal protein kinase (p70S6K) (31, 39, 40). D’Aniello et al. showed that apelin induces phosphorylation of p70S6K in murine embryonic stem cells *via* an ERK1/2-dependent pathway (41). ERKs are phosphorylated in CHO cells stably expressing the mouse ApelinR in a G α_i -protein-dependent, protein kinase C (PKC)-dependent, and Ras-independent manner (30, 39).

Like most GPCRs, upon the binding of agonist ligands, the ApelinR elicits the recruitment of β -arrestins and their subsequent internalization through a clathrin-dependent mechanism (26, 27, 29, 34, 37, 42). Ser 348 at the C-terminus of the ApelinR has been identified as a crucial phosphorylation site for the interactions of this receptor with GRK2/5, β -arrestin1/2, and for its internalization (43). Furthermore, the C-terminal Phe residue of pE13F is embedded at the bottom of the binding site, in a hydrophobic cavity composed by Trp 152 in TMIV and Trp 259 and Phe 255 in TMVI (27).

Site-directed mutagenesis experiments revealed that Phe 255 and Trp 259, through their interactions with the C-terminal Phe residue of pE13F, were crucial for ApelinR internalization, but played no role in apelin binding or G α_i protein coupling. The C-terminal Phe residue of apelin is, thus, a key residue triggering ApelinR internalization (29, 44). Deletion of the C-terminal Phe residue of K17F (K16P) and the replacement of this residue with an alanine (K17A) strongly decrease the ability of the peptide to trigger ApelinR internalization, without affecting its affinity for the ApelinR or its ability to activate G α_i -coupling (16, 27, 29). All these data indicate functional

dissociation between ApelinR G_i -coupling and receptor internalization. This implies that the ApelinR exists in different active conformations, depending on the ligand fitting into the binding site, leading to the activation of different signaling pathways, and different subsequent biological effects (27). These findings suggest that ApelinR may display ‘functional selectivity’ or ‘biased signaling’, by coupling with G_i protein or recruiting β -arrestin 1 and 2. This hypothesis was confirmed by Ceraudo et al., who showed that K17F activates ERK1/2 in a β -arrestin-dependent and G_i protein-dependent manner, whereas K16P activates only the G_i protein (45). This functional selectivity of apelin peptides indicates that β -arrestin-dependent ERK1/2 activation, but not G_i -dependent signaling, may contribute to the decrease in blood pressure (BP) induced by K17F. Indeed, when pE13A and K16P are injected intravenously in rats, they lost their capacity to decrease arterial BP when compared with the corresponding natural peptides, pE13F and K17F (29, 46). Moreover, the internalized ApelinR/pE13F complex is rapidly recycled to the cell surface through a Rab4-dependent mechanism whereas the internalized ApelinR/apelin-36 complex is targeted for degradation in lysosomes by Rab7 (47), showing that the trafficking of the ApelinR depends upon the ligand used to activate the receptor. These differences are consistent with studies showing that apelin-36 induces sustained, strong desensitization of the ApelinR, whereas the desensitization induced by pE13F is transient (30). The apelin isoforms therefore display subtle differences in pharmacological properties, which may influence their physiological actions.

Moreover, like many GPCRs, ApelinR may also form heterodimers *in vitro* with other GPCRs. ApelinR has been shown to dimerize with the AngII type 1 receptor (AT1R), leading to an inhibition of AngII signaling by apelin (48–50). ApelinR may also heterodimerize with the κ -opioid receptor, leading to an increase in cell proliferation through an increase in PKC activity and a decrease in protein kinase A activity (51). In HUVEC cells, ApelinR has been shown to heterodimerize with bradykinin type 1 receptor, leading to an increase in cell proliferation and the phosphorylation of eNOs through a G_q protein-dependent PKC signaling pathway (52).

5 DISTRIBUTION OF APELIN AND ITS RECEPTOR

5.1 In the Brain

Preproapelin is heterogeneously distributed between different brain structures (3, 8, 10, 26, 53). The distribution of apelinergic neurons in the adult rat brain has been studied using a polyclonal antibody with a high affinity and selectivity for K17F, which also recognizes pE13F and apelin-36 (11, 37, 54). Apelin-immunoreactive (IR) neuronal cell bodies are abundant in the hypothalamus and the medulla oblongata. These structures are involved in neuroendocrine control, food intake and the regulation of BP. They are abundant in the supraoptic nucleus (SON), the magnocellular part of the paraventricular nucleus (PVN), the arcuate nucleus, the nucleus ambiguus and the lateral reticular nucleus (54) (Figure 2).

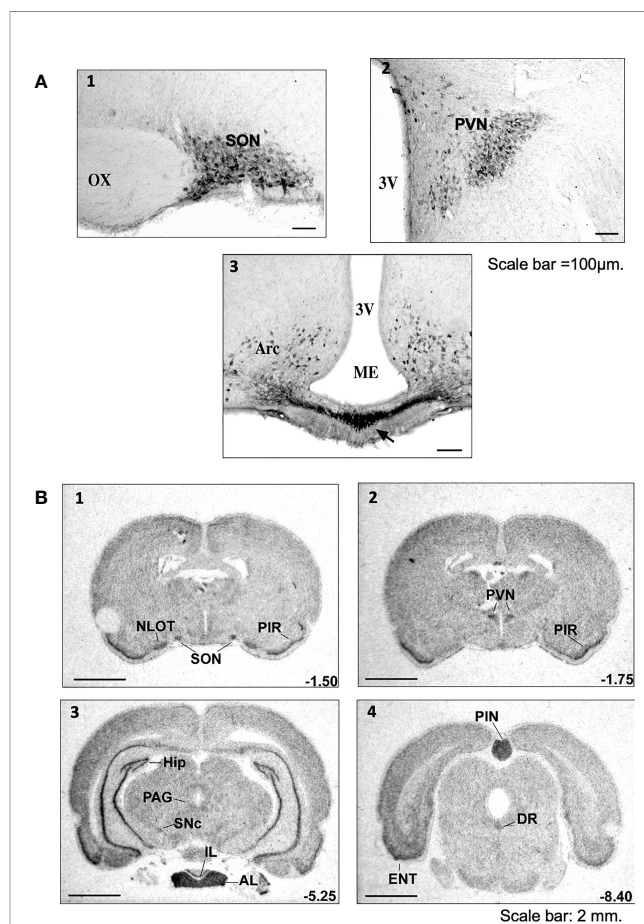


FIGURE 2 | Distribution of apelinergic neurons and apelin-R mRNA in the adult rat brain (A) Coronal sections illustrating the distribution of apelin-containing cell bodies and nerve fibers in (1) the SON, (2) the PVN and (3) the Arc and ME of colchicine-treated adult rats. In the SON, the apelin-immunoreactive neurons and the nerve fibers are concentrated mostly in the ventral part of the nucleus. In the PVN, apelin-positive cell bodies and nerve fibers are found mostly in the magnocellular part of the nucleus. Numerous neuronal cell bodies were observed within the Arc, together with a higher density of nerve fibers in the internal layer of ME than in the external layer. Scale bar = 100 μ m. Figure adapted from Ref. (11, 54) with permission from the copyright holders. (B) Distribution of the rat ApelinR mRNA expression in the adult rat brain. The figures were scanned directly from the X-ray film. Representative frontal sections, at anteriorities determined from the bregma indicated in the lower right corner, from 1 to 4, were hybridized with the ApelinR antisense cRNA probe. Scale bar: 2 mm. Figure adapted from Ref. (11) with permission from the copyright holders. AL, anterior lobe of the pituitary gland; Arc, arcuate nucleus of the hypothalamus; DR, dorsal raphe nucleus; ENT, entorhinal cortex; HIP, hippocampus; IL, intermediate lobe of the pituitary gland; ME, median eminence; NLOT, nucleus of the lateral olfactory tract; OX, optic chiasma; PAG, periaqueductal gray matter; PIN, pineal gland; PIR, piriform cortex; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; SNc, pars compacta of the substantia nigra; SON, supraoptic nucleus; 3V, third ventricle.

Conversely, the density of apelin-IR nerve fibers and nerve endings is high in the inner layer of the median eminence and in the posterior pituitary (37, 55), suggesting that, like magnocellular vasopressinergic and oxytocinergic neurons, the apelinergic neurons originating from the PVN and the SON project onto the posterior pituitary. Apelin was subsequently shown to colocalize with arginine-vasopressin (AVP) (11, 56) and oxytocin (55, 57) in

magnocellular neurons. Apelin-IR cell bodies and fibers have also been identified in the subfornical organ (SFO), the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) and the median preoptic nucleus, all of which are involved in controlling drinking behavior (58, 59).

The ApelinR is also widely distributed in the rat central nervous system (CNS) (2, 3, 8). ApelinR mRNA has been identified in the piriform and entorhinal cortices, the hippocampus, the pars compacta of the substantia nigra, the dorsal raphe nucleus and the locus coeruleus (Figure 2). The last three of these structures are known to contain the neuronal cell bodies from dopaminergic, serotonergic and noradrenergic neurons. High levels of apelinR mRNA have also been detected in the SON, PVN, arcuate nucleus, pineal gland and pituitary gland (2). Moreover, in the SON and PVN, the ApelinR (37, 60) and AVP receptor types 1a (V1a) and 1b (V1b), but not type 2 (V2-R) (61), are coexpressed by magnocellular AVP neurons. This finding provides strong evidence for the existence of an interaction between AVP and apelin.

5.2 In the Kidney

The mRNAs encoding preproapelin and ApelinR are expressed in rat and human kidney (3, 26). Apelin-like immunoreactivity has also been detected in human endothelial cells from small intrarenal vessels (62). Apelin expression has been detected in rat tubular epithelial cells, glomeruli and vascular epithelial cells (63), but another study reported restriction of apelin expression essentially to isolated cells in the medulla (64). An immunofluorescence study showed apelin to be present in the medullary collecting ducts (CD), with a distribution overlapping with that of aquaporin type 2 water channel (AQP2) (65).

ApelinR mRNA has been detected in the endothelial and vascular smooth muscle cells of rat glomerular arterioles (35). High levels of ApelinR mRNA are present in the glomeruli, reaching levels about eight times higher than those in nephron segments. Expression levels are moderate in all nephron segments (3, 35), including the collecting duct (CD), in which V2-R are also expressed (66). ApelinR mRNA levels are highest in the inner and outer stripes of the outer medulla (OM) and in the thick ascending limb (TAL) (35, 64, 65, 67).

6 MAINTENANCE OF WATER BALANCE BY APELIN AND VASOPRESSIN, THROUGH CENTRAL AND RENAL EFFECTS

6.1 Central Effects of Apelin on AVP Neuronal Activity, AVP Release and Diuresis

AVP, also known as antidiuretic hormone (ADH) is a peptide synthesized and released by hypothalamic magnocellular AVP neurons from the posterior pituitary into the bloodstream, in response to changes in plasma osmolality and volemia (68, 69) or under the influence of neurohormones, including natriuretic and

angiotensin peptides (70, 71). The colocalization of AVP, apelin, V1 and apelin receptors in magnocellular neurons suggests an interaction between apelin and AVP. This raises the possibility of an effect of apelin in response to osmotic or volemic stimuli. This hypothesis was checked in two animal models. Studies were first performed in the lactating rat, which displays magnocellular AVP neuron hyperactivity, leading to an increase in AVP synthesis and release, to preserve water of the organism for an optimal milk production for the newborns (72, 73). In this model, the intracerebroventricular (*i.c.v.*) administration of apelin (K17F) (11) inhibits the phasic electrical activity of the magnocellular AVP neurons, reduces the release of AVP into the bloodstream and increases diuresis, without modifying sodium and potassium excretion (Figure 3). The second model used was mice deprived of water for 24/48 h, a condition known to increase AVP neuron activity and systemic AVP release (75, 76). In this model, *i.c.v.* K17F administration decreased systemic AVP release (11). These results suggest that apelin is probably released from the SON and PVN AVP cell bodies and inhibits AVP neuron activity and release through direct action on the apelin autoreceptors expressed by AVP/apelin-containing neurons. This mechanism probably involves apelin acting as a natural inhibitor of the antidiuretic effect of AVP.

On the other hand, in the anterior pituitary, apelin is highly co-expressed in corticotrophs and to a much lower extent in somatotrophs, and a high expression of ApelinR mRNA is also found in corticotrophs (77). Moreover, apelin was shown to act as a stimulatory autocrine/paracrine-acting peptide on adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release, suggesting a role for apelin in the regulation of the hypothalamo-pituitary adrenal (HPA) axis. Since ACTH at the adrenal level is a major stimulus of glucocorticoid secretion (78) and glucocorticoids were shown to increase water excretion possibly *via* an inhibition of AVP release (79), the aquaretic effect of apelin could also involve this pathway.

6.2 Renal Effects of Apelin on AVP-Induced Water Reabsorption

In addition to its central action, the aquaretic effect of apelin may involve a renal action, since apelin and its receptor are both expressed in the kidney (3, 26, 35, 62). Consistent with the presence of ApelinR mRNA in juxtamedullary efferent (EA) and afferent (AA) arterioles, the application of K17F on glomerular arterioles precontracted by AngII treatment induced NO-dependent vasorelaxation by inhibiting the Ang-II induced increase in intracellular calcium mobilization (35). This apelin-dependent vasorelaxation observed in the muscular EA, which give rise to the vasa recta, should result in an increase in renal blood flow, contributing to an increase in diuresis (35).

By stimulating V2-R in CD, AVP is known to induce an increase in cAMP production and to activate protein kinase A, which phosphorylates the AQP2. This results in the insertion of phosphorylated AQP2 into the apical membrane of the principal cells of the CD (80, 81), leading to water reabsorption, decreasing diuresis and plasma osmolality (Figure 3). The presence of ApelinR mRNA in the CD (35,

AVP and APELIN : the YIN and the YANG of WATER BALANCE

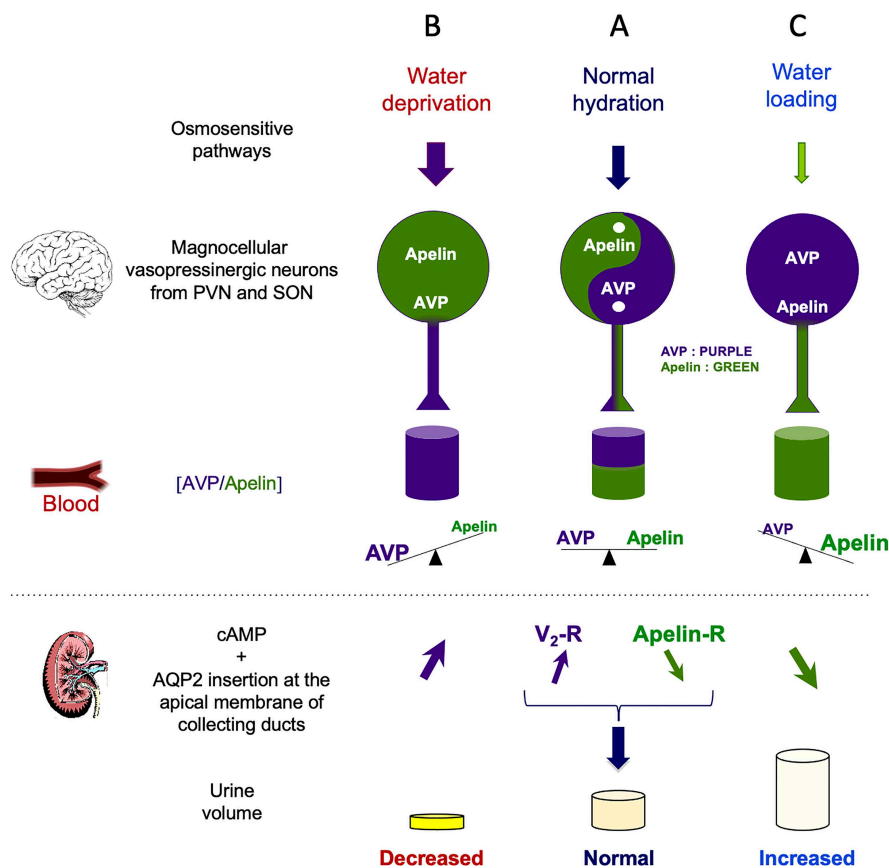


FIGURE 3 | Vasopressin (AVP) and apelin: the yin and yang of water balance **(A)** In physiological conditions, apelin (green) and AVP (purple) are released in balanced proportions from the magnocellular AVP neurons, at levels appropriate for plasma osmolality. In the collecting duct of the kidney, AVP acts on V₂-R to increase cAMP production and aquaporin-2 (AQP2) insertion into the apical membrane, leading to water reabsorption. Apelin has the opposite effect, through its action on the ApelinR. Water reabsorption is adequate in physiological conditions. **(B)** Following water deprivation in rodents: 1) AVP is released from magnocellular vasopressinergic neurons into the bloodstream more rapidly than it is synthesized, causing a depletion of AVP magnocellular neuronal content; 2) apelin release into the bloodstream decreases and apelin accumulates in magnocellular neurons. Thus, after dehydration, AVP and apelin are regulated in opposite manners, to facilitate systemic AVP release and suppress diuresis. **(C)** Following water loading in rodents: 1) AVP release is decreased from magnocellular vasopressinergic neurons into the bloodstream, causing an accumulation in AVP magnocellular neuronal content; 2) apelin release into the bloodstream increases, leading to a depletion of apelin magnocellular neuronal content. Thus, after water loading, AVP and apelin are regulated in opposite manners, to facilitate systemic apelin release and to increase aqueous diuresis. Figure adapted from Ref. (74) with permission from the copyright holders.

67) suggests that apelin could act as an aquaretic peptide through a direct action on this nephron segment. Consistent with this hypothesis, the intravenous injection of K17F in increasing doses in lactating rats or the continuous intravenous administration of apelin-13 administered for 24 h in alert male Sprague-Dawley alert rats (82) strongly increased diuresis in a dose-dependent manner, with a concomitant significant decrease in urine osmolality and no change in the excretion of Na⁺ and K⁺. Under these conditions, a significant decrease in apical AQP2 immunolabeling in the CD, with a corticomedullary gradient, was observed (83) (Figure 3). This finding is consistent with the inhibition, by K17F, in the medullary CD, of the cAMP production induced by (deamino-Cys¹,D-Arg⁸)-vasopressin (dDAVP), a specific

and selective V₂-R agonist (83). These findings suggest that apelin may act as an aquaretic peptide through direct action on CD. Further evidence in support of this conclusion was recently provided by studies in a highly differentiated mouse cortical CD cell line (mpkCCD) expressing the V₂-R and the ApelinR (84). The authors showed in this cell line that apelin-13 decreased the dDAVP-induced phosphorylation and apical membrane expression of AQP2 after 30–60 minutes of treatment, and decreased dDAVP-induced AQP2 mRNA and protein levels after 8–24 h of treatment (84). Furthermore, another study has shown that pE13F has diuretic effects potentially involving the cAMP/protein kinase A/soluble prorenin receptor pathway in the CD (85). Thus, the aquaretic effect of apelin is due not only to a central effect, inhibiting AVP release into the bloodstream,

but also to a direct effect of apelin in the kidneys, increasing renal blood flow and counteracting the antidiuretic effect of AVP mediated *via* the V2-R in CD (**Figure 3**).

These results also show that apelin and AVP have opposite effects on the CD, contributing to the control of plasma osmolality by regulating water reabsorption by the kidney.

These results are consistent with those of other studies reporting an aquaretic role of apelin in rodents (82, 84–87). In addition, apelin gene expression in the brain has also been reported to be hydration-sensitive (88). It must also be taken into account that Elabela/apela which has the same affinity as apelin for the apelinR, has been shown to stimulate urine output and water intake in adult rats (82, 87) suggesting that Elabela/apela may therefore play with apelin a role in the regulation of body fluid homeostasis.

Studies on ApelinR^{-/-} mice (89, 90) have shown that water deprivation significantly decreases urine volume (by 61%) and increases urine osmolality (by 59%) in wild-type mice, with similar, but non-significant changes observed in ApelinR^{-/-} mice (-25%, and +26% respectively), suggesting that the ApelinR^{-/-} mice did not concentrate their urine to the same extent as wild-type mice. This effect was not related to an inability of ApelinR^{-/-} mice to increase their plasma AVP levels following water deprivation. In normal hydration conditions, plasma AVP levels in ApelinR^{-/-} mice (23.3 pg/ml) were 40% lower than those in wild-type mice (39.5 pg/ml). Following water deprivation, plasma AVP levels in ApelinR^{-/-} and wild-type mice were similar (52.9 and 57.7 pg/ml respectively). This showed that water deprivation increased plasma AVP levels by 127% in ApelinR^{-/-} mice whereas only by 46% in wild-type mice.

The authors also showed that treatment with dDAVP increased urinary osmolality more efficiently (+29%) in wild-type mice than in ApelinR^{-/-} mice. These observations suggest that the defect in water metabolism observed in ApelinR^{-/-} mice is not due to a decrease in plasma AVP levels but may result from a deficiency at the kidney level, like a decrease in the density of renal V2-R binding sites or in the signaling response of the V2R which remains to be investigated. These data are not in line with the aquaretic effect of apelin and apelin analogs (38, 82, 83, 86, 87, 91) but it cannot be excluded that the total absence of ApelinRs during fetal and adult life could elicit compensatory mechanisms, leading to these opposite effects on urine output and urine osmolality.

6.3 Opposite Patterns of Vasopressin and Apelin Regulation Following Water Deprivation

6.3.1 In Rodents

The colocalization of apelin and AVP, and their opposite actions on diuresis raise questions about the regulation of these peptides to maintain body fluid homeostasis.

Following water deprivation in rodents, AVP is released into the bloodstream more rapidly than it is synthesized, causing a depletion of AVP neuronal content in magnocellular vasopressinergic neurons (92). In parallel, water deprivation decreases plasma apelin levels and induces an increase in apelin neuronal content in magnocellular vasopressinergic neurons (11, 56). Thus, following water deprivation, apelin

accumulates in the vasopressinergic neurons rather than being released. This increase in apelin neuronal content observed in dehydrated rats is markedly reduced by the *i.c.v.* administration of a selective V1 receptor antagonist, whereas the *i.c.v.* infusion of AVP has effects on neuronal apelin concentration similar to those of dehydration, this effect being selectively blocked by the co-administration of a V1 receptor antagonist (56). The apelin and AVP responses to dehydration are, therefore, opposite (11, 92). These results imply that AVP and apelin are released separately by the magnocellular vasopressinergic neurons by which they are produced. Consistent with this hypothesis, double-immunolabeling confocal microscopy studies have shown that a large proportion of apelin immunoreactivity colocalizes with AVP in magnocellular neurons in the SON and the PVN, although these two peptides are found in different subcellular compartments (11, 56).

These studies show that the cross-regulation of apelin and AVP, in response to osmotic stimuli, has a physiological purpose: the maintenance of water balance in the body, through the prevention of water excretion by the kidney after water deprivation, and the promotion of water excretion after water loading.

6.3.2 In Humans

Such cross-regulation of apelin and AVP in response to osmotic stimuli has also been studied in humans. The relationship between osmolality and plasma concentrations of apelin and AVP was investigated in healthy volunteers (12) after the infusion of hypertonic saline for 2 h to increase plasma osmolality or after 30 minutes of oral water loading to decrease plasma osmolality.

Increases in plasma osmolality were accompanied by a simultaneous increase in plasma AVP levels and a decrease in plasma apelin levels. Conversely, decreases in plasma osmolality led to lower plasma AVP levels and a rapid increase in plasma apelin levels (12). These observations are consistent with plasma osmolality acting as a major physiological regulator of plasma apelin levels in humans. Furthermore, the opposite patterns of apelin and AVP regulation by osmotic stimuli in humans are consistent with findings for rodents subjected to water deprivation. This strongly suggests that, like AVP, apelin participates in the maintenance of body fluid homeostasis in humans, as it does in rodents. Apelin and AVP can therefore be seen as the yin and yang of body fluid homeostasis.

7 THE APELIN/AVP BALANCE AND HYPONATREMIA

7.1 Hyponatremia

Hyponatremia, defined by a plasma sodium concentration below 135 mmol/l, is the most common electrolyte disorder in hospitalized patients. Various conditions have been associated with hyponatremia, including chronic heart failure, chronic kidney disease, liver cirrhosis, diuretic treatment and the Syndrome of Inappropriate Antidiuresis (SIAD), in which AVP secretion occurs in the absence of an osmotic or hemodynamic

abnormality (93). It is important to recognize hyponatremia, because this condition is associated with high mortality rates (94–96) and can be a marker of underlying disease.

7.2 Syndrome of Inappropriate Antidiuresis

SIAD, previously known as the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH), is the most frequent cause of hyponatremia. Many clinical conditions may cause SIAD, including tumors, which may secrete AVP ectopically, central nervous system disorders and pulmonary diseases. SIAD may also result from the induction of increases in AVP secretion by various drugs, including tricyclic antidepressants, serotonin reuptake inhibitors and opiates, and/or from potentiation of the effects of AVP by drugs such as carbamazepine, chlorpropamide and non-steroidal anti-inflammatory drugs (97).

In SIAD, plasma AVP levels increase in a manner that is inappropriate relative to plasma osmolality (93). By acting on V2-R present in the CD of kidneys, the increased AVP levels stimulate cAMP production, leading to the insertion of AQP2 into the apical membrane of CD, resulting in higher levels of water reabsorption, lower levels of diuresis, and hyponatremia. Hyponatremia causes water entry into the cells due to the hypotonic state (98). Its symptoms result mostly from the enlargement of cells in the central nervous system, and their severity is dependent on serum sodium concentration. Severe symptoms, such as coma, convulsions, and respiratory arrest are usually associated with acute-onset severe hyponatremia. Less severe symptoms, such as headache, irritability, nausea/vomiting, mental slowing, and confusion, are observed in chronic hyponatremia (99).

Plasma apelin and AVP levels are regulated in opposite manners by osmotic stimuli in healthy subjects; this observation led to investigate the apelin response to the AVP osmoregulation defect in SIAD (100). In SIAD patients, sex- and age-adjusted plasma levels for apelin and copeptin (a biomarker of AVP release into the bloodstream in humans) are 26% and 75% higher, respectively, than those in healthy subjects (100). In 86% of SIAD patients, the plasma apelin/copeptin ratio lies outside the predicted range, highlighting the primary osmoregulatory defect in these patients. The abnormal apelin/AVP balance in hyponatremic SIAD patients may contribute to water retention (100). This has led to hypothesize that activation of the ApelinR with an ApelinR agonist might counteract AVP-induced water reabsorption, thereby correcting hyponatremia.

7.3 Effects of the Metabolically Stable Apelin-17 Analog LIT01-196 in an Experimental Model of Hyponatremia

7.3.1 Development and Pharmacological Properties of LIT01-196

Endogenous apelin peptides have a short half-life *in vivo*. Gerbier et al. showed that K17F and pE13F have half-lives in mouse plasma of 4.6 and 7.2 minutes, respectively (38), and Murza et al. showed that pE13F has a half-life of 14 minutes in rat plasma (101). For apelin-36, Japp et al. suggested, based on experiments conducted in healthy

human subjects, that the half-life of apelin-36 is less than five minutes (102). The half-life of K17F *in vivo* in the bloodstream after intravenous administration is 44 s in mice and 50 s in rats (86). These short half-lives result from the rapid metabolism of apelins by enzymes, such as ACE2 and NEP 24.11 (16, 17).

The short half-life of apelin *in vivo* has encouraged the development of metabolically stable apelin analogs for potential therapeutic applications. Numerous approaches (Table 1), such as PEGylation (107–109, 112, 113), synthetic modifications to the RPRL motif of apelin (18), palmitoylation and the use of unnatural amino acids (38, 103, 107, 114, 115), or main-chain modifications (cyclization) (106, 116, 117), have now been used to increase the half-life of apelin peptides. Recent studies have reported the development of nonpeptidic ApelinR agonists that mimic the signaling properties of apelin, some of them are orally active (Table 1) (104, 110, 111).

Most studies aiming to develop apelin analogs have focused on pE13F (38, 103, 105, 106, 115–117) and apelin-36 (108, 109, 112) (Table 1). However, K17F, which has an affinity 10 times higher than that of pE13F for human ApelinR, induces β -arrestin recruitment and the internalization of the rat ApelinR 10 to 30 times more strongly than pE13F, and also decreases arterial BP more effectively (29, 38).

Following these findings, metabolically stable K17F analogs have recently been developed (38, 107). Gerbier et al. used an original strategy for improving the protection of endogenous peptides against enzymatic degradation, based on the introduction of a fluorocarbon chain (FC) directly into the N-terminal part of K17F, generating LIT01-196 (Figure 4). This compound has a high affinity for the ApelinR ($K_i = 0.08$ nM) and is much more stable in plasma (half-life >24 h) than K17F (4.6 min). LIT01-196 is remarkably resistant to plasma degrading-enzymes, with >90% of the peptide remaining unmodified after 24 h of incubation with mouse plasma at 37°C. LIT01-196 displays full agonist activity for cAMP production, ERK1/2 phosphorylation (nanomolar range), β -arrestin recruitment and the induction of ApelinR internalization (subnanomolar range) (38). Moreover, LIT01-196 has an *in vivo* half-life of 28 min in the bloodstream (*versus* 50 sec for K17F) after intravenous administration and 156 min after *s.c.* administration in alert control rats and was shown not to enter the brain after *s.c.* administration (38). The increase of the *in vivo* half-life of LIT01-196 in the blood circulation is probably due to the 69% binding of LIT01-196 to plasma proteins leading to the protection from enzymatic degradation and the reduction of renal clearance (38).

7.3.2 Effects of LIT01-196 on AVP Release and AVP-Induced Antidiuresis in Control Animals

The central administration of LIT01-196 significantly decreases dehydration-induced systemic AVP release, and is 160 times more effective than K17F (38). These data suggest that LIT01-196 after *i.c.v.* injection, like K17F, rapidly reaches the hypothalamic structures, the PVN and the SON, to stimulate the ApelinR expressed by AVP neurons, inhibit AVP release into the bloodstream and increase diuresis.

The effects of LIT01-196 were then investigated at the kidney level. First, *in vitro* in mpkCCD cells, LIT01-196 decreases

TABLE 1 | Development of Apelin-R agonists.

	Affinity (K_i, nM)	cAMP production inhibition (IC₅₀, nM)	β-arrestin (EC₅₀, nM)	Ex vivo half-life in plasma (min)	In vivo half-life in bloodstream (min)	Diuresis
PEPTIDIC ApelinR AGONISTS						
Apelin-13/pE13F and pE13F analogs						
pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F (38, 82, 101, 103, 104)	0.5	1.8	68 - 300	~ 10	<1 after iv route	+ (82, 87, 91)
pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F(L-αCH ₃) (101, 105)	0.3	0.07	–	> 120	–	–
MM07: Cyclo(1-6)C-R-P-R-L-C-H-K-G-P-M-P (106)	300	–	2130	–	17	–
pE-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-1Nal-D-α-Me-Y(OBn) (103)	0.08	3.8	36	438	26	–
Apelin-17 (K17F) and K17F analogs						
K17F: K-F-R-R-Q-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F (38, 86)	0.06	0.30	15	4.6	<1 after iv route	+ (83)
Fmoc-(PEG) ₆ -NMeLeu-17A2 (107)	0.55	–	–	1620	–	–
P92: Ac-K-F-(D)R-R-(D)Q-R-P-R-(D)L-S-Aib-K-(D)A-P-Nle-P-4Br(F) (38)	0.09	0.56	4	24	–	++ (38)
LIT01-196: CF ₃ (CF ₂) ₇ (CH ₂) ₂ C(O)-K-F-R-R-Q-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F (38, 86)	0.08	1.71	16	> 1440	156 after sc route	++ (38, 86)
Apelin-36 and apelin-36 analogs						
Apelin-36: L-V-Q-P-R-G-S-R-N-G-P-G-P-W-Q-G-R-R-K-F-R-R-Q-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F (4, 9, 46, 102)	2.4	0.5	–	–	< 5	–
40kDa-PEG-Apelin-36 (108, 109)	0.3	1.7	2	–	~ 20	–
NON-PEPTIDIC ApelinR AGONISTS						
CMF-019 (104)	2.6	0.1	224	38	–	–
AMG 986 (110)	–	0.23	0.25	–	144 after iv route Orally active	–
BMS-986224 (111)	0.07	0.02	7.9	–	Orally active	–

-, not determined; G, glycine; P, proline; A, alanine; V, valine; L, leucine; I, isoleucine; M, methionine; C, cysteine; F, phenylalanine; Y, tyrosine; W, tryptophan; H, histidine; K, lysine; R, arginine; Q, glutamine; N, asparagine; E, glutamic acid; D, aspartic acid; S, serine; T, threonine; Aib, aminoisobutyric acid; Y(OBn), tyrosine(Obenzyl); Nle, norleucine; 1Nal, 1-naphthylalanine; 4Br(F), 4-bromo-phenylalanine; PEG, polyethyleneglycol; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl.

dDAVP-induced cAMP production and apical cell surface expression of phosphorylated AQP2. These data suggested that systemic LIT01-196 administration in rats could induce like K17F an increase in aqueous diuresis. Indeed, LIT01-196 and tolvaptan (a V2-R) used as a reference aquaretic agent, administered at an equimolar dose of 900 nmol/kg by *s.c.* route, increase 24 h urine output similarly, by 79% and 77%, respectively, and decrease urinary osmolality by 52% and 40%, respectively, in control rats with normal natremia (86). This increase in urine output is associated with a significant increase in water intake in the tolvaptan group (+37%) and a slight increase in water intake in the LIT01-196 group (+11%). The sodium excretion fraction is unaffected by the administration of LIT01-196 or tolvaptan (86). These data suggest that LIT01-196 inhibits AVP-induced cAMP production in the CD, thereby inhibiting the insertion of AQP2 into the apical membrane, inhibiting water reabsorption by the kidney and increasing aqueous diuresis (Figure 4). Moreover, repeated *s.c.* administrations of LIT01-196 are not associated with renal failure or histological alterations of the kidney, and no change in plasma sodium, potassium, and glucose levels are observed in control rats (86).

On the other hand, LIT01-196 induces, like K17F, a vasorelaxation of the rat juxtamedullary arterioles that give rise to the vasa recta (38), suggesting that LIT01-196 can, like K17F, increase medullary blood flow and, therefore, diuresis (35). Thus, through its central and renal effects, LIT01-196 appears to be an effective aqueous diuretic of potential value for the treatment of water retention and hyponatremia.

7.3.3 Effects of LIT01-196 on AVP-Induced Antidiuresis in an Experimental Model of Hyponatremia

In rats, the continuous *s.c.* infusion of AVP (30 ng/h) for four days, together with a semi-liquid diet, led to a decrease in urine output, an increase in urine osmolality and a decrease in plasma sodium levels, which stabilized at about 100 mmol/l for two to four days after the initiation of infusion.

The administration of LIT01-196 (900 nmol/kg, *s.c.*) for two days in this rat model of hyponatremia, by re-establishing the “AVP/(apelin + LIT01-196)” balance, inhibited the effects of AVP on urine output and urine osmolality effectively, and induced a progressive correction of plasma sodium levels (86) (Figure 4). In addition, chronic treatment with LIT01-196 is not associated with renal failure or histological alterations of the kidney, and no change in plasma sodium, potassium, and glucose levels is observed in control rats.

As expected from previous work (118), tolvaptan at the same equimolar dose (900 nmol/kg) also inhibits the antidiuretic effect of AVP. However, increasing the dose of tolvaptan results in an even larger increase in urine output, whereas increasing the dose of LIT01-196 did not. It can, therefore, be hypothesized that activating the ApelinR with a metabolically stable apelin analog, thereby re-establishing the apelin/AVP balance in the CD, rather than blocking the effects of AVP with V2-R antagonists, may result in less severe polyuria and may be better tolerated than V2-R antagonists. Moreover treatment by metabolically stable apelin analogs, may be also useful for the treatment of autosomal dominant polycystic

AQP-2 at the apical membrane of collecting duct cells, thus decreasing water reabsorption and increasing urine output (84, 86).

This remains to be evaluated in further experimental studies and clinical trials. The various physiological effects associated with ApelinR activation result from the activation of different signaling pathways. The development of biased metabolically stable apelin-17 analogs targeting only the Gi signaling pathway might, therefore, increase their specificity of action for water metabolism.

8 CARDIOVASCULAR ACTIONS OF APELIN

Apelin has a wide range of physiological effects. Apelin plays a role in the cardiovascular system, acting on the endothelium of human mammary artery, human splanchnic arteries or rat glomerular arterioles and inducing vasodilation by increasing nitric oxide (NO) (35, 133, 134). In contrast, apelin exerts a direct vasoconstrictive effect on vascular smooth muscle cells in endothelium-denuded arteries (14, 135–137). Several *in vivo* studies have reported that different apelin analogs or apelinomimetics induce a rapid and dose-dependent reduction in BP, always mediated by NO (22, 29, 36, 46, 133, 138). This vasodilatory effect has also been observed in humans, where infusions of apelin-13 and apelin-36 result in a dose-dependent and NO-dependent arteriolar vasodilation in the forearm (106, 139). In healthy volunteers, apelin-13 induces a decrease in arterial BP, peripheral vascular resistance and induced a slight increase in heart rate which was probably a compensatory effect to the decrease in BP (102).

At the cardiac level, apelin is the most potent endogenous positive inotropic peptide discovered to date (140–142). Apelin reduces cardiac preload and afterload (143). Apelin also increases conduction velocity in cardiomyocytes and induces a shortening of action potential in atrial myocytes (144, 145). Apelin potently inhibited AngII-induced atrial fibrosis and subsequent vulnerability to atrial fibrillation induction (146). Administration of apelin or a small molecule apelinR agonist increases cardiac output *in vivo* in rodents (111, 147). Administration of apelin or apelin analogs in rodents post-myocardial infarction improved functional recovery and reduced infarct size, most likely due to increase NO production and angiogenesis (110, 148–150). Administration of apelin for 2 weeks after aortic banding prevented cardiac remodeling by inhibiting myocyte hypertrophy, cardiac fibrosis and ventricular dysfunction (151). In heart failure patients, acute administration of apelin, by intravenous route, increases cardiac output and left ventricular ejection fraction while reducing blood pressure and vascular resistance (102, 152). Apelin-knockout mice develop progressive impairment of cardiac contractility associated with systolic dysfunction in the absence of histological abnormalities. Importantly, pressure overload-induced heart failure is also more severe in apelin-deficient mice (153). Moreover, infusion of apelin using osmotic minipumps for 2 weeks in apelin-deficient mice restored the impaired cardiac function to that of wild-type mice (154).

Therefore, the use of ApelinR agonists may constitute a new therapeutic approach for the treatment of heart failure by increasing aqueous diuresis and cardiac contractility while decreasing vascular resistance.

9 CONCLUSION AND PERSPECTIVES

The identification of apelin as the endogenous ligand of the orphan receptor APJ constituted an important step in basic research, with clinical implications. In animal models, experimental data have shown that the central injection of apelin into lactating rats inhibits the phasic electrical activity of AVP neurons, reduces plasma AVP levels, and increases aqueous diuresis. In the kidney, apelin increases aqueous diuresis by increasing renal blood flow and by counteracting the antidiuretic effect of AVP in the kidney at the tubular level. Following water deprivation or dehydration, in humans and rodents, AVP and apelin are conversely regulated, to facilitate systemic AVP release and to prevent additional water loss in the kidney. Moreover following water loading, AVP and apelin display an opposite pattern of regulation to facilitate systemic apelin release and increase aqueous diuresis to re-establish a water balance face to water overload. The available data show that AVP and apelin play a crucial role in maintaining body fluid homeostasis in humans and rodents. SIAD patients have an altered apelin-to-copeptin balance, contributing to the water metabolism defect. Apelin-R activation by a metabolically stable apelin-17 analog, LIT01-196, may constitute a promising therapeutic approach for the treatment of SIAD, by inhibiting the antidiuretic effect of AVP, increasing urine output, decreasing urine osmolality, moderately enhancing water intake, and progressively correcting hyponatremia.

AUTHOR NOTES

All appropriate permissions have been obtained from the copyright holders of **Figures 1–4**, which have been adapted and reproduced for this manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

FUNDING

These studies were supported by INSERM [Annual dotation], including the financial support for Proof of Concept, CoPoc Apelinatremia 2015–2017 from INSERM Transfert, the CNRS, the *Collège de France*, the *Agence Nationale de la Recherche* ANR-16-CE18-0030, FluoroPEP) and the *Federation Française de Cardiologie*. PEGS was supported by a fellowship from the *Fondation pour la Recherche Médicale*, grant number “PBR201810007643”. AF was supported by the fellowship from INSERM (Poste d’Accueil pour Hospitaliers).

REFERENCES

- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, et al. A Human Gene That Shows Identity With the Gene Encoding the Angiotensin Receptor Is Located on Chromosome 11. *Gene* (1993) 136:355–60. doi: 10.1016/0378-1119(93)90495-0
- De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortès C. Cloning, Pharmacological Characterization and Brain Distribution of the Rat Apelin Receptor. *Neuroendocrinology* (2000) 72:400–7. doi: 10.1159/000054609
- O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ. Distribution of mRNA Encoding B78/apj, the Rat Homologue of the Human APJ Receptor, and Its Endogenous Ligand Apelin in Brain and Peripheral Tissues. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1492:72–80. doi: 10.1016/s0167-4781(00)00072-5
- Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, et al. Molecular and Functional Characteristics of APJ. Tissue Distribution of mRNA and Interaction With the Endogenous Ligand Apelin. *J Biol Chem* (2000) 275:21061–7. doi: 10.1074/jbc.M908417199
- Devic E, Rizzotti K, Bodin S, Knibiehler B, Audigier Y. Amino Acid Sequence and Embryonic Expression of Msr/APj, the Mouse Homolog of Xenopus X-Msr and Human APJ. *Mech Dev* (1999) 84:199–203. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00081-7
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, et al. Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochem Biophys Res Commun* (1998) 251:471–6. doi: 10.1006/bbrc.1998.9489
- Galanth C, Hus-Citharel A, Li B, Llorens-Cortès C. Apelin in the Control of Body Fluid Homeostasis and Cardiovascular Functions. *Curr Pharm Des* (2012) 18:789–98. doi: 10.2174/138161212799277770
- Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, et al. Characterization of Apelin, the Ligand for the APJ Receptor. *J Neurochem* (2000) 74:34–41. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x
- Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, et al. Apelin, the Natural Ligand of the Orphan Receptor APJ, is Abundantly Secreted in the Colostrum. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1452:25–35. doi: 10.1016/s0167-4889(99)00114-7
- Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, et al. Molecular Properties of Apelin: Tissue Distribution and Receptor Binding. *Biochim Biophys Acta* (2001) 1538:162–71. doi: 10.1016/s0167-4889(00)00143-9
- De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, et al. Apelin, a Potent Diuretic Neuropeptide Counteracting Vasopressin Actions Through Inhibition of Vasopressin Neuron Activity and Vasopressin Release. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101:10464–9. doi: 10.1073/pnas.0403518101
- Azizi M, Iturrioz X, Blanchard A, Peyrard S, De Mota N, Chartrel N, et al. Reciprocal Regulation of Plasma Apelin and Vasopressin by Osmotic Stimuli. *J Am Soc Nephrol* (2008) 19:1015–24. doi: 10.1681/ASN.2007070816
- Shin K, Pandey A, Liu X-Q, Anini Y, Rainey JK. Preferential Apelin-13 Production by the Proprotein Convertase PCSK3 is Implicated in Obesity. *FEBS Open Bio* (2013) 3:328–33. doi: 10.1016/j.fob.2013.08.001
- Maguire JJ, Kleinz MJ, Pitkin SL, Davenport AP. [Pyr1]apelin-13 Identified as the Predominant Apelin Isoform in the Human Heart: Vasoactive Mechanisms and Inotropic Action in Disease. *Hypertension* (2009) 54:598–604. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134619
- Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase. *J Biol Chem* (2002) 277:14838–43. doi: 10.1074/jbc.M200581200
- Wang W, McKinnie SMK, Farhan M, Paul M, McDonald T, McLean B, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: Physiological Effects in the Cardiovascular System. *Hypertension* (2016) 68:365–77. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06892
- McKinnie SMK, Fischer C, Tran KMH, Wang W, Mosquera F, Oudit GY, et al. The Metalloprotease Nephilysin Degrades and Inactivates Apelin Peptides. *Chembiochem* (2016) 17:1495–8. doi: 10.1002/cbic.201600244
- McKinnie SMK, Wang W, Fischer C, McDonald T, Kalin KR, Iturrioz X, et al. Synthetic Modification Within the “RPRL” Region of Apelin Peptides: Impact on Cardiovascular Activity and Stability to Nephilysin and Plasma Degradation. *J Med Chem* (2017) 60:6408–27. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00723
- Chng SC, Ho L, Tian J, Reversade B. ELABELA: A Hormone Essential for Heart Development Signals via the Apelin Receptor. *Dev Cell* (2013) 27:672–80. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.002
- Pauli A, Norris ML, Valen E, Chew G-L, Gagnon JA, Zimmerman S, et al. Toddler: An Embryonic Signal That Promotes Cell Movement via Apelin Receptors. *Science* (2014) 343:1248636. doi: 10.1126/science.1248636
- Read C, Nyimanu D, Williams TL, Huggins DJ, Sulentic P, Macrae RGC, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVII. Structure and Pharmacology of the Apelin Receptor With a Recommendation That Elabela/Toddler Is a Second Endogenous Peptide Ligand. *Pharmacol Rev* (2019) 71:467–502. doi: 10.1124/pr.119.017533
- Yang P, Read C, Kuc RE, Buonincontri G, Southwood M, Torella R, et al. Elabela/Toddler Is an Endogenous Agonist of the Apelin APJ Receptor in the Adult Cardiovascular System, and Exogenous Administration of the Peptide Compensates for the Downregulation of Its Expression in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* (2017) 135:1160–73. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023218
- Soulet F, Bodineau C, Hooks KB, Descarpentrie J, Alves I, Dubreuil M, et al. ELA/APELA Precursor Cleaved by Furin Displays Tumor Suppressor Function in Renal Cell Carcinoma Through Mtorc1 Activation. *JCI Insight* (2020) 5:129070. doi: 10.1172/jci.insight.129070
- Couvineau P, Llorens-Cortés C, Iturrioz X. Elabela/Toddler and Apelin Bind Differently to the Apelin Receptor. *FASEB J* (2020) 34:7989–8000. doi: 10.1096/fj.201903029R
- Chen H, Wang L, Wang W, Cheng C, Zhang Y, Zhou Y, et al. ELABELA and an ELABELA Fragment Protect Against AKI. *J Am Soc Nephrol* (2017) 28:2694–707. doi: 10.1681/ASN.2016112120
- Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, et al. Pharmacological and Immunohistochemical Characterization of the APJ Receptor and its Endogenous Ligand Apelin. *J Neurochem* (2003) 84:1162–72. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01587.x
- Iturrioz X, Gerbier R, Leroux V, Alvear-Perez R, Maigret B, Llorens-Cortés C. By Interacting With the C-Terminal Phe of Apelin, Phe255 and Trp259 in Helix VI of the Apelin Receptor Are Critical for Internalization. *J Biol Chem* (2010) 285:32627–37. doi: 10.1074/jbc.M110.127167
- Gerbier R, Leroux V, Couvineau P, Alvear-Perez R, Maigret B, Llorens-Cortés C, et al. New Structural Insights Into the Apelin Receptor: Identification of Key Residues for Apelin Binding. *FASEB J* (2015) 29:314–22. doi: 10.1096/fj.14-256339
- El Messari S, Iturrioz X, Fassot C, De Mota N, Roesch D, Llorens-Cortés C. Functional Dissociation of Apelin Receptor Signaling and Endocytosis: Implications for the Effects of Apelin on Arterial Blood Pressure. *J Neurochem* (2004) 90:1290–301. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02591.x
- Masri B, Morin N, Pedebnarde L, Knibiehler B, Audigier Y. The Apelin Receptor is Coupled to Gi1 or Gi2 Protein and Is Differentially Desensitized by Apelin Fragments. *J Biol Chem* (2006) 281:18317–26. doi: 10.1074/jbc.M600606200
- Bai B, Tang J, Liu H, Chen J, Li Y, Song W. Apelin-13 Induces ERK1/2 But Not P38 MAPK Activation Through Coupling of the Human Apelin Receptor to the Gi2 Pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* (2008) 40:311–8. doi: 10.1111/j.1745-7270.2008.00403.x
- Choe W, Albright A, Sulcove J, Jaffer S, Hesselgesser J, Lavi E, et al. Functional Expression of the Seven-Transmembrane HIV-1 Co-Receptor APJ in Neural Cells. *J Neurovirol* (2000) 6(Suppl 1):S61–69.
- Zhou N, Fan X, Mukhtar M, Fang J, Patel CA, DuBois GC, et al. Cell-Cell Fusion and Internalization of the CNS-Based, HIV-1 Co-Receptor, APJ. *Virology* (2003) 307:22–36. doi: 10.1016/s0042-6822(02)00021-1
- Zhou N, Zhang X, Fan X, Argyris E, Fang J, Acheampong E, et al. The N-Terminal Domain of APJ, a CNS-Based Coreceptor for HIV-1, is Essential for Its Receptor Function and Coreceptor Activity. *Virology* (2003) 317:84–94. doi: 10.1016/j.virol.2003.08.026
- Hus-Citharel A, Bouby N, Frugière A, Bodineau L, Gasc J-M, Llorens-Cortés C. Effect of Apelin on Glomerular Hemodynamic Function in the Rat Kidney. *Kidney Int* (2008) 74:486–94. doi: 10.1038/ki.2008.199
- Tatemoto K, Takayama K, Zou M-X, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, et al. The Novel Peptide Apelin Lowers Blood Pressure via a Nitric Oxide-

- Dependent Mechanism. *Regul Peptides* (2001) 99:87–92. doi: 10.1016/S0167-0115(01)00236-1
37. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, et al. Physiological Role of a Novel Neuropeptide, Apelin, and Its Receptor in the Rat Brain. *J Neurochem* (2001) 77:1085–96. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00320.x
 38. Gerbier R, Alvear-Perez R, Margathe J-F, Flahault A, Couvineau P, Gao J, et al. Development of Original Metabolically Stable Apelin-17 Analogs With Diuretic and Cardiovascular Effects. *FASEB J* (2017) 31:687–700. doi: 10.1096/fj.201600784R
 39. Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases via a PTX-Sensitive G Protein. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 290:539–45. doi: 10.1006/bbrc.2001.6230
 40. Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, et al. Hypoxia-Induced Apelin Expression Regulates Endothelial Cell Proliferation and Regenerative Angiogenesis. *Circ Res* (2008) 103:432–40. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.179333
 41. D'Aniello C, Lonardo E, Iaconis S, Guardiola O, Liguoro AM, Liguori GL, et al. Minchiotti G. G Protein-Coupled Receptor APJ and Its Ligand Apelin Act Downstream of Cripto to Specify Embryonic Stem Cells Toward the Cardiac Lineage Through Extracellular Signal-Regulated Kinase/P70s6 Kinase Signaling Pathway. *Circ Res* (2009) 105:231–8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201186
 42. Evans NA, Groarke DA, Warrack J, Greenwood CJ, Dodgson K, Milligan G, et al. Visualizing Differences in Ligand-Induced Beta-Arrestin-GFP Interactions and Trafficking Between Three Recently Characterized G Protein-Coupled Receptors. *J Neurochem* (2001) 77:476–85. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00269.x
 43. Chen X, Bai B, Tian Y, Du H, Chen J. Identification of Serine 348 on the Apelin Receptor as a Novel Regulatory Phosphorylation Site in Apelin-13-Induced G Protein-Independent Biased Signaling. *J Biol Chem* (2014) 289:31173–87. doi: 10.1074/jbc.M114.574020
 44. Besserer-Offroy É, Bérubé P, Côté J, Murza A, Longpré J-M, Dumaine R, et al. The Hypotensive Effect of Activated Apelin Receptor is Correlated With β -Arrestin Recruitment. *Pharmacol Res* (2018) 131:7–16. doi: 10.1016/j.phrs.2018.02.032
 45. Ceraudo E, Galanth C, Carpentier E, Banegas-Font I, Schonegge A-M, Alvear-Perez R, et al. Biased Signaling Favoring Gi Over β -Arrestin Promoted by an Apelin Fragment Lacking the C-Terminal Phenylalanine. *J Biol Chem* (2014) 289:24599–610. doi: 10.1074/jbc.M113.541698
 46. Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF. Modification of the Terminal Residue of Apelin-13 Antagonizes Its Hypotensive Action. *Endocrinology* (2005) 146:231–6. doi: 10.1210/en.2004-0359
 47. Lee DK, Ferguson SSG, George SR, O'Dowd BF. The Fate of the Internalized Apelin Receptor is Determined by Different Isoforms of Apelin Mediating Differential Interaction With Beta-Arrestin. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) 395:185–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.151
 48. Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y, Kundu RK, Sheikh AY, Agrawal R, et al. Apelin Signaling Antagonizes Ang II Effects in Mouse Models of Atherosclerosis. *J Clin Invest* (2008) 118:3343–54. doi: 10.1172/JCI34871
 49. Sun X, Iida S, Yoshikawa A, Senbonmatsu R, Imanaka K, Maruyama K, et al. Non-Activated APJ Suppresses the Angiotensin II Type 1 Receptor, Whereas Apelin-Activated APJ Acts Conversely. *Hypertens Res* (2011) 34:701–6. doi: 10.1038/hr.2011.19
 50. Siddiquee K, Hampton J, McAnally D, May L, Smith L. The Apelin Receptor Inhibits the Angiotensin II Type 1 Receptor via Allosteric Trans-Inhibition. *Br J Pharmacol* (2013) 168:1104–17. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02192.x
 51. Li Y, Chen J, Bai B, Du H, Liu Y, Liu H. Heterodimerization of Human Apelin and Kappa Opioid Receptors: Roles in Signal Transduction. *Cell Signal* (2012) 24:991–1001. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.012
 52. Bai B, Liu L, Zhang N, Wang C, Jiang Y, Chen J. Heterodimerization of Human Apelin and Bradykinin 1 Receptors: Novel Signal Transduction Characteristics. *Cell Signal* (2014) 26:1549–59. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.03.022
 53. Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll A-M. Central and Peripheral Apelin Receptor Distribution in the Mouse: Species Differences With Rat. *Peptides* (2012) 33:139–48. doi: 10.1016/j.peptides.2011.12.005
 54. Reaux A, Gallatz K, Palkovits M, Llorens-Cortes C. Distribution of Apelin-Synthesizing Neurons in the Adult Rat Brain. *Neuroscience* (2002) 113:653–62. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00192-6
 55. Brailoiu GC, Dun SL, Yang J, Ohsawa M, Chang JK, Dun NJ. Apelin-Immunoreactivity in the Rat Hypothalamus and Pituitary. *Neurosci Lett* (2002) 327:193–7. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00411-1
 56. Reaux-Le Goazigo A, Morinville A, Burllet A, Llorens-Cortes C, Beaudet A. Dehydration-Induced Cross-Regulation of Apelin and Vasopressin Immunoreactivity Levels in Magnocellular Hypothalamic Neurons. *Endocrinology* (2004) 145:4392–400. doi: 10.1210/en.2004-0384
 57. Bodineau L, Taveau C, Lê Quan Sang H-H, Osterstock G, Queguiner I, Moos F, et al. Data Supporting a New Physiological Role for Brain Apelin in the Regulation of Hypothalamic Oxytocin Neurons in Lactating Rats. *Endocrinology* (2011) 152:3492–503. doi: 10.1210/en.2011-0206
 58. Buggy J, Fink GD, Johnson AK, Brody MJ. Prevention of the Development of Renal Hypertension by Anteroventral Third Ventricular Tissue Lesions. *Circ Res* (1977) 40:1110–117.
 59. Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL. Integrative Role of the Lamina Terminalis in the Regulation of Cardiovascular and Body Fluid Homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (1996) 23:183–91. doi: 10.1111/j.1440-1681.1996.tb02594.x
 60. O'Carroll A-M, Lolait SJ. Regulation of Rat APJ Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Magnocellular Neurons of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei by Osmotic Stimuli. *J Neuroendocrinol* (2003) 15:661–6. doi: 10.1046/j.1365-2826.2003.01044.x
 61. Hurbin A, Boissin-Agasse L, Orsel H, Rabie A, Joux N, Desarménien MG, et al. The V1a and V1b, But Not V2, Vasopressin Receptor Genes Are Expressed in the Supraoptic Nucleus of the Rat Hypothalamus, and the Transcripts Are Essentially Colocalized in the Vasopressinergic Magnocellular Neurons. *Endocrinology* (1998) 139:4701–7. doi: 10.1210/endo.139.11.6320
 62. Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport AP. Immunocytochemical Localisation of the Apelin Receptor, APJ, to Human Cardiomyocytes, Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells. *Regul Pept* (2005) 126:233–40. doi: 10.1016/j.regpep.2004.10.019
 63. Ripoll E, Pluvinet R, Torras J, Olivar R, Vidal A, Franquesa M, et al. In Vivo Therapeutic Efficacy of Intra-Renal CD40 Silencing in a Model of Humoral Acute Rejection. *Gene Ther* (2011) 18:945–52. doi: 10.1038/gt.2011.39
 64. O'Carroll A-M, Salih S, Griffiths PR, Bijabhai A, Knepper MA, Lolait SJ. Expression and Functional Implications of the Renal Apelinergic System in Rodents. *PLoS One* (2017) 12:e0183094. doi: 10.1371/journal.pone.0183094
 65. Xu C, Wang F, Chen Y, Xie S, Sng D, Reversade B, et al. ELABELA Antagonizes Intrarenal Renin-Angiotensin System to Lower Blood Pressure and Protects Against Renal Injury. *Am J Physiol Renal Physiol* (2020) 318:F1122–35. doi: 10.1152/ajprenal.00606.2019
 66. Ostrowski NL, Lolait SJ, Bradley DJ, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Young WS. Distribution of V1a and V2 Vasopressin Receptor Messenger Ribonucleic Acids in Rat Liver, Kidney, Pituitary and Brain. *Endocrinology* (1992) 131:533–5. doi: 10.1210/endo.131.1.1535312
 67. Sekerci R, Acar N, Tepekoy F, Ustunel I, Keles-Celik N. Apelin/APJ Expression in the Heart and Kidneys of Hypertensive Rats. *Acta Histochemica* (2018) 120:196–204. doi: 10.1016/j.acthis.2018.01.007
 68. Manning M, Lowbridge J, Haldar J, Sawyer WH. Design of Neurohypophyseal Peptides That Exhibit Selective Agonistic and Antagonistic Properties. *Fed Proc* (1977) 36:1848–52.
 69. Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, Transport, and Release of Posterior Pituitary Hormones. *Science* (1980) 207:373–8. doi: 10.1126/science.6153132
 70. Couvineau P, de Almeida H, Maigret B, Llorens-Cortes C, Iturrioz X. Involvement of Arginine 878 Together With Ca²⁺ in Mouse Aminopeptidase A Substrate Specificity for N-Terminal Acidic Amino-Acid Residues. *PLoS One* (2017) 12:e0184237. doi: 10.1371/journal.pone.0184237
 71. Gouzènes L, Desarménien MG, Hussy N, Richard P, Moos FC. Vasopressin Regularizes the Phasic Firing Pattern of Rat Hypothalamic Magnocellular Vasopressin Neurons. *J Neurosci* (1998) 18:1879–85. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-05-01879.1998
 72. Poulain DA, Wakerley JB, Dyball RE. Electrophysiological Differentiation of Oxytocin- and Vasopressin-Secreting Neurons. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* (1977) 196:367–84. doi: 10.1098/rspb.1977.0046

73. Gimpl G, Fahrenholz F. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiol Rev* (2001) 81:629–83. doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.629
74. Llorens-Cortes C, Moos F, Apelin and Vasopressin: Two Work Better Than One. *J Neuroendocrinol* (2012) 24:1085–6. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02316.x
75. Kadekaro M, Summy-Long JY, Freeman S, Harris JS, Terrell ML, Eisenberg HM. Cerebral Metabolic Responses and Vasopressin and Oxytocin Secretions During Progressive Water Deprivation in Rats. *Am J Physiol* (1992) 262:R310–17. doi: 10.1152/ajpregu.1992.262.2.R310
76. Hogarty DC, Speakman EA, Puig V, Phillips MI. The Role of Angiotensin, AT1 and AT2 Receptors in the Pressor, Drinking and Vasopressin Responses to Central Angiotensin. *Brain Res* (1992) 586:289–94. doi: 10.1016/0006-8993(92)91638-u
77. Reaux-Le Goazigo A, Alvear-Perez R, Zizzari P, Epelbaum J, Bluet-Pajot M-T, Llorens-Cortes C. Cellular Localization of Apelin and Its Receptor in the Anterior Pituitary: Evidence for a Direct Stimulatory Action of Apelin on ACTH Release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2007) 292:E7–15. doi: 10.1152/ajpendo.00521.2005
78. Gallo-Payet N. 60 YEARS OF POMC: Adrenal and Extra-Adrenal Functions of ACTH. *J Mol Endocrinol* (2016) 56:T135–156. doi: 10.1530/JME-15-0257
79. Raff H. Glucocorticoid Inhibition of Neurohypophysial Vasopressin Secretion. *Am J Physiol* (1987) 252:R635–644. doi: 10.1152/ajpregu.1987.252.4.R635
80. Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin Increases Water Permeability of Kidney Collecting Duct by Inducing Translocation of Aquaporin-CD Water Channels to Plasma Membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92:1013–7. doi: 10.1073/pnas.92.4.1013
81. Sands JM, Naruse M, Baum M, Jo I, Hebert SC, Brown EM, et al. Apical Extracellular Calcium/Polyvalent Cation-Sensing Receptor Regulates Vasopressin-Elicited Water Permeability in Rat Kidney Inner Medullary Collecting Duct. *J Clin Invest* (1997) 99:1399–405. doi: 10.1172/JCI119299
82. Murza A, Sainsily X, Coquerel D, Côté J, Marx P, Besserer-Offroy É, et al. Discovery and Structure-Activity Relationship of a Bioactive Fragment of ELABELA That Modulates Vascular and Cardiac Functions. *J Med Chem* (2016) 59:2962–72. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01549
83. Hus-Citharel A, Bodineau L, Frugière A, Joubert F, Bouby N, Llorens-Cortes C. Apelin Counteracts Vasopressin-Induced Water Reabsorption via Cross Talk Between Apelin and Vasopressin Receptor Signaling Pathways in the Rat Collecting Duct. *Endocrinology* (2014) 155:4483–93. doi: 10.1210/en.2014-1257
84. Boulkeroua C, Ayari H, Khalfaoui T, Lafrance M, Besserer-Offroy É, Ekindi N, et al. Apelin-13 Regulates Vasopressin-Induced Aquaporin-2 Expression and Trafficking in Kidney Collecting Duct Cells. *Cell Physiol Biochem* (2019) 53:687–700. doi: 10.33594/000000165
85. Chen Y, Xu C, Hu J, Deng M, Qiu Q, Mo S, et al. Diuretic Action of Apelin-13 Mediated by Inhibiting cAMP/PKA/sPRR Pathway. *Front Physiol* (2021) 12:642274. doi: 10.3389/fphys.2021.642274
86. Flahault A, Girault-Sotias P-E, Keck M, Alvear-Perez R, De Mota N, Estéouille L, et al. A Metabolically Stable Apelin-17 Analog Decreases AVP-Induced Antidiuresis and Improves Hyponatremia. *Nat Commun* (2021) 12:305. doi: 10.1038/s41467-020-20560-y
87. Deng C, Chen H, Yang N, Feng Y, Hsueh AJW. Apela Regulates Fluid Homeostasis by Binding to the APJ Receptor to Activate Gi Signaling*. *J Biol Chem* (2015) 290:18261–8. doi: 10.1074/jbc.M115.648238
88. Tang C, Zelenak C, Völk J, Eichenmüller M, Regel I, Fröhlich H, et al. Hydration-Sensitive Gene Expression in Brain. *Cell Physiol Biochem* (2011) 27:757–68. doi: 10.1159/000330084
89. Roberts EM, Newson MJF, Pope GR, Landgraf R, Lolait SJ, O'Carroll A-M. Abnormal Fluid Homeostasis in Apelin Receptor Knockout Mice. *J Endocrinol* (2009) 202:453–62. doi: 10.1677/JOE-09-0134
90. Roberts EM, Pope GR, Newson MJF, Landgraf R, Lolait SJ, O'Carroll A-M. Stimulus-Specific Neuroendocrine Responses to Osmotic Challenges in Apelin Receptor Knockout Mice. *J Neuroendocrinol* (2010) 22:301–8. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.01968.x
91. Coquerel D, Chagnon F, Sainsily X, Dumont L, Murza A, Côté J, et al. ELABELA Improves Cardio-Renal Outcome in Fatal Experimental Septic Shock. *Crit Care Med* (2017) 45:e1139–48. doi: 10.1097/CCM.0000000000002639
92. Zingg HH, Lefebvre D, Almazan G. Regulation of Vasopressin Gene Expression in Rat Hypothalamic Neurons. Response to Osmotic Stimulation. *J Biol Chem* (1986) 261:12956–9. doi: 10.1016/S0021-9258(18)69255-5
93. Ellison DH, Berl T. Clinical Practice. The Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *N Engl J Med* (2007) 356:2064–72. doi: 10.1056/NEJMcp066837
94. Kim WR, Biggins SW, Kremers WK, Wiesner RH, Kamath PS, Benson JT, et al. Hyponatremia and Mortality Among Patients on the Liver-Transplant Waiting List. *N Engl J Med* (2008) 359:1018–26. doi: 10.1056/NEJMoa0801209
95. Waikar SS, Mount DB, Curhan GC. Mortality After Hospitalization With Mild, Moderate, and Severe Hyponatremia. *Am J Med* (2009) 122:857–65. doi: 10.1016/j.amjmed.2009.01.027
96. Kovcsdy CP, Lott EH, Lu JL, Malakauskas SM, Ma JZ, Molnar MZ, et al. Hyponatremia, Hypernatremia, and Mortality in Patients With Chronic Kidney Disease With and Without Congestive Heart Failure. *Circulation* (2012) 125:677–84. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.065391
97. Peri A. Management of Hyponatremia: Causes, Clinical Aspects, Differential Diagnosis and Treatment. *Expert Rev Endocrinol Metab* (2019) 14:13–21. doi: 10.1080/17446651.2019.1556095
98. Verbalis JG, Goldsmith SR, Greenberg A, Korzelius C, Schrier RW, Sterns RH, et al. Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Hyponatremia: Expert Panel Recommendations. *Am J Med* (2013) 126:S1–42. doi: 10.1016/j.amjmed.2013.07.006
99. Verbalis JG. Euvolemic Hyponatremia Secondary to the Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *Front Horm Res* (2019) 52:61–79. doi: 10.1159/000493238
100. Blanchard A, Steichen O, De Mota N, Curis E, Gauci C, Frank M, et al. An Abnormal Apelin/Vasopressin Balance may Contribute to Water Retention in Patients With the Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone (SIADH) and Heart Failure. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98:2084–9. doi: 10.1210/jc.2012-3794
101. Murza A, Belleville K, Longpré J-M, Sarret P, Marsault É. Stability and Degradation Patterns of Chemically Modified Analogs of Apelin-13 in Plasma and Cerebrospinal Fluid. *Biopolymers* (2014) 102:297–303. doi: 10.1002/bip.22498
102. Japp AG, Cruden NL, Barnes G, van Gemeren N, Mathews J, Adamson J, et al. Acute Cardiovascular Effects of Apelin in Humans: Potential Role in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* (2010) 121:1818–27. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.911339
103. Trần K, Van Den Hauwe R, Sainsily X, Couvineau P, Côté J, Simard L, et al. Constraining the Side Chain of C-Terminal Amino Acids in Apelin-13 Greatly Increases Affinity, Modulates Signaling, and Improves the Pharmacokinetic Profile. *J Med Chem* (2021) 64:5345–64. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01941
104. Read C, Fitzpatrick CM, Yang P, Kuc RE, Maguire JJ, Glen RC, et al. Cardiac Action of the First G Protein Biased Small Molecule Apelin Agonist. *Biochem Pharmacol* (2016) 116:63–72. doi: 10.1016/j.bcp.2016.07.018
105. Murza A, Besserer-Offroy É, Côté J, Bérubé P, Longpré J-M, Dumaine R, et al. C-Terminal Modifications of Apelin-13 Significantly Change Ligand Binding, Receptor Signaling, and Hypotensive Action. *J Med Chem* (2015) 58:2431–40. doi: 10.1021/jm501916k
106. Brame AL, Maguire JJ, Yang P, Dyson A, Torella R, Cheriyan J, et al. Design, Characterization, and First-in-Human Study of the Vascular Actions of a Novel Biased Apelin Receptor Agonist. *Hypertension* (2015) 65:834–40. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05099
107. Fischer C, Lamer T, Wang W, McKinnin SMK, Iturriz X, Llorens-Cortes C, et al. Plasma Kallikrein Cleaves and Inactivates Apelin-17: Palmitoyl- and PEG-Extended Apelin-17 Analogs as Metabolically Stable Blood Pressure-Lowering Agents. *Eur J Med Chem* (2019) 166:119–24. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.040
108. Jia ZQ, Hou L, Leger A, Wu I, Kudej AB, Stefano J, et al. Cardiovascular Effects of a PEGylated Apelin. *Peptides* (2012) 38:181–8. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.003
109. Nyimandu D, Kuc RE, Williams TL, Bednarek M, Ambery P, Jeremias L, et al. Apelin-36-[L28A] and Apelin-36-[L28C(30kDa-PEG)] Peptides That

- Improve Diet Induced Obesity Are G Protein Biased Ligands at the Apelin Receptor. *Peptides* (2019) 121:170139. doi: 10.1016/j.peptides.2019.170139
110. Ason B, Chen Y, Guo Q, Hoagland KM, Chui RW, Fielden M, et al. Cardiovascular Response to Small-Molecule APJ Activation. *JCI Insight* (2020) 5:132898. doi: 10.1172/jci.insight.132898
 111. Gargalovic P, Wong P, Onorato J, Finlay H, Wang T, Yan M, et al. *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of a Small-Molecule APJ (Apelin Receptor) Agonist, BMS-986224, as a Potential Treatment for Heart Failure. *Circ Heart Fail* (2021) 14:e007351. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007351
 112. Galon-Tilleman H, Yang H, Bednarek MA, Spurlock SM, Paavola KJ, Ko B, et al. Apelin-36 Modulates Blood Glucose and Body Weight Independently of Canonical APJ Receptor Signaling. *J Biol Chem* (2017) 292:1925–33. doi: 10.1074/jbc.M116.748103
 113. Fischer C, Lamer T, Fernandez K, Gheblawi M, Wang W, Pascoe C, et al. Optimizing PEG-Extended Apelin Analogues as Cardioprotective Drug Leads: Importance of the KFRR Motif and Aromatic Head Group for Improved Physiological Activity. *J Med Chem* (2020) 63:12073–82. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01395
 114. O'Harte FPM, Parthasarathy V, Hogg C, Flatt PR. Acylated Apelin-13 Amide Analogues Exhibit Enzyme Resistance and Prolonged Insulin Releasing, Glucose Lowering and Anorexic Properties. *Biochem Pharmacol* (2017) 146:165–73. doi: 10.1016/j.bcp.2017.10.002
 115. Juhl C, Els-Heindl S, Schönauer R, Redlich G, Haaf E, Wunder F, et al. Development of Potent and Metabolically Stable APJ Ligands With High Therapeutic Potential. *ChemMedChem* (2016) 11:2378–84. doi: 10.1002/cmdc.201600307
 116. Murza A, Sainsily X, Côté J, Bruneau-Cossette L, Besserer-Offroy É, Longpré J-M, et al. Structure-Activity Relationship of Novel Macrocyclic Biased Apelin Receptor Agonists. *Org Biomol Chem* (2017) 15:449–58. doi: 10.1039/c6ob02247b
 117. Trần K, Murza A, Sainsily X, Coquerel D, Côté J, Belleville K, et al. A Systematic Exploration of Macrocyclization in Apelin-13: Impact on Binding, Signaling, Stability, and Cardiovascular Effects. *J Med Chem* (2018) 61:2266–77. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01353
 118. Miyazaki T, Yamamura Y, Onogawa T, Nakamura S, Kinoshita S, Nakayama S, et al. Therapeutic Effects of Tolvaptan, a Potent, Selective Nonpeptide Vasopressin V2 Receptor Antagonist, in Rats With Acute and Chronic Severe Hyponatremia. *Endocrinology* (2005) 146:3037–43. doi: 10.1210/en.2004-1590
 119. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, et al. Tolvaptan in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* (2012) 367:2407–18. doi: 10.1056/NEJMoa1205511
 120. Boertien WE, Meijer E, de Jong PE, ter Horst GJ, Renken RJ, van der Jagt EJ, et al. Short-Term Effects of Tolvaptan in Individuals With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease at Various Levels of Kidney Function. *Am J Kidney Dis* (2015) 65:833–41. doi: 10.1053/j.ajkd.2014.11.010
 121. Tzoulis P, Waung JA, Bagkeris E, Carr H, Khoo B, Cohen M, et al. Real-Life Experience of Tolvaptan Use in the Treatment of Severe Hyponatremia Due to Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2016) 84:620–6. doi: 10.1111/cen.12943
 122. Verbalis JG, Adler S, Schrier RW, Berl T, Zhao Q, Czerwiec FS. Efficacy and Safety of Oral Tolvaptan Therapy in Patients With the Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion. *Eur J Endocrinol* (2011) 164:725–32. doi: 10.1530/EJE-10-1078
 123. Kleinschmidt-DeMasters BK, Norenberg MD. Rapid Correction of Hyponatremia Causes Demyelination: Relation to Central Pontine Myelinolysis. *Science* (1981) 211:1068–70. doi: 10.1126/science.7466381
 124. Wu Y, Beland FA, Chen S, Liu F, Guo L, Fang J-L. Mechanisms of Tolvaptan-Induced Toxicity in HepG2 Cells. *Biochem Pharmacol* (2015) 95:324–36. doi: 10.1016/j.bcp.2015.03.015
 125. Endo M, Katayama K, Matsuo H, Horiike S, Nomura S, Hayashi A, et al. Role of Liver Transplantation in Tolvaptan-Associated Acute Liver Failure. *Kidney Int Rep* (2019) 4:1653–7. doi: 10.1016/j.ekir.2019.09.002
 126. Feldman BJ, Rosenthal SM, Vargas GA, Fenwick RG, Huang EA, Matsuda-Abedini M, et al. Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *N Engl J Med* (2005) 352:1884–90. doi: 10.1056/NEJMoa042743
 127. Carpentier E, Greenbaum LA, Rochdi D, Abrol R, Goddard WA, Bichet DG, et al. Identification and Characterization of an Activating F229V Substitution in the V2 Vasopressin Receptor in an Infant With NSIAD. *J Am Soc Nephrol* (2012) 23:1635–40. doi: 10.1681/ASN.2012010077
 128. Rochdi MD, Vargas GA, Carpentier E, Oligny-Longpré G, Chen S, Kovoov A, et al. Functional Characterization of Vasopressin Type 2 Receptor Substitutions (R137H/C/L) Leading to Nephrogenic Diabetes Insipidus and Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis: Implications for Treatments. *Mol Pharmacol* (2010) 77:836–45. doi: 10.1124/mol.109.061804
 129. Tiulpakov A, White CW, Abhayawardana RS, See HB, Chan AS, Seeber RM, et al. Mutations of Vasopressin Receptor 2 Including Novel L312S Have Differential Effects on Trafficking. *Mol Endocrinol* (2016) 30:889–904. doi: 10.1210/me.2016-1002
 130. Erdélyi LS, Mann WA, Morris-Rosendahl DJ, Groß U, Nagel M, Várnai P, et al. Mutation in the V2 Vasopressin Receptor Gene, AVPR2, Causes Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Diuresis. *Kidney Int* (2015) 88:1070–8. doi: 10.1038/ki.2015.181
 131. Ranieri M, Tamma G, Pellegrino T, Vezzi V, Ambrosio C, Grò C, et al. Gain-Of-Function Mutations of the V2 Vasopressin Receptor in Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis (NSIAD): A Cell-Based Assay to Assess Constitutive Water Reabsorption. *Pflugers Arch* (2019) 471:1291–304. doi: 10.1007/s00424-019-02307-x
 132. Decaux G, Vandergheynst F, Bouko Y, Parma J, Vassart G, Vilain C. Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis in Adults: High Phenotypic Variability in Men and Women From a Large Pedigree. *J Am Soc Nephrol* (2007) 18:606–12. doi: 10.1681/ASN.2006090987
 133. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, et al. Regulatory Roles for APJ, a Seven-Transmembrane Receptor Related to Angiotensin-Type 1 Receptor in Blood Pressure in Vivo. *J Biol Chem* (2004) 279:26274–9. doi: 10.1074/jbc.M404149200
 134. Salcedo A, Garijo J, Monge L, Fernández N, Luis García-Villalón A, Sánchez Turrión V, et al. Apelin Effects in Human Splanchnic Arteries. Role of Nitric Oxide and Prostanoids. *Regul Pept* (2007) 144:50–5. doi: 10.1016/j.regpep.2007.06.005
 135. Katugampola SD, Maguire JJ, Matthewson SR, Davenport AP. [(125I)-(Pyr(1))Apelin-13 Is a Novel Radioligand for Localizing the APJ Orphan Receptor in Human and Rat Tissues With Evidence for a Vasopressin Role in Man. *Br J Pharmacol* (2001) 132:1255–60. doi: 10.1038/sj.bjp.0703939
 136. Hashimoto T, Kihara M, Ishida J, Imai N, Yoshida S, Taya Y, et al. Apelin Stimulates Myosin Light Chain Phosphorylation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) 26:1267–72. doi: 10.1161/01.ATV.0000218841.39828.91
 137. Pitkin SL, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Modulation of the Apelin/APJ System in Heart Failure and Atherosclerosis in Man. *Br J Pharmacol* (2010) 160:1785–95. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00821.x
 138. Flahault A, Keck M, Girault-Sotias P-E, Esteuolle L, De Mota N, Bonnet D, et al. LIT01-196, a Metabolically Stable Apelin-17 Analogue, Normalizes Blood Pressure in Hypertensive DOCA-Salt Rats via a NO Synthase-Dependent Mechanism. *Front Pharmacol* (2021) 12:715095. doi: 10.3389/fphar.2021.715095
 139. Japp AG, Cruden NL, Amer DAB, Li VKY, Goudie EB, Johnston NR, et al. Vascular Effects of Apelin *In Vivo* in Man. *J Am Coll Cardiol* (2008) 52:908–13. doi: 10.1016/j.jacc.2008.06.013
 140. Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, et al. Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility. *Circ Res* (2002) 91:434–40. doi: 10.1161/01.res.0000033522.37861.69
 141. Wang C, Du J-F, Wu F, Wang H-C. Apelin Decreases the SR Ca²⁺ Content But Enhances the Amplitude of [Ca²⁺]_i Transient and Contractions During Twitches in Isolated Rat Cardiac Myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2008) 294:H2540–2546. doi: 10.1152/ajpheart.00046.2008
 142. Perjés Á, Skoumal R, Tenhunen O, Kónyi A, Simon M, Horváth IG, et al. Apelin Increases Cardiac Contractility via Protein Kinase C ϵ - and Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Mechanisms. *PLoS One* (2014) 9:e93473. doi: 10.1371/journal.pone.0093473
 143. Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, Burdick J, Morine KJ, Gardner TJ, et al. Apelin has *In Vivo* Inotropic Effects on Normal and Failing Hearts. *Circulation* (2004) 110:II187–193. doi: 10.1161/01.CIR.0000138382.57325.5c
 144. Farkasfalvi K, Stagg MA, Coppin SR, Siedlecka U, Lee J, Soppa GK, et al. Direct Effects of Apelin on Cardiomyocyte Contractility and

- Electrophysiology. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) 357:889–95. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.017
145. Cheng C-C, Weerateerangkul P, Lu Y-Y, Chen Y-C, Lin Y-K, Chen S-A, et al. Apelin Regulates the Electrophysiological Characteristics of Atrial Myocytes. *Eur J Clin Invest* (2013) 43:34–40. doi: 10.1111/eci.12012
 146. Lv W, Zhang L, Cheng X, Wang H, Qin W, Zhou X, et al. Apelin Inhibits Angiotensin II-Induced Atrial Fibrosis and Atrial Fibrillation via TGF- β 1/Smad2/ α -SMA Pathway. *Front Physiol* (2020) 11:583570. doi: 10.3389/fphys.2020.583570
 147. Ashley EA, Powers J, Chen M, Kundu R, Finsterbach T, Caffarelli A, et al. The Endogenous Peptide Apelin Potently Improves Cardiac Contractility and Reduces Cardiac Loading *In Vivo*. *Cardiovasc Res* (2005) 65:73–82. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.08.018
 148. Wang W, McKinnie SMK, Patel VB, Haddad G, Wang Z, Zhabyeyev P, et al. Loss of Apelin Exacerbates Myocardial Infarction Adverse Remodeling and Ischemia-Reperfusion Injury: Therapeutic Potential of Synthetic Apelin Analogues. *J Am Heart Assoc* (2013) 2:e000249. doi: 10.1161/JAHA.113.000249
 149. Azizi Y, Faghilhi M, Imani A, Roghani M, Nazari A. Post-Infarct Treatment With [Pyr1]-Apelin-13 Reduces Myocardial Damage Through Reduction of Oxidative Injury and Nitric Oxide Enhancement in the Rat Model of Myocardial Infarction. *Peptides* (2013) 46:76–82. doi: 10.1016/j.peptides.2013.05.006
 150. Li L, Zeng H, Hou X, He X, Chen J-X. Myocardial Injection of Apelin-Overexpressing Bone Marrow Cells Improves Cardiac Repair via Upregulation of Sirt3 After Myocardial Infarction. *PloS One* (2013) 8: e71041. doi: 10.1371/journal.pone.0071041
 151. Pchejetski D, Foussal C, Alfarano C, Lairez O, Calise D, Guilbeau-Frugier C, et al. Apelin Prevents Cardiac Fibroblast Activation and Collagen Production Through Inhibition of Sphingosine Kinase 1. *Eur Heart J* (2012) 33:2360–9. doi: 10.1093/eurheartj/ehr389
 152. Barnes GD, Alam S, Carter G, Pedersen CM, Lee KM, Hubbard TJ, et al. Sustained Cardiovascular Actions of APJ Agonism During Renin-Angiotensin System Activation and in Patients With Heart Failure. *Circ Heart Fail* (2013) 6:482–91. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.11.000077
 153. Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, et al. Impaired Heart Contractility in Apelin Gene-Deficient Mice Associated With Aging and Pressure Overload. *Circ Res* (2007) 101:e32–42. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.158659
 154. Ceylan-Isik AF, Kandadi MR, Xu X, Hua Y, Chicco AJ, Ren J, et al. Apelin Administration Ameliorates High Fat Diet-Induced Cardiac Hypertrophy and Contractile Dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* (2013) 63:4–13. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.07.002

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Girault-Sotias, Gerbier, Flahault, de Mota and Llorens-Cortes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Metabolically stable apelin analogs in the treatment of hyponatremia and heart failure after myocardial infarction

Apelin is a peptide of neuroendocrine origin. Apelin and its receptor (Apelin-R) co-localize with arginine-vasopressin (AVP) in magnocellular vasopressinergic neurons. The Apelin-R is also localized in the kidney, in the collecting ducts with the AVP type 2 receptor (V2-R) responsible for the antidiuretic effect of AVP. AVP and apelin are conversely regulated by osmotic stimuli to maintain body fluid homeostasis. The Apelin-R is also expressed in vessels and heart. Apelin (K17F) exerts aquaretic, vasodilatory and positive inotropic effects. Since the half-life of apelin *in vivo* is less than one minute, limiting its therapeutic use, **we developed a metabolically stable K17F analog, LIT01-196**, which behaves as a potent full agonist for the Apelin-R and has a plasma half-life superior to 24 h compared to 4.6 min for K17F.

We therefore hypothesized that the activation of the Apelin-R by **LIT01-196 could be beneficial for the treatment of the Syndrome of Inappropriate Antidiuresis (SIAD), in which hypersecretion of AVP leads to hyponatremia.**

The work in this thesis shows that LIT01-196, has an *in vivo* half-life of 156 minutes in the bloodstream after subcutaneous administration in control rats. In a highly differentiated murine collecting duct principal cell line (mpkCCD cells), LIT01-196 decreases dDAVP (V2-R agonist)-induced cAMP production and apical cell surface expression of phosphorylated AQP2 via V2-R. In a rat experimental model of AVP-induced hyponatremia, the administration of LIT01-196 by subcutaneous route, blocks the antidiuretic effect of AVP and the AVP-induced increase in urinary osmolality, decreasing water reabsorption, increasing aqueous diuresis and resulting in a progressive improvement of hyponatremia. Our data suggest that Apelin-R activation by LIT01-196 could constitute a novel approach for the treatment of hyponatremia.

Secondly, knowing that the Apelin-R is present in heart and vessels and apelin increases cardiac contractility, while reducing vascular resistance, we hypothesized that treatment with LIT01-196 could be beneficial to prevent the development of heart failure after myocardial infarction. Post-myocardial infarction heart failure is associated with excess mortality, and despite the therapeutic arsenal available to date, it remains a major public health problem. **In this thesis, we evaluated the effects of chronic treatment with LIT01-196 during four weeks after myocardial infarction in mice on cardiac function, cardiac hypertrophy and fibrosis.**

Chronic treatment with LIT01-196 administered subcutaneously in post-myocardial infarction mice significantly improved cardiac function by improving systolic function and reducing left ventricular (LV) volumes and diameters. Various biomarkers of heart failure, measured by quantitative RT-PCR, are also reduced (ANF and BNP). In addition, the measurement of haemodynamic parameters allowed us to observe the maintenance of arterial pressure while increasing myocardial contractility, decreasing intracardiac pressure at the end of diastole and maintaining a normal intracardiac pressure at the end of systole. LIT01-196 also exerts cardioprotective effects by decreasing infarct size, the LV wall thickness and cardiac fibrosis.

Since hyponatremia has been identified as a risk factor for increased morbidity and mortality in patients with heart failure and LIT01-196 improves hyponatremia and cardiac function, Apelin-R activation by an agonist could therefore constitute an original pharmacological approach for the treatment of heart failure.

Apelin, Apelin receptor, Apelin analog, Hyponatremia, Vasopressin, Diuresis, Aquaretic, Heart failure, Myocardial infarction, Cardiac function, Inotropism, Fibrosis, Cardiac remodelling

Les analogues de l'apéline métaboliquement stables dans le traitement de l'hyponatrémie et de l'insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde

L'apéline, un peptide d'origine neuro-endocrine, et son récepteur (Apéline-R) sont co-localisés avec l'arginine-vasopressine (AVP) dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques. L'Apéline-R est aussi présent dans le rein, dans les canaux collecteurs (CC) avec le récepteur de l'AVP de type 2 (V2-R), responsable de l'effet antidiurétique de l'AVP. L'apéline et l'AVP sont régulées de façon opposée par les stimuli osmotiques pour maintenir l'équilibre hydrique de l'organisme. Les Apéline-R sont aussi exprimés dans les vaisseaux et le cœur. L'apéline-17 (K17F) exerce des effets aquarétique, vasodilatateur et inotrope positif. La demi-vie de l'apéline *in vivo* étant inférieure à la minute, limitant son usage thérapeutique, **nous avons développé un analogue de K17F métaboliquement stable, le LIT01-196**, qui se comporte comme un puissant agoniste complet de l'Apéline-R et a une demi-vie dans le plasma de 24 h contre 4,6 min pour K17F.

I - Nous avons émis l'hypothèse que l'activation de l'Apéline-R par **le LIT01-196 pourrait être bénéfique pour le traitement du Syndrome d'Antidiurèse Inappropriée, dans lequel l'hypersécrétion d'AVP conduit à l'hyponatrémie.**

Ce travail de thèse montre que le LIT01-196 a une demi-vie *in vivo* de 156 minutes dans la circulation sanguine après administration par voie sous-cutanée (*s.c.*) chez le rat. Dans une lignée de cellules immortalisées issues de cellules principales de CC, les cellules mpkCCD qui expriment l'Apéline-R, le V2-R et les canaux à eau (les aquaporines 2, AQP2), le LIT01-196 diminue la production d'AMPc induite par la dDAVP (un agoniste du V2-R) et diminue la translocation des AQP2 phosphorylées à la membrane apicale de ces cellules. Dans un modèle expérimental d'hyponatrémie induite par une perfusion continue d'AVP, le LIT01-196 administré par voie *s.c* bloque l'effet antidiurétique et l'augmentation de l'osmolalité urinaire induits par l'AVP, ce qui augmente la diurèse aqueuse et induit une amélioration progressive de l'hyponatrémie. Ceci suggère que l'activation de l'Apéline-R par le LIT01-196 pourrait constituer une nouvelle approche pharmacologique pour le traitement de l'hyponatrémie.

II - Sachant que l'apéline via son récepteur augmente la contractilité cardiaque, tout en réduisant les résistances vasculaires, nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement par le LIT01-196 pourrait être bénéfique pour prévenir le développement de l'insuffisance cardiaque (IC) après infarctus du myocarde (IM). L'IC après IM est associée à une mortalité élevée, malgré l'arsenal thérapeutique disponible à ce jour, elle demeure un problème majeur de santé publique. **Nous avons évalué, dans ce travail de thèse, les effets d'un traitement chronique par le LIT01-196 pendant quatre semaines après un IM chez la souris sur la fonction cardiaque, l'hypertrophie et la fibrose cardiaques.**

Le traitement chronique par le LIT01-196 administré par voie *s.c* chez des souris après IM, obtenu par ligature de l'artère coronaire, améliore la fonction cardiaque de manière significative en améliorant la fonction systolique et en réduisant les volumes et diamètres du ventricule gauche (VG). Différents biomarqueurs de l'IC, mesurés par RT-PCR quantitative sont également réduits (ANF et BNP). De plus, la mesure des paramètres hémodynamiques a permis d'observer après traitement par le LIT01-196, le maintien de la pression artérielle tout en augmentant la contractilité du myocarde, en diminuant la pression intracardiaque en fin de diastole et en maintenant une pression intracardiaque en fin de systole normale. Le LIT01-196 exerce aussi des effets cardioprotecteurs en diminuant la taille de l'infarctus, l'épaisseur des parois du VG et la fibrose cardiaque.

Sachant que l'hyponatrémie aggrave la mortalité chez les patients insuffisants cardiaques et que le LIT01-196 améliore l'hyponatrémie et la fonction cardiaque, l'activation de l'Apéline-R pourrait constituer une approche pharmacologique intéressante pour le traitement de l'IC.

Apéline, Récepteur de l'apéline, Analogue de l'apéline, Hyponatrémie, Vasopressine, Diurèse, Aquarétique, Insuffisance cardiaque, Infarctus du myocarde, Fonction cardiaque, Inotropisme, Fibrose, Remodelage cardiaque