



HAL
open science

Caractérisation de toxines animales innovantes pour l'étude fonctionnelle des récepteurs aux angiotensines

Anne-Cécile van Baelen

► **To cite this version:**

Anne-Cécile van Baelen. Caractérisation de toxines animales innovantes pour l'étude fonctionnelle des récepteurs aux angiotensines. Pharmacologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ011 . tel-04103959

HAL Id: tel-04103959

<https://theses.hal.science/tel-04103959v1>

Submitted on 23 May 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.

Caractérisation de toxines animales innovantes pour l'étude fonctionnelle des récepteurs aux angiotensines

*Characterization of innovative animal toxins for the functional study of
angiotensin receptors*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué, ITFA,
Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche MTS (Médicaments et Technologies pour la Santé),
CEA Saclay, DMTS, SIMoS sous la direction de **Philippe ROBIN**,
et la co-direction de Nicolas GILLES.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 14 mars 2023, par

Anne-Cécile VAN BAELEN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Véronique LEBLAIS PR, Université Paris-Saclay	Présidente
Séverine MORISSET-LOPEZ CR, Université d'Orléans	Rapportrice et examinatrice
Sébastien DUTERTRE CR, Université de Montpellier	Rapporteur et examinateur
Christian LEGROS PR, Université d'Angers	Examineur
Bernard MOUILLAC DR, Université de Montpellier	Examineur

Remerciements

Ces 3 ans de thèse ont été particulièrement riches en émotions variées, émotions à travers lesquelles Philippe Robin, mon directeur de thèse a su m'accompagner. Il n'est pas sans dire que je n'aurais pas pu arriver à ce stade sans son encadrement et sa bienveillance. Merci de m'avoir si justement accompagnée. Merci d'être un modèle de réussite, humain et professionnel, un puits de connaissances au service de la science et des étudiants. Je remercie aussi mon co-directeur de thèse Nicolas Gilles qui a su apporter son expertise pour la mise en place du criblage et m'épauler tout au long de ces années.

Je voudrais aussi remercier grandement les membres du jury d'avoir accepté de juger mon manuscrit et ma soutenance, merci à Véronique Leblais, à Séverine Morisset-Lopez, à Sébastien Dutertre, à Christian Legros et enfin à Bernard Mouillac. Je ne doute pas que notre discussion sera des plus intéressantes.

A mon équipe, ma chère équipe,

Merci Denis d'avoir été plus que notre chef de service, une aide précieuse pour la rédaction des papiers, et d'excellents conseils lors des moments de doutes sur la marche à suivre du projet. Merci Pascal, ton encadrement en chimie a commencé dès mon arrivée en stage avec toi, et a continué tout au long de ma thèse, nous avons partagé bien plus que des soucis d'HPLC, merci de ta bienveillance quotidienne. Evelyne, peu de mots peuvent évoquer notre relation, à la fois filiale, amicale, bercée par des discussions scientifiques lors de nos pauses, merci sincèrement. Mathilde, un modèle que j'aimerais suivre, même si en plus de cette admiration, une amitié est née entre nous, un merci ne suffirait pas. Jordi, j'ai été ravie de partager ces années à vos côtés, j'ai rarement été autant ébahie par vos connaissances sur un quelconque domaine. Catherine, merci d'avoir apporté votre expertise sur le domaine des angiotensines. Peggy, t'inquiète je viendrai prendre l'apéro, je ne te laisserai pas tranquille. Les « jeunes » doctorants prenez le relais ! Prenez soin de nos permanents. Goran, je te transmets le flambeau, nul doute qu'il ira loin avec toi. Aurélie, allez courage, tu vas aller au bout sans embuche. Romain et Apolline, à dans 3 ans, à la fin d'une merveilleuse thèse je n'en doute pas.

Au trio infernal, Xavier, Marion, inséparables tous les 3. On pourrait écrire un article sur nous, vous m'avez supportée littéralement au quotidien. Xavier, tu as été plus qu'un collègue. Depuis ton arrivée mon projet a pris une autre envergure, merci pour ta patience, merci pour ton implication, merci pour ton soutien. Marion, mon binôme, ma conseillère, mon pilier. Nous avons tout partagé ensemble, des rires aux larmes. Tu es la meilleure colocataire de bureau qui soit. Merci d'avoir pris soin de moi toutes ces années.

Bref, vous m'avez tous soutenus, tous accompagnés, je ne vous oublierai pas, et pire encore, vous croyez être débarrassés mais je reviendrai vous attendre devant porte Est pour vous voir.

Merci à tout le service. Robert, alias, Bob, merci de m'avoir formée à l'analyse en masse et d'avoir toujours répondu présent lors de mes nombreuses questions. Alain, notre grizzli, en plus de ton rôle de CI je pouvais venir te poser toutes les questions possibles en chimie. Sarah, je garderai en mémoire nos discussions scientifiques et personnelles qui m'ont beaucoup apporté. Lucie, ma partenaire de thèse de galère, à quelques jours d'intervalle tu finis aussi, courage. Enfin, la DTD, Anna, Mélissa, Annabelle, Régis, Clémence et Alice, toujours là pour remonter le moral, à nos sorties endiablées au hall of beer.

Aux anciens du labo,

Marine, Nicolo, Margot, vous avez égayé mes journées lorsque nous travaillions ensemble, ce n'est pas pour rien que nous sommes restés amis. Gilles, en binôme avec Pascal tu m'as appris au mieux la chimie peptidique. Héloïse, mon binôme de début de thèse, un soutien sans faille jusqu'à ta soutenance.

A ma famille,

Promis cette fois c'est fini, 11 ans après avoir passé le bac j'arrête les études. Tout ça n'aurait pas été possible sans que vous me poussiez à continuer sans que j'aie à me soucier de quoi que ce soit. A ma petite sœur, tu suis ma route, j'espère qu'elle sera encore plus belle. A dans 2 ans pour ta soutenance ! Merci de m'avoir épaulée. Aux Rakoto, ma deuxième famille, merci de faire partie de ma vie.

Liste des abréviations

AC	Adénylate cyclase	CPM	Coups par minute
ACE	Angiotensin Converting Enzyme	DAG	Diacylglycérol
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme type 2	DCM	Dichlorométhane
Acm	Acétamidométhyl	DHP	Dihydropyridines
ACN	Acétonitrile	DPM	Désintégrations par minute
ADH	Antidiuretic hormone	DSF	Disulfiram
AMM	Autorisation de mise sur le marché	DTC	Dithiocarbamate
AMPc	Adenosine monophosphate cyclic	EC50	Concentration efficace médiane
AngA	Angiotensine A	ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
AngI	Angiotensine I	ECA2	Enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2
AngII	Angiotensine II	ECL	Extracellular loop
AngIII	Angiotensine III	EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
AngIV	Angiotensine IV	EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ANP	Atrial natriuretic peptide	EMA	European medical agency
APA	Aminopeptidase A	eNOS	NO synthase endothéliale
APN	Aminopeptidase N	ERK	Extracellular Signalling Kinase
ARAI	Antagoniste des récepteurs AT1 à l'angiotensine II	FDA	Food and Drug Administration
ASIC	Acid-sensing ion channel	Fmoc	Fluorénylméthoxycarbone
ATIP	AT2 receptors interacting proteins	FRET	Förster Resonance Energy Transfer
AVC	Accident vasculaire cérébral	GC	Guanylate cyclase
BNP	Brain natriuretic peptide	GFP	Green fluorescent protein
Boc	Tert-butoxycarbonyl	GLP-1	Glucagon-like peptide 1
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer	GMPc	Guanosine monophosphate cyclic
CHO	Chinese Hamster Ovary cells	GRK	GPCR kinase
		HAS	Haute autorité de santé

HCCA	Acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
HCTU	O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate	Mrgpr	Mas-related G protein-coupled receptors
HEK	Human embryonic kidney	NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
HPLC	High performance liquid chromatography	NEP	Neutral endopeptidase
HTA	Hypertension artérielle	NMM	N-méthylmorpholine
HTRF	Homogeneous Time Resolved Fluorescence	NMP	N-méthylpyrrolidone
IC	Insuffisance cardiaque	NO	Monoxyde d'azote
IC50	Concentration inhibitrice médiane	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion	PCR	Polymerase chain reaction
ICK	Inhibitor cystine knot	PdBu	Phorbol12,13-dibutyrate
ICL	Intracellular loop	PdCl ₂	Chlorure de palladium
Il	Interleukine	PDE	Phosphodiesterase
IP	Iodure de propidium	PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
IP ₁	Inositol monophosphate	PKA	Protéine kinase A
IP ₃	Inositol triphosphate	PKC	Protéine kinase C
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology	PLA2	Phospholipase A2
JAK ₂	Janus kinase 2	PLC	Phospholipase C
K _D	Constante de dissociation	PLD	Phospholipase D
K _i	Constante d'inhibition	PTM	Post-Translational Modification
KO	Knock-out	RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
k _{on}	Constante cinétique d'association	SC	Sous cutané
k _{off}	Constante cinétique de dissociation	SI	Sar1, Ile8-AngII
LCS	Liquide cérébro-spinal	SII	Sar1, Ile4, Ile8-AngII
LDL	Low density lipoprotein	SNC	Système nerveux central
MAD	Median absolute deviation	SPPS	Solid-Phase Peptide Synthesis
		SRA	Système rénine-angiotensine
		t _{1/2}	Temps de demi-vie
		TCD	Tubule contourné distal
		TFA	Trifluoroacetic acid

TNF- α Tumor necrosis factor α
TM Transmembranaire
TR-FRET Time-resolved FRET
TRP Transient receptor potential
UV Ultraviolet
WT Wild type
YFP Yellow fluorescent protein
3FT Three-Finger Toxin

Table des matières

1	INTRODUCTION	21
1.1	Le système rénine-angiotensine : généralités et implication dans l'HTA	24
1.1.1	L'axe classique : ECA/AngII/AT1	24
1.1.1.1	Enzyme de conversion de l'AngII	25
1.1.1.2	Généralités sur les RCPG : découverte historique, activation des RCPG et effets associés	28
1.1.1.2.1	Mode d'action des RCPG	30
1.1.1.2.2	Transduction du signal et protéines G	30
1.1.1.2.3	Désensibilisation des RCPG et β -arrestines	33
1.1.1.2.4	Vers une notion d'agonisme biaisé	34
1.1.1.2.5	Dimérisation des RCPG	35
1.1.1.2.6	Les RCPG comme cibles thérapeutiques	35
1.1.1.3	Le récepteur AT1	36
1.1.1.4	Le récepteur AT2	44
1.1.2	Quelles sont les conséquences d'une suractivation du SRA ?	49
1.1.3	Autres récepteurs aux angiotensines et autres peptides angiotensines	50
1.1.3.1	Axe ECA2/Ang1-7/Mas: généralités	50
1.1.3.2	Axe Alamandine/MrgD : généralités	53
1.1.3.3	Autres angiotensines	55
1.1.4	SRA et système nerveux central	56
1.1.5	HTA : données épidémiologiques, physiopathologiques, étiologiques	57
1.1.6	Prise en charge de l'HTA	58
1.1.6.1	Thérapeutiques classiques	58
1.1.6.2	Thérapeutiques innovantes inspirées du SRA	61
1.1.7	Perspectives : intérêt de l'étude de ces récepteurs	63
1.2	Les toxines comme outils pharmacologiques	66
1.2.1	Généralités	66
1.2.2	Quels sont les intérêts de l'utilisation de toxines ?	69
1.2.2.1	Les toxines offrent une diversité structurale	69
1.2.2.2	Des toxines comme thérapeutiques	73
1.2.2.3	Des couples RCPG-Toxines	74
1.2.2.3.1	Les toxines mimant un ligand endogène	74
1.2.2.3.2	Les couples toxines-RCPG sans homologie avec un ligand endogène	78
1.3	Objectifs	83
2	RESULTATS : CRIBLAGE D'UNE BANQUE DE TOXINES SUR LES RECEPTEURS AUX ANGIOTENSINES	89
2.1	Mise en place des tests de liaison sur les récepteurs aux angiotensines par l'utilisation de radioligand	90
2.1.1	Principe et mise en place	90
2.1.2	Liaison de 125 I-Sar1, Ile8-AngII sur les récepteurs aux angiotensines	91
2.1.3	Liaison de 125 I-Ang1-7 sur les récepteurs aux angiotensines	94
2.2	Mise en place des tests de liaison sur les récepteurs aux angiotensines par l'utilisation de ligand fluorescent	97
2.2.1	Méthodologie	97
2.2.1.1	Principe du FRET	97
2.2.1.2	Principe du TR-FRET	97
2.2.1.3	Technologie Tag-Lite	98
2.2.2	Mise en place de la technique SNAP-Tag	100
2.2.3	Résultats	104
2.2.4	Synthèses d'analogues peptidiques fluorescents	105

2.3	Criblage de la banque Venomics sur le récepteur AT2	110
2.3.1	Introduction	110
2.3.2	Mise au point des conditions de criblage	111
2.3.3	Criblage de la banque de toxines	112
2.3.4	Caractéristiques de liaison des toxines	112
2.4	Conclusion – Discussion	117
2.4.1	Mise en place de tests de liaison sur les récepteurs Mas et MrgD	117
2.4.2	Criblage de toxines sur le récepteur AT2	119
3	RESULTATS : PRODUCTION DES TOXINES	121
3.1	Production de peptide linéaire par SPPS	121
3.2	Production de peptide oxydé	126
3.3	Production de A-CTX-MilVa par pontage dirigé	130
3.4	Conclusion – Discussion	132
4	RESULTATS : CARACTERISATION <i>IN VITRO</i> DE A-CTX-CMILA SUR LE RECEPTEUR AT1	135
4.1	Préambule	135
4.2	Principe des méthodes	136
4.3	Résumé des résultats	138
4.4	Characterization of the first animal toxin acting as an antagonist on AT1 receptor	140
4.5	Conclusion - Discussion	168
4.5.1	Effet de A-CTX-cMila sur l'activité constitutive du récepteur AT1	168
4.5.2	Évaluation de la cytotoxicité de A-CTX-cMila	169
5	RESULTATS : MISE AU POINT DES TESTS DE FONCTION SUR LE RECEPTEUR AT2	173
5.1	Préambule	173
5.2	Activation de la voie Gαi par le récepteur AT2	173
5.2.1	Utilisation de biosenseurs de BRET	173
5.2.2	Dosage de seconds messagers : dosage d'IP1 grâce à la protéine chimérique Gq β 9	174
5.3	Activation de la voie Gαs par le récepteur AT2	175
5.4	Activation de la voie Gαq par le récepteur AT2	176
5.5	Activation de ERK1/2 par le récepteur AT2	177
5.6	Conclusion - Discussion	179
6	CONCLUSION - PERSPECTIVES	181
7	MATERIELS & METHODES	187
7.1	Production des peptides	187
7.1.1	Informations générales	187

7.1.2	Production de toxines par pontage dirigé	187
7.1.3	Marquage de peptides	188
7.1.3.1	A la 5-carboxyfluorescéine	188
7.1.3.2	A l'iode 125	188
7.2	Biologie cellulaire et moléculaire	189
7.2.1	Mutagenèse dirigée	189
7.2.2	Préparation de plasmides	189
7.2.3	Tests de cytotoxicité	190
7.3	Pharmacologie	190
8	BIBLIOGRAPHIE	193
9	ANNEXES	215

Liste des figures

Figure 1: Vue d'ensemble du SRA.	22
Figure 2: Cascade schématique de la régulation du système rénine-angiotensine.....	24
Figure 3: Représentation de « l'axe classique » du SRA.	25
Figure 4: Représentation schématique des enzymes de conversion de l'angiotensine.	26
Figure 5: Structure de l'ECA, de l'AngII et de l'AngIII.	27
Figure 6: Structures de RCPG.....	29
Figure 7: Représentation schématique de l'activation de RCPG, implication de protéines G et recrutement de β -arrestine.	31
Figure 8: Structure cristallographique de la β -arrestine1 en rose en complexe avec le V_2RPP	34
Figure 9: Structure cristallographique du récepteur AT1.....	38
Figure 10: Voies de transduction du signal après activation de AT1 par l'AngII..	40
Figure 11: Structure cristallographique des différentes conformations du récepteur AT1.....	43
Figure 12: Structure cristallographique du récepteur AT2.....	46
Figure 13: Structure cristallographique du récepteur AT2.....	47
Figure 14: Structures cristallographiques des récepteurs AT1 et AT2.	48
Figure 15: Représentation de l'axe Ang1-7/Mas.....	50
Figure 16: Représentation des effecteurs de l'axe ECA2/Ang1-7/Mas.	51
Figure 17: Représentation de l'axe Alamandine/MrgD.....	53
Figure 18: Représentation des effecteurs de l'axe alamandine/MrgD.....	54
Figure 19: Épidémiologie de l'hypertension artérielle mondiale.	58
Figure 20: Chefs de file des médicaments ciblant le SRA et prise en charge associée.	59
Figure 21: Poches de liaison des récepteurs AT1, Mas et MrgD..	64
Figure 22: Représentation schématique des toxines à 2 ponts disulfure.....	70
Figure 23: Représentation schématique des toxines à 3 ponts disulfure.....	71
Figure 24: Représentation schématique des toxines à 4 ponts disulfure et plus.	72
Figure 25: Représentation des structures des principales toxines médicaments.	74
Figure 26: Représentation de l'exendine-4 et de la SRTX-6b, avec leur ligand mime et leur récepteur cible.	76
Figure 27: Représentation des structures de MT7 et de p -TIA en présence de leur récepteur cible.	79
Figure 28: Représentation des structures de la mambaquaretine-1, de N-TRTX-Preg1a et de N-BUTX-Ptr1a en présence de leur récepteur cible.....	81
Figure 29: Mécanisme d'incorporation d'iode 125 en ortho de la fonction hydroxyle de la tyrosine par la méthode utilisant le iodogène.	91
Figure 30: Liaison de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII et compétition avec l'AngII sur les récepteurs AT1 et AT2..	93
Figure 31: Liaison totale et liaison non spécifique de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII sur des membranes HEK293T contenant les récepteurs AT1, AT2, Mas ou MrgD.....	94
Figure 32: Liaison totale et liaison non spécifique de la ^{125}I -Ang1-7 sur des membranes contenant les récepteurs AT1, AT2, Mas ou MrgD.	95
Figure 33: Représentation schématique du FRET..	98
Figure 34: Marquage des RCPG au SNAP-tag et lien covalent avec le cryptate de Tb^{2+}	99
Figure 35: Exemple de TR-FRET entre le cryptate de Tb^{2+} et la carboxyfluorescéine.....	99
Figure 36: Contrôle du marquage au cryptate de Tb^{2+} des récepteurs SNAP-tag-AT1, SNAP-tag-AT2, SNAP-tag-Mas ou SNAP-tag-MrgD.....	101

Figure 37: Liaison totale et liaison non spécifique de la ¹²⁵ I-Sar1, Ile8-AngII sur des membranes HEK293T contenant les récepteurs SNAP-tag-AT1, SNAP-tag-AT2, SNAP-tag-Mas ou SNAP-tag-MrgD.....	102
Figure 38: Structure cristallographique du récepteur AT1.....	103
Figure 39: AngII marquée à la carboxyfluorescéine en N-ter.....	103
Figure 40: Liaison des peptides angiotensines marqués à la carboxyfluorescéine en N-ter aux SNAP-tag-RCPG.....	105
Figure 41: β-Ala-Ang1-7 et β-Ala ₂ -Ang1-7 marquées à la carboxyfluorescéine en N-ter. .	106
Figure 42: Liaison des peptides angiotensines analogues marqués à la carboxyfluorescéine aux SNAP-tag-RCPG.....	107
Figure 43: Représentation de la Fmoc-Lys _{IVDde} -OH et de K7-Ang1-7 marquée à la carboxyfluorescéine en C-ter.....	107
Figure 44: Principe du marquage à la carboxyfluorescéine en (A) N-ter et (B) C-ter des peptides angiotensines.	108
Figure 45: Résultats des tests préliminaires pour le criblage sur le récepteur AT2.....	111
Figure 46: Résultats du criblage de la banque Venomics sur le récepteur AT2.....	112
Figure 47: Courbes de liaison par compétition de ¹²⁵ I-Sar1,Ile8-AngII sur des membranes contenant le récepteur AT2 en présence de 4 peptides issus du criblage primaire.	114
Figure 48: Caractérisation de la liaison des toxines sur le récepteur AT2.....	115
Figure 49: Caractérisation de la liaison des toxines sur le récepteur AT1.	116
Figure 50 : Synthèse peptidique sur phase solide.....	122
Figure 51: Contrôle qualité de la forme linéaire de A-CTX-cMila.	124
Figure 52: Contrôle qualité de la forme linéaire de A-CTX-MilVa..	124
Figure 53: Contrôle qualité de la forme linéaire de A-TRTX-Por1a.	125
Figure 54: Contrôle qualité de la forme oxydée de A-CTX-cMila.	127
Figure 55: Contrôle qualité de la forme oxydée de A-CTX-MilVa.....	128
Figure 56: Contrôle qualité de la forme oxydée de A-TRTX-Por1a.....	129
Figure 57: Représentation de cystéines protégées avec le groupement trityl ou le groupement Acm.	131
Figure 58: HPLC analytique des formes de A-CTX-MilVa produites par pontage dirigé..	132
Figure 59: Mise en évidence de l'activité constitutive du récepteur AT1..	169
Figure 60: Évaluation de la cytotoxicité de A-CTX-cMila.....	170
Figure 61: Activation de la voie Gαi3 via les récepteurs AT1 et AT2 par l'utilisation de biosenseurs de BRET.	174
Figure 62: Effet de l'AngII sur la production d'IP1 par des cellules exprimant les récepteurs AT1 ou AT2 via la voie Gαi3.	175
Figure 63: Mesure de la production d'AMPC après stimulation de CHO-AT2-EGFP via la voie Gas.	176
Figure 64: Mesure de la production d'IP1 après stimulation de CHO-AT1a-EGFP et CHO-AT2-EGFP via la voie Gαq/PLC.	177
Figure 65: Activation de ERK1/2 médiée par l'AngII sur les cellules CHO-AT1a-EGFP et CHO-AT2-EGFP.	178

Figures de l'article

Figure 1. HPLC and mass analysis of the toxin.

Figure 2. Binding properties of A-CTX-cMila on angiotensin receptors.

Figure 3. Competitive antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated $G\alpha_q$ /PLC pathway.

Figure 4. Competitive antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated $G\alpha_i3$ pathway monitored by BRET biosensors assays.

Figure 5. Competitive antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated $G\alpha_oA$ pathway monitored by BRET biosensors assays.

Figure 6. Competitive antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated β -arrestin 2 recruitment.

Figure 7. Antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated ERK1/2 activation.

Figure 8. Selectivity profile of A-CTX-cMila for others GPCRs.

Liste des tableaux

Tableau 1: Diversité des sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$	32
Tableau 2: Récapitulatif des principaux peptides angiotensines.....	55
Tableau 3: Liste des 20 peptides sélectionnés lors du criblage sur le récepteur AT2.	113
Tableau 4: Caractéristiques des 3 toxines produites.	123
Tableau 5: Caractéristiques des peptides linéaires.....	126
Tableau 6: Caractéristiques des peptides oxydés.	130

Liste des annexes

Annexe 1 : Liste des 20 acides aminés naturels.

Annexe 2 : Étapes de la SPPS.

Annexe 3 : Contrôle qualité des peptides produits par SPPS.

Annexe 4 : Analyse du brut de synthèse linéaire de A-CTX-cMila.

Annexe 5 : Analyse du brut de synthèse linéaire de A-CTX-MilVa.

Annexe 6 : Analyse du brut de synthèse linéaire de A-TRTX-Por1a.

Annexe 7 : Contrôle qualité de la forme oxydée de A-CTX-MilVa.

Annexe 8 : Contrôle qualité de la forme oxydée de A-TRTX-Por1a.

Annexe 9 : Conditions d'oxydation de Por1a réalisées au laboratoire.

Annexe 10 : Conditions d'oxydation de Por1a réalisées en collaboration avec Smartox.

Annexe 11 : Analyses de masse par MALDI-TOF de la iodation de la Sar1, Ile8-AngII.

Annexe 12 : Analyses de masse par MALDI-TOF de la iodation de l'Ang1-7.

Annexe 13 : Cinétiques de dissociation et d'association de la ¹²⁵I-Sar1, Ile8-AngII.

Annexe 14 : Liste des peptides produits marqués à un fluorophore.

Annexe 15 : Contrôle qualité de la FLUO-AngII.

Annexe 16 : Contrôle qualité de la FLUO-Ang1-7.

Annexe 17 : Contrôle qualité de la FLUO-Alamandine.

Annexe 18 : Contrôle qualité de la FLUO-β-Ala-Ang1-7.

Annexe 19 : Contrôle qualité de la FLUO-β-Ala₂-Ang1-7.

Annexe 20 : Contrôle qualité de la FLUO-β-Ala-Alamandine.

Annexe 21 : Contrôle qualité de la K7-Ang1-7-carboxyfluorescéine.

Annexe 22 : Contrôle qualité de la K7-Alamandine-carboxyfluorescéine.

Annexe 23 : Contrôle qualité des formes Cys(Acm) de la A-CTX-MilVa linéaire.

Annexe 24 : Évaluation de l'expression des récepteurs AT1 et AT2 marqués à la EGFP.

Annexe 25 : Activation de la voie Gβγ et de la voie GαoA après stimulation par l'AngII.

Articles publiés:

Van Baelen, A.-C.; Iturrioz, X.; Chaigneau, M.; Kessler, P.; Llorens-Cortes, C.; Servent, D.; Gilles, N.; Robin, P. Characterization of the First Animal Toxin Acting as an Antagonist on AT1 Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 2330. <https://doi.org/10.3390/ijms24032330>

→ Contribution : réalisation des expériences, conceptualisation, rédaction de l'article, mise en forme/page, élaboration des figures.

Anne-Cécile Van Baelen, Philippe Robin, Pascal Kessler, Arhamatoulaye Maïga, Nicolas Gilles, et Denis Servent. 2022. « Structural and Functional Diversity of Animal Toxins Interacting With GPCRs ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 9: 811365.

→ Contribution : conceptualisation, rédaction de l'article, mise en forme/page.

Ciccione, Lidia, Chenghui Shi, Davide di Lorenzo, **Anne-Cécile Van Baelen**, et Nicolo Tonalì. 2020. « The Positive Side of the Alzheimer's Disease Amyloid Cross-Interactions: The Case of the A β 1-42 Peptide with Tau, TTR, CysC, and ApoA1 ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (10): E2439.

→ Contribution : conceptualisation, rédaction d'un chapitre de l'article (interaction avec ApoA1).

Reynaud, Steve, Suli-Anne Laurin, Justyna Ciolek, Peggy Barbe, **Anne-Cécile Van Baelen**, Michaël Susset, Florian Blondel, et al. 2022. « From a Cone Snail Toxin to a Competitive MC4R Antagonist ». *Journal of Medicinal Chemistry* 65 (18): 12084-94.

→ Contribution : expériences de liaison

Vásquez-Ocmín, Pedro G., Alice Gadea, Sandrine Cojean, Guillaume Marti, Sébastien Pomel, **Anne-Cécile Van Baelen**, Liliana Ruiz-Vásquez, et al. 2021. « Metabolomic Approach of the Antiprotozoal Activity of Medicinal Piper Species Used in Peruvian Amazon ». *Journal of Ethnopharmacology* 264 (janvier): 113262.

→ Participation à : analyses par spectrométrie de masse

Vásquez-Ocmín, Pedro G., Jean-François Gallard, **Anne-Cécile Van Baelen**, Karine Leblanc, Sandrine Cojean, Elisabeth Mouray, Philippe Grellier, et al. 2022. « Biodereplication of Antiplasmodial Extracts: Application of the Amazonian Medicinal Plant Piper Coruscans Kunth ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (21): 7638.

→ Participation à : analyses par spectrométrie de masse, chimie organique

Pre-print :

Vásquez-Ocmín, P.G., Gallard, J.-F., **Baelen, A.-C.V.**, Leblanc, K., Cojean, S., Mouray, E., Grellier, P., Amasifuén, C., Evanno, L., Figadère, B., Maciuk, A., n.d. Antiplasmodial biodereplication based on highly efficient methods.

→ Participation à : analyses par spectrométrie de masse

Participation à des congrès / journées scientifiques :

- Congrès annuel de la société française pour l'étude des toxines SFET (2019 → 2022) :

Poster en 2021: "Characterization of innovative animal toxins for the functional study of

angiotensin receptors"; Anne-Cécile Van Baelen¹, Nicolas Gilles¹, Denis Servent¹, Philippe Robin¹

Poster et communication orale en 2022: "Discovery and characterization of the first animal toxin

active on angiotensin type 1 receptor"; Anne-Cécile Van Baelen¹, Xavier Iturrioz¹, Pascal Kessler¹,

Marion Chaigneau¹, Nicolas Gilles¹, Denis Servent¹, Philippe Robin¹

- CNRS GDR3545 GPCR International Meeting (2019): participation au workshop organisé par Cisbio.

- iGPCR net international (online) meeting (2021):

Poster et flash talk: "Characterization of innovative animal toxins for the functional study of

angiotensin receptors"; Anne-Cécile Van Baelen¹, Denis Servent¹, Nicolas Gilles¹, Philippe Robin¹

- 22e GFPP / BPGM5, French-Belgian Joint Meeting (2022):

Poster et communication orale : "Characterization of innovative animal toxins for the functional

study of angiotensin receptors"; Anne-Cécile Van Baelen¹, Nicolas Gilles¹, Denis Servent¹, Philippe

Robin¹

- Journées de l'école doctorale (2020-2021-2022):

Poster et communication orale : "Characterization of innovative animal toxins for the functional

study of angiotensin receptors"; Anne-Cécile Van Baelen¹, Denis Servent¹, Nicolas Gilles¹, Philippe

Robin¹

- Journées des doctorants du DMTS (CEA, Joliot, DRF 2020-2021-2022): participation et organisation en tant que déléguée des doctorants.

¹Université Paris-Saclay, CEA, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SIMoS, F-91191 Gif sur Yvette, France

Liste des prix obtenus :

Prix du flash talk : iGPCR net 2021

Prix du poster : SFET 2021

INTRODUCTION

1 Introduction

D'après le dernier rapport de l'organisation mondiale de la santé (OMS), les maladies cardiovasculaires sont encore la première cause de décès dans le monde en 2021, et ce, malgré l'existence de nombreuses molécules thérapeutiques sur le marché (World Health Organization, 2021). C'est notamment l'hypertension artérielle (HTA) qui est le principal facteur de risque associé. Cependant, chez de nombreux patients il est difficile de contrôler cette pression artérielle : cela peut être dû à une mauvaise réponse au traitement ou à une diminution de l'observance à cause des effets indésirables associés. Même si les thérapeutiques anti-hypertensives représentent la plus grande part de médicaments prescrits, environ 30% des patients hypertendus traités ne répondent pas efficacement au traitement ("Hypertension artérielle (HTA)," 2020).

Au niveau physiologique, le système rénine-angiotensine (SRA) est un des systèmes les plus importants pour la régulation de la fonction cardiovasculaire. Cependant, une suractivation du système joue un rôle majeur dans la pathogenèse de maladies cardiovasculaires notamment dans la survenue d'HTA. Sa modulation est aujourd'hui encore un des enjeux de la prise en charge thérapeutique de ces pathologies. Le principal médiateur du SRA est l'angiotensine II (AngII) ayant pour cible le récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT1), qui, une fois activé, est responsable entre autres d'une augmentation de la pression artérielle. Aujourd'hui, 2 familles de médicaments anti-hypertenseurs ciblent l'action de l'AngII : soit ils limitent la production d'AngII (comme le captopril), soit ils bloquent le récepteur AT1 (comme le candésartan).

La complexité du SRA réside aussi dans le fait qu'il existe de nombreux peptides dérivés de l'AngII et de nombreux autres récepteurs (**Figure 1**). Même si leurs rôles biologiques ne sont pas encore totalement élucidés, il est acquis que l'axe AngII/AT1 n'est pas le seul responsable de la régulation de la pression artérielle, mais qu'il existe bien d'autres effecteurs du SRA (Santos et al., 2003). Certains d'entre eux auraient des effets opposés à ceux de l'axe AngII/AT1. C'est le cas notamment des peptides angiotensine 1-7 (Ang1-7) ou alamandine qui cibleraient respectivement les récepteurs Mas et MrgD, ou encore du récepteur AT2, qui une fois activé par l'AngII entraîne des effets cardiobénéfiques (Ferrario et al., 1997; Lautner Roberto Queiroga et al., 2013). Aujourd'hui, il n'existe pas de thérapeutiques anti-hypertensives ciblant ces effecteurs, notamment parce qu'ils sont encore peu étudiés et que leurs rôles biologiques ne sont pas parfaitement élucidés. Cela peut être dû au

fait qu'il existe peu d'outils pharmacologiques permettant l'étude de ces effecteurs. Ces récepteurs aux angiotensines sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), aux voies de signalisation intracellulaires multiples mais les voies intracellulaires impliquant les récepteurs AT2, Mas et MrgD sont peu connues.

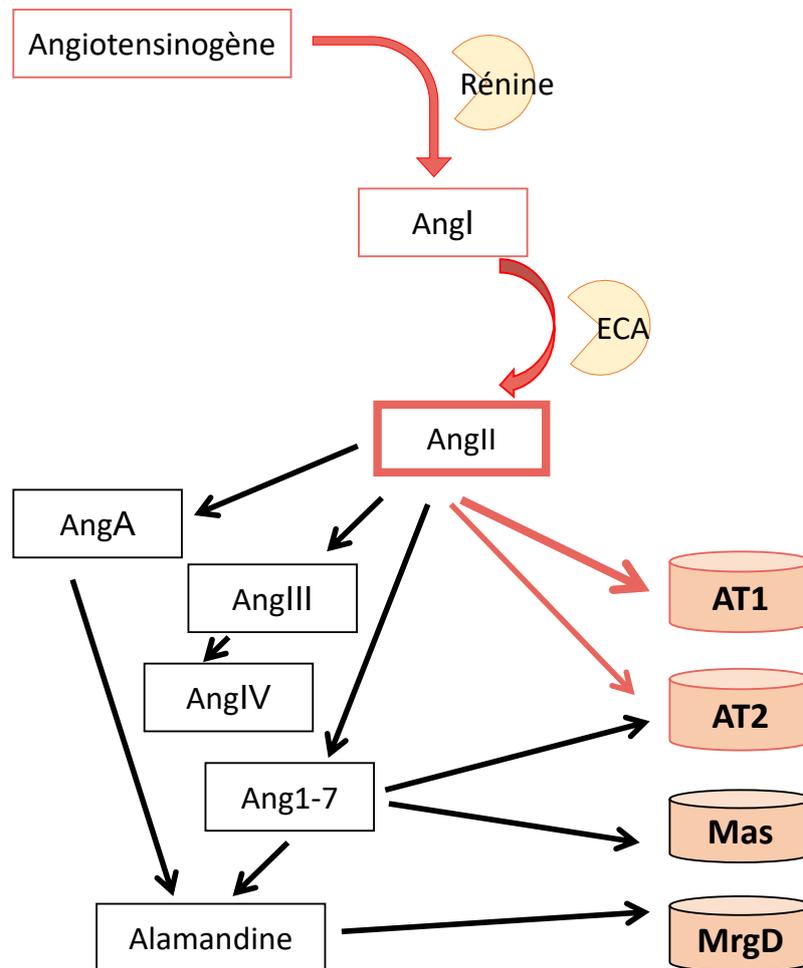


Figure 1: Vue d'ensemble du SRA. ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine.

L'idée est donc de mieux comprendre quels sont les mécanismes de transduction du signal impliquant ces récepteurs aux angiotensines par la découverte de nouveaux outils permettant leur étude fonctionnelle.

Quels seraient ces outils ? Quelles propriétés physico-chimiques sont requises ? Pour permettre l'étude de ces récepteurs, nous devons trouver des ligands innovants qui se lient au récepteur, de façon spécifique et sélective.

Il existe une source de ligands prometteurs encore sous-étudiée qui répondrait à ces critères : les toxines issues de venins d'animaux. En effet, les venins d'animaux constituent une vaste bibliothèque de toxines peptidiques aux propriétés pharmacologiques particulières, qui ont évolué pour doter leur hôte de capacités de capture ou de défense. On estime que les 200 000 espèces d'animaux venimeux existant sur terre pourraient produire environ 40 millions de toxines, encore largement inexploitées (Gilles and Servent, 2014). En raison d'un processus évolutif spécifique, les toxines peuvent acquérir une affinité et une sélectivité élevées pour leurs cibles chez leurs proies (système nerveux central, système cardiovasculaire). De plus, les effets biologiques et les cibles moléculaires de nombreuses toxines présentes dans les venins sont encore inconnus. Actuellement, sur les 7 000 toxines découvertes et caractérisées à ce jour, une grande majorité est associée à l'effet toxique des venins *via* leur interaction avec les canaux ioniques. Néanmoins, certains d'entre eux sont utilement exploités comme insecticides ou agents thérapeutiques. C'est le cas par exemple de l'exenatide, peptide anti-diabétique issu de *Heloderma suspectum* ciblant le récepteur GLP-1 (Eng et al., 1992) ou du ziconotide, peptide issu de *Conus magus*, analgésique ciblant les canaux Ca_v2.2 (McIntosh et al., 1982).

Cependant, il existe peu de toxines ciblant les RCPG, et à ce jour, aucune n'est identifiée comme ciblant les récepteurs aux angiotensines. Étant donné les caractéristiques physico-chimiques intéressantes des toxines et le rôle biologique majeur des récepteurs aux angiotensines, il semble alors judicieux de penser à ces peptides comme outils pour l'étude fonctionnelle de ces récepteurs.

1.1 LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE : GENERALITES ET IMPLICATION DANS L'HTA

1.1.1 L'AXE CLASSIQUE : ECA/ANGII/AT1

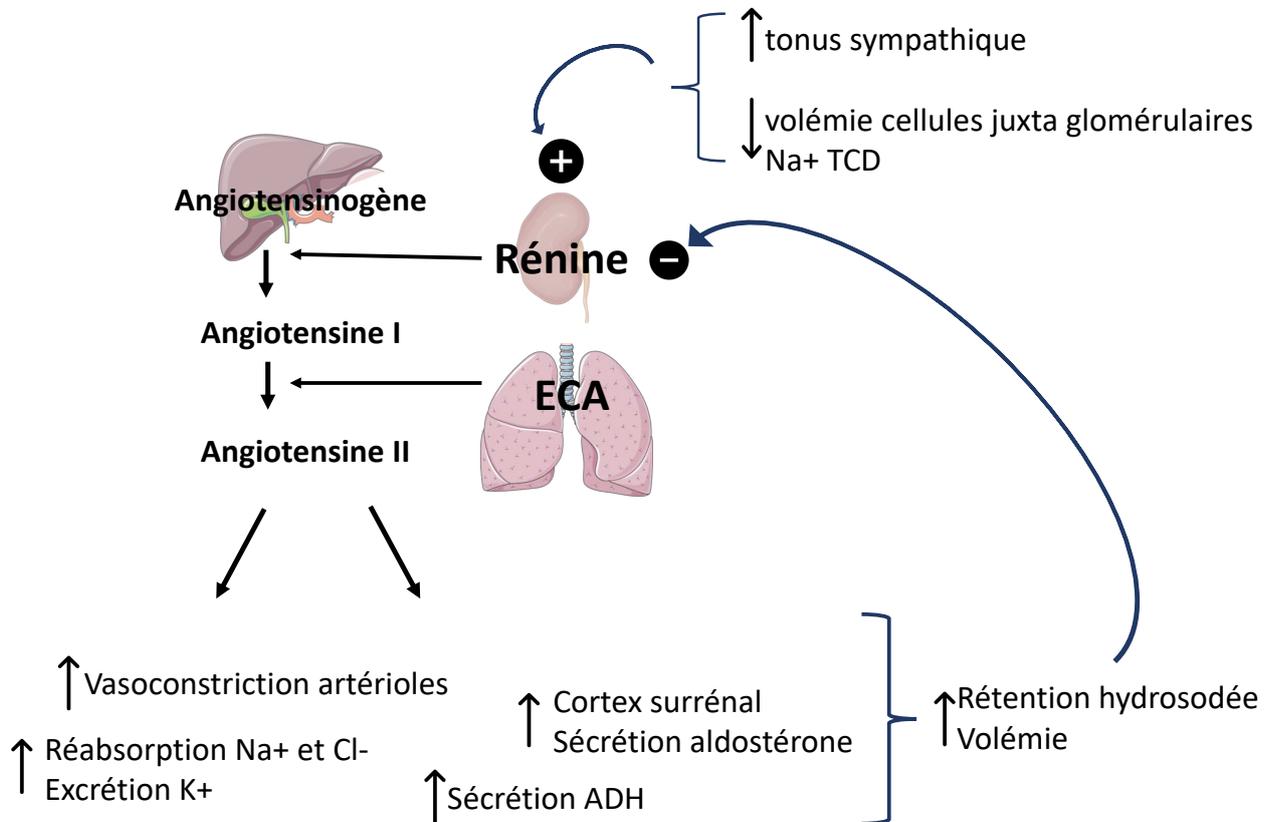


Figure 2: Cascade schématique de la régulation du système rénine-angiotensine. ADH : hormone anti-diurétique ; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine II ; TCD : tubule contourné distal.

Tigerstedt et Bergman ont découvert la rénine à la fin du 19^{ème} siècle mettant en évidence l'existence du système rénine angiotensine (SRA) (Tigerstedt and Bergman, 1898). Il est établi que le SRA a une place prépondérante dans la régulation du système cardiovasculaire en maintenant notamment une homéostasie hydrosodée. L'angiotensine II (AngII), isolée en 1940 est un octapeptide modulant la plupart des actions du SRA (Braun-Menendez et al., 1940; Page and Helmer, 1940). C'est l'effecteur principal du système en exerçant son action principalement *via* le récepteur AT1 mais aussi *via* le récepteur AT2. Physiologiquement, le SRA est un des acteurs majeurs de la régulation cardiovasculaire par son action en systémique et en local. Il a aussi une action directe sur le réseau vasculaire, les reins, les glandes surrénales et le cœur, en plus de ses effets sur le système nerveux autonome (Carey et al., 2022a; Martyniak and Tomasik, 2022).

L'angiotensinogène est une globuline plasmatique produite par le foie, et métabolisée par la rénine, une aspartyl protéase, en un peptide de 10 acides aminés l'angiotensine I (AngI). L'activité de la

rénine est augmentée en réponse à une diminution de la concentration en Na⁺ au niveau du tubule contourné distal, ou à une diminution de la volémie au niveau des cellules juxta-glomérulaires rénales de l'artériole afférente, ou encore à une stimulation du système nerveux sympathique (**Figure 2**). Par la suite, une métalloprotéase, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), hydrolyse l'AngI en AngII. L'AngII cible les récepteurs aux angiotensines AT1 (et AT2) (Skeggs et al., 1954), concourant à plusieurs effets physiologiques dont le principal est l'augmentation de la pression artérielle.

En cas de suractivation, le SRA est impliqué dans la pathogénèse de plusieurs maladies cardiovasculaires en augmentant la survenue d'HTA, d'athérosclérose ou encore d'insuffisance cardiaque. Il est notamment la cible de nombreuses thérapeutiques anti-hypertensives comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) et les antagonistes du récepteur à l'AngII (ARAI) (*cf* 1.1.6) (**Figure 3**).

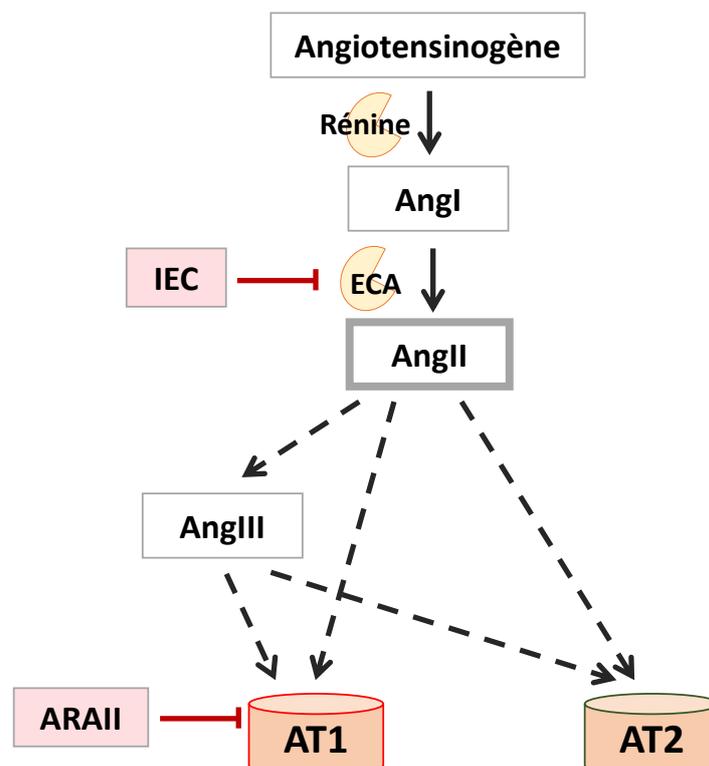


Figure 3: Représentation de « l'axe classique » du SRA. ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine ; APA, aminopeptidase A ; IEC, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ; ARAI, antagoniste des récepteurs à l'AngII.

1.1.1.1 ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGII

L'enzyme de conversion de l'AngII (ECA) est une des enzymes effectrices du SRA. C'est une métalloprotéase à zinc, exopeptidase ubiquitaire qui catalyse le clivage d'un dipeptide His-Leu à

l'extrémité C-terminale (C-ter) de l'AngI pour former l'AngII (Masuyer et al., 2014). Le gène codant (ACE) pour l'ECA est situé sur le chromosome 17 et code pour 2 isoformes : l'ECA somatique et l'ECA testiculaire. L'ECA somatique, diffère de l'ECA testiculaire qui est retrouvée exclusivement dans les spermatozoïdes, possède un segment C-ter transmembranaire et 2 domaines catalytiques homologues en N-terminal reliés par un bras (domaines N-ter et C-ter) (Figure 4) (Figure 5A). C'est le segment transmembranaire qui peut être clivé pour libérer l'ECA plasmatique (Ehlers et al., 1996). Elle est exprimée à la membrane des cellules endothéliales vasculaires ce qui lui confère une expression pulmonaire importante, mais également dans les cellules épithéliales du tubule rénal proximal (Takada et al., 1984). Elle a aussi un rôle dans la réponse immunitaire, puisqu'une augmentation de son expression améliore la défense immunitaire face aux infections (D. Cao et al., 2022).

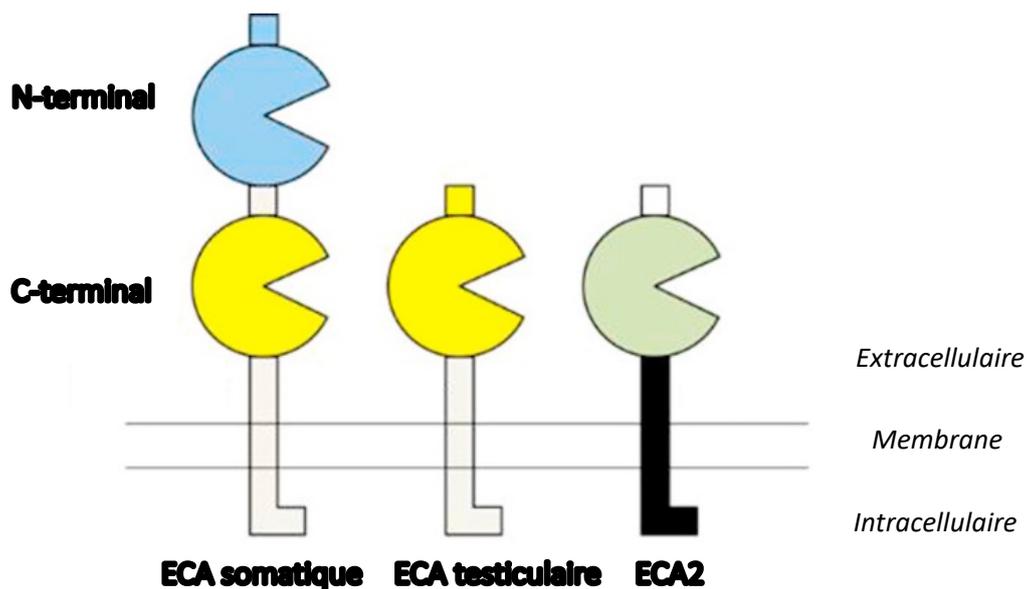


Figure 4: Représentation schématique des enzymes de conversion de l'angiotensine. ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine ; ECA2 : enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2. Schéma adapté de Wong, 2016.

En plus des angiotensines, l'ECA est aussi responsable du clivage de la bradykinine, peptide vasodilatateur, en peptides inactifs (Yang et al., 1970). Ainsi, l'activité de l'ECA génère une vasoconstriction par un double mécanisme : par production de l'AngII et par dégradation de la bradykinine vasodilatatrice. En effet, Krege et *al.* observèrent que les souris mutantes knock-out (KO) pour le gène ACE souffrent d'hypotension, de malformations rénales (Krege et al., 1995). Aussi, l'ECA est la cible d'une des plus importantes familles de thérapeutiques anti-hypertensives : les inhibiteurs de l'ECA (IEC), tels que le captopril.

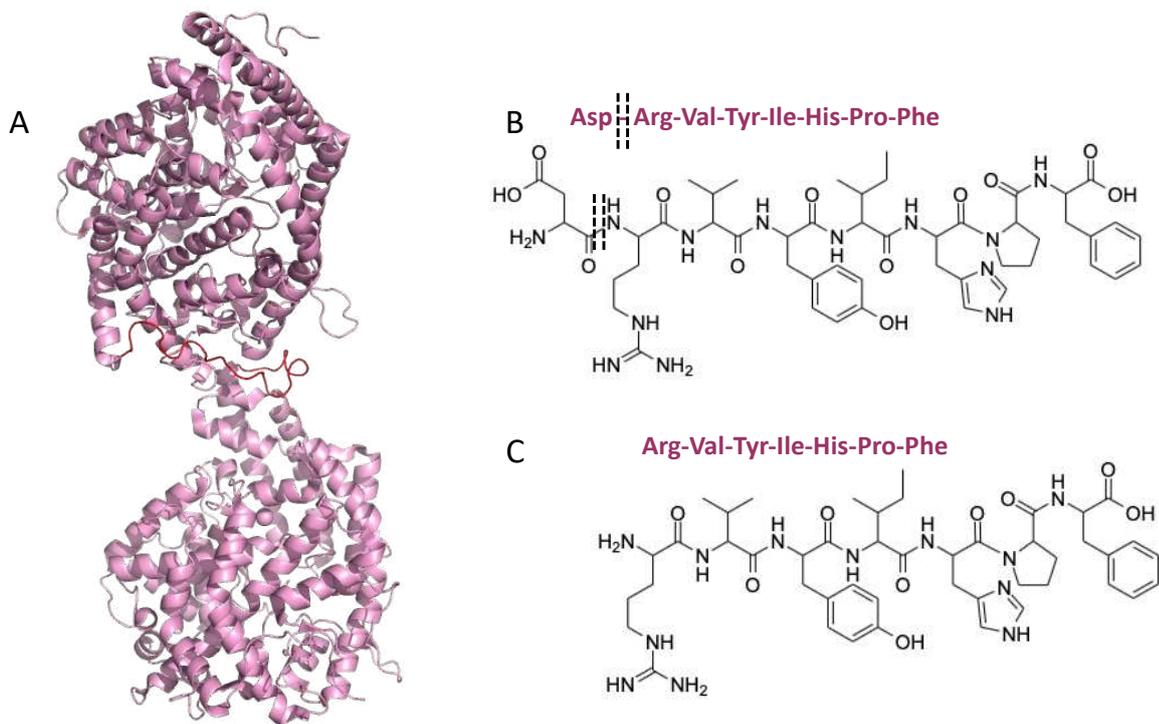


Figure 5: Structure de l'ECA, de l'AngII et de l'AngIII. (A) Structure cristallographique de l'ECA somatique (PDB 7q3y) (Lubbe et al., 2022). (B) Séquence peptidique de l'AngII. (C) Séquence peptidique de l'AngIII. Toutes les figures ont été préparées avec le Logiciel PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.4. Schrödinger, LLC).

L'AngII est le principal ligand effecteur du SRA ciblant les RCPG AT1 et AT2 avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. C'est un peptide de 8 acides aminés ($\text{NH}_2 - \text{Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe} - \text{COOH}$) obtenu par le clivage des 2 résidus en C-ter de l'AngI par l'ECA (**Figure 5B**). Elle permet de répondre à une baisse de la pression artérielle par différents effets : notamment en augmentant la vasoconstriction des artérioles, la rétention hydrosodée par sécrétion d'aldostérone, la sécrétion de vasopressine ou encore en potentialisant le tonus sympathique. Cela entraîne une augmentation de la volémie et donc de la pression artérielle (**Figure 2**) (Freeman and Page, 1937; Mukoyama et al., 1993; Schwarz et al., 1957). Les effets de l'AngII après liaison à ses RCPG cibles seront détaillés ci-après. Au niveau physiopathologique, il a été montré que les taux d'AngII se retrouvent fortement augmentés chez le patient insuffisant cardiaque, notamment au niveau du myocarde (Pavo et al., 2021).

1.1.1.2 GENERALITES SUR LES RCPG : DECOUVERTE HISTORIQUE, ACTIVATION DES RCPG ET EFFETS ASSOCIES

Les RCPG forment la plus grande famille de protéines membranaires chez les mammifères avec plus de 800 membres différents chez l'homme. Localisés à la membrane cellulaire, ce sont des médiateurs importants de la transduction de signaux par lesquels l'organisme répond aux variations exogènes impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques (Rajagopal et al., 2010). Ils sont constitués de 7 hélices α transmembranaires (TM) reliées par 3 boucles externes (ECL) et 3 boucles internes (ICL). Globalement, l'homologie de séquence entre les RCPG est faible, mais certaines séquences dans les domaines TM sont très conservées. Les disparités entre les RCPG sont surtout retrouvées au niveau des séquences en N-ter et C-ter (Kobilka, 2007). Les RCPG peuvent être divisés en plusieurs classes selon l'analyse phylogénétique des gènes codant pour les RCPG : on retrouve les sous-familles Glutamate (classe C), Rhodopsine (classe A), Adhésion (classe B), Frizzled/taste2 (classe F), Sécrétine (classe B).

La famille 'Rhodopsine' est la famille composée de plus de membres, à laquelle appartiennent notamment les récepteurs AT1 et AT2. Cette classe est caractérisée par la présence d'acides aminés très conservés comme le motif NSxxNPxxY dans le TM7 ou comme le motif DRY entre le TM3 et l'ICL2 (Fredriksson et al., 2003). De plus, la plupart des RCPG de classe A ont un pont disulfure reliant les ECL1 et ECL2 qui aide au maintien de l'intégrité du récepteur. La partie N-ter est extracellulaire et est le site de glycosylation, souvent nécessaire au bon repliement, à la stabilité et à l'expression du récepteur. La partie C-ter est cytosolique et est le site de phosphorylation, elle peut se structurer pour former une hélice 8. Cette extrémité C-ter peut être palmitoylée après l'hélice 8 à la sortie du TM7. Cette modification post-traductionnelle sert d'ancrage lipidique dans la membrane à l'origine d'une autre boucle intracellulaire (**Figure 6A**). Dans la majorité des cas, le site de liaison du ligand endogène est situé dans une cavité formée entre les TM2 à 6.

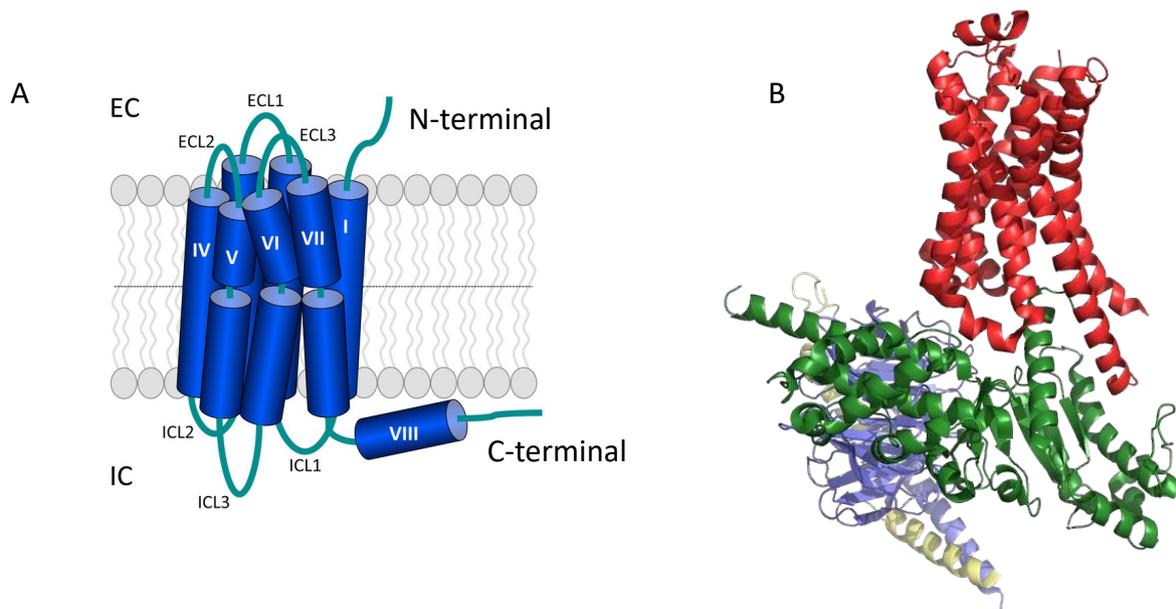


Figure 6: Structures de RCPG. (A) Représentation schématique de RCPG de classe A. ECL : extracellular loop ; ICL : intracellular loop ; EC : extracellulaire ; IC : intracellulaire. Figure adaptée de (de Munnik et al., 2015). (B) Structure cristallographique du récepteur β_2 adrénergique en complexe avec les protéines G hétérotrimériques (PDB 3sn6) (Rasmussen et al., 2011). En rouge, est représenté le récepteur, en vert la protéine $G\alpha$, en bleu clair la protéine $G\beta$ et en jaune clair la protéine $G\gamma$.

Le développement de l'étude de neuromédiateurs dans les années 1970 a mis en évidence le rôle biochimique des récepteurs, puisque l'on s'interrogeait sur le mécanisme de reconnaissance de ces molécules par la cellule. Avec l'utilisation d'hormones radioactives, l'équipe de Martin Rodbell montre que le récepteur ne peut stimuler certains effecteurs que s'il y a échange au préalable de GDP en GTP au niveau de protéines G, découverte qui lui permit de recevoir le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1994 (Rodbell, 1980). La découverte de ces protéines G et donc de la transduction du signal entre RCPG et effecteurs a été une avancée majeure dans l'étude de ces récepteurs, dénommés alors récepteurs couplés aux protéines G. Néanmoins, l'activation des RCPG initie diverses cascades de signalisation qui peuvent être dépendantes des protéines G ou indépendantes de celles-ci.

Aujourd'hui, leur importance est encore particulièrement de mise car de nouveaux mécanismes de signalisation intracellulaire ont été découverts améliorant nos connaissances sur leur régulation et leur fonction. Signe de cette importance, Robert Lefkowitz et Brian Kobilka reçoivent en 2012 le prix Nobel de chimie pour leurs travaux sur les RCPG, notamment grâce à la résolution de la structure

cristallographique du récepteur β_2 adrénergique (**Figure 6B**) et l'amélioration des connaissances de la fonction de nombreux RCPG (Bockaert, 2012; Rasmussen et al., 2007).

Sur les 826 RCPG humains clonés, environ 350 non olfactifs sont considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles et 165 d'entre eux sont des cibles thérapeutiques validées (Yang et al., 2021). Des dizaines de récepteurs orphelins existent encore aujourd'hui dont la désorphanisation paraît être importante pour la recherche de nouvelles thérapeutiques (Wu et al., 2017).

1.1.1.2.1 Mode d'action des RCPG

La structure des RCPG n'est pas statique, au contraire. Les RCPG adoptent une série de conformations dynamiques qui basculent d'un état basal inactif jusqu'à un état actif, en passant par de multiples conformations intermédiaires. Les RCPG sont constamment en mouvement rapide. Un ligand va stabiliser une conformation spécifique du récepteur engendrant le couplage ou non et l'activation de la protéine G hétérotrimérique caractéristique de cette conformation. Il existe ainsi différentes réponses pharmacologiques en fonction du type de ligand fixé au récepteur.

Lorsqu'un ligand se fixe sur son récepteur, l'effet maximum résultant n'est pas nécessairement le même pour tous les ligands. Un agoniste entier (full agonist) est caractérisé par un effet d'amplitude maximale aussi important que celui du ligand naturel. Un agoniste partiel est un agoniste dont l'amplitude de l'effet maximum est plus faible que celui de l'agoniste naturel. Un antagoniste va diminuer par compétition la liaison des autres ligands. Enfin, un agoniste inverse induit un effet pharmacologique opposé à celui de l'agoniste natif, car, contrairement à l'antagoniste, il est capable de stabiliser des changements conformationnels du récepteur différents de ceux induits par l'agoniste. Ces ligands se lient au niveau d'un site de liaison, spécifique à chaque classe de RCPG, et qui correspond au site de liaison du ligand naturel. On parle alors de ligand orthostérique. Il existe aussi des ligands dits « non compétitifs » qui ne se fixent pas sur le site orthostérique du RCPG mais qui sont capables de moduler l'activité d'un récepteur en se liant à un autre site et ne rentrant pas en compétition avec les ligands orthostériques.

1.1.1.2.2 Transduction du signal et protéines G

La fixation du ligand va entraîner des modifications conformationnelles du récepteur comme le déplacement du TM6 vers l'extérieur permettant ainsi la création d'une poche de liaison des protéines G, caractéristique de l'activation du récepteur. Le motif NSxxNPxxY participe aussi à la

formation du site de liaison des protéines G en stabilisant la position du TM6 vers l'extérieur (Rosenbaum et al., 2009; Weis and Kobilka, 2018). La liaison d'un agoniste au site orthostérique accessible par la face extracellulaire du récepteur stabilise donc le récepteur dans un état conformationnel particulier pour le couplage aux protéines G hétérotrimériques et l'implication de nombreux effecteurs intracellulaires.

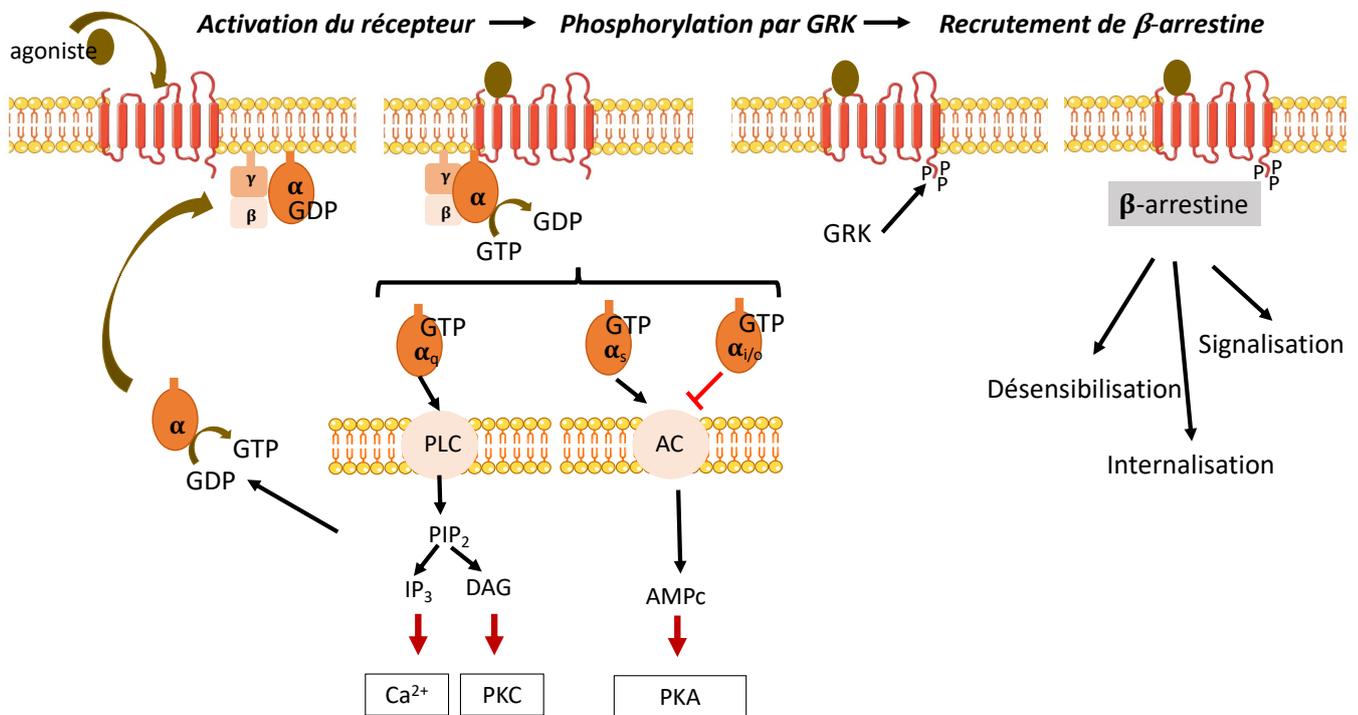


Figure 7: Représentation schématique de l'activation de RCPG, implication de protéines G et recrutement de β -arrestine. AC, adénylate cyclase ; PKA, protéine kinase A ; PLC, phospholipase C ; PIP_2 , phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; IP_3 , inositol triphosphate ; DAG, diacylglycérol ; PKC, protéine kinase C ; GRK, GPCR kinases. Figure adaptée de (Grogan et al., 2022).

Les effecteurs impliqués dans ces cascades de signalisation dépendent du recrutement de certaines protéines G. Les protéines G hétérotrimériques sont composées des sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ et fonctionnent comme des transducteurs du signal régulés par le complexe ligand-récepteur, activant ou inhibant ainsi des voies de signalisation particulières *via* une communication avec des protéines effectrices. La sous-unité α dans sa forme inactive est liée à une molécule de GDP favorisant le maintien de l'hétérotrimère sous sa forme inactive et empêchant sa dissociation. L'activation du récepteur, suite à la fixation du ligand, va induire l'interaction entre l'hélice C-terminale de la sous-unité α et le récepteur, ce qui aura pour conséquence un changement conformationnel de la sous-unité α conduisant à la libération du GDP et à la fixation d'un GTP. Cet échange provoque un changement conformationnel de la protéine G, et déclenche la dissociation de la sous-unité $G\alpha$ du

complexe Gβγ, ainsi que du récepteur. La protéine G devient ainsi active. Les Gα-GTP et Gβγ, peuvent alors chacun activer des protéines effectrices (Alhosaini et al., 2021). Par son activité GTPase intrinsèque, la sous-unité Gα va ensuite hydrolyser la molécule de GTP en GDP, permettant la reformation du complexe hétérotrimérique Gαβγ. La sous-unité Gα est composée de 2 domaines : un domaine de liaison nucléotidique très similaire aux GTPases de la superfamille Ras ainsi qu'un domaine composé de 6 hélices α (**Figure 6B**). Il existe une vingtaine de sous-unité Gα qui sont classées en 4 groupes principaux (**Tableau 1**) : Gαs, Gαi/o, Gαq/11 et Gα12/13, chacune ayant une spécificité d'engagement dans une voie particulière et d'activation d'effecteurs (Downes and Gautam, 1999). Pour les sous-types Gαs et Gαi/o, il y a respectivement activation ou inhibition de l'adénylate cyclase conduisant à la production ou à l'inhibition de la production d'AMPc, dont le niveau régule l'activité de la protéine kinase A (PKA). Il y a aussi activation des phospholipases C (PLC) avec le sous type Gαq/11, conduisant à l'hydrolyse du PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en IP₃ (inositol-1,4,5-triphosphate) et DAG (diacylglycérol). D'autre part, les RhoGEF sont activées par Gα12/13 pour moduler l'activité de la GTPase Rho (Pierce and Lefkowitz, 2001; Wettschureck and Offermanns, 2005) (**Figure 7**).

Sous-unité	Sous-types	Effecteurs
Gαs	α _{SL1} α _{SL2} α _{Ss1} α _{Ss1} α _{SOlf}	Adénylate cyclase (+)
Gαi/o	α _{i1} α _{i2} α _{i3} α _{t1} α _{t2} α _{Gus} α _{o1} α _{o2} α _z	Adénylate cyclase (-) ; Canaux K ⁺ et Ca ²⁺ GMPc PDE (+) Canaux K ⁺ (+) et Ca ²⁺ (-) Adénylate cyclase (-)
Gαq/11	α _q α ₁₁ α ₁₄ α ₁₅ α ₁₆	Phospholipase C (+)
Gα12/13	α ₁₂ α ₁₃	Phospholipase A2 (+)
Gβ	β ₁ à β ₆	Phospholipase C et A2 (+)
Gγ	γ ₁ à γ ₁₂	MAPK (+) ; PKC et PKD (+) ; Canaux Na ⁺ (+) et Ca ²⁺ (-)...

Tableau 1: Diversité des sous-unités Gα, Gβ et Gγ. (+) activation, (-) inactivation.

Enfin, le complexe Gβγ est également capable d'activer différents effecteurs y compris certains ciblés par la sous-unité Gα comme la PLC et peut moduler l'activité de certains canaux. Les protéines Gβ et Gγ existent sous plusieurs isoformes (**Tableau 1**). Il existe ainsi de nombreuses combinaisons possibles d'hétérodimères Gβγ qui jouent un rôle relativement important dans le couplage du

récepteur à la protéine G, ainsi que dans l'activation des effecteurs (Connolly, 2019). Chaque sous-unité $G\beta$ contient 7 répétitions « WD-40 », correspondant à une séquence Trp-Asp se répétant tous les 40 résidus environ et formant des feuillets β antiparallèles ; la sous-unité $G\gamma$ se replie en 2 hélices α (Neer et al., 1994) (**Figure 6B**). Contrairement à la sous-unité α , l'hétérodimère $G\beta\gamma$ ne subit pas de changement conformationnel lorsqu'il se dissocie de l'hétérotrimère.

1.1.1.2.3 Désensibilisation des RCPG et β -arrestines

Après activation par un agoniste, le RCPG perd sa capacité à répondre à un autre stimulus, c'est la désensibilisation. Ce processus est dû à la phosphorylation du récepteur, soit par les kinases activées suite à l'activation des effecteurs, comme les kinases PKA et PKC, soit par les protéines kinases GRK (G protein-coupled receptor kinases) qui phosphorylent des résidus Ser et Thr en C-ter du récepteur (Hanlon and Andrew, 2015). La phosphorylation des régions intracellulaires des RCPG par ces GRK joue un rôle essentiel dans la signalisation et la régulation du récepteur. Cette phosphorylation du récepteur induit le recrutement de protéines, les arrestines, qui vont induire l'internalisation du récepteur et l'arrêt de la signalisation protéine G dépendante (Lodowski et al., 2003).

Il existe plusieurs isoformes d'arrestines, notamment l'arrestine 2 (β -arrestine 1) (**Figure 8**) et l'arrestine 3 (β -arrestine 2) identiques à 78% et exprimées de façon ubiquitaire (DeWire et al., 2007). Les β -arrestines bloquent la signalisation protéine G dépendante *via*, d'une part, le blocage stérique de l'association du récepteur à la protéine G, mais aussi en favorisant le recrutement et l'interaction des éléments de la machinerie d'internalisation au récepteur comme la clathrine et les protéines AP-2. Il existe des disparités dans leur spécificité d'interaction avec les RCPG (par exemple, β -arrestine 1 et β -arrestine 2 sont autant capable d'induire l'internalisation du récepteur AT1 contrairement au récepteur β_2 -adrénergique), ainsi que dans leur cinétique d'internalisation et de recyclage. Après l'endocytose, le récepteur sera soit dégradé dans les lysosomes, soit recyclé vers la membrane plasmique après déphosphorylation.

Enfin, les β -arrestines fonctionnent comme des transducteurs de signal *via* l'activation de kinases comme les MAP kinases ERK1/2, de Src ou encore de la phosphoinositide 3-kinase (PI_3K), entraînant ainsi des effets physiologiques différents de ceux provoqués par les protéines G (Kohout and Lefkowitz, 2003; Peterson and Luttrell, 2017) (**Figure 7**).

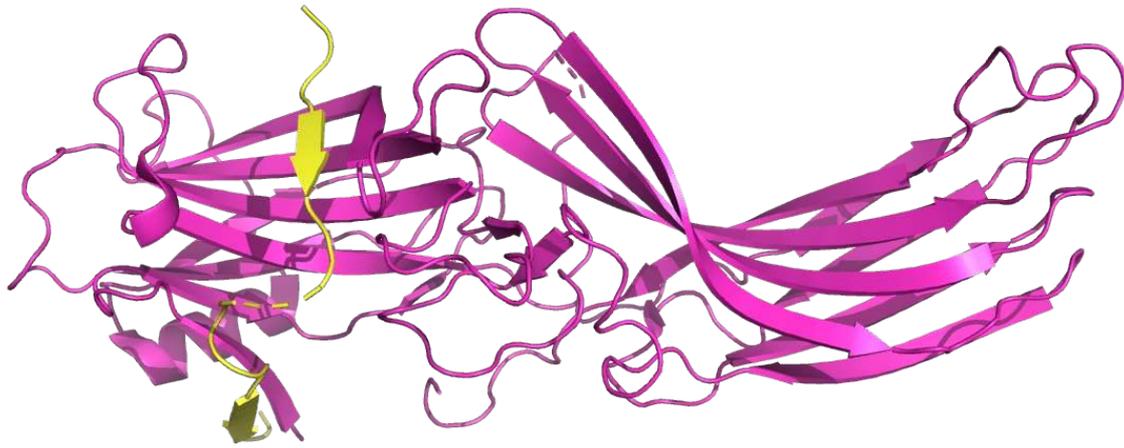


Figure 8: Structure cristallographique de la β -arrestine 1 en rose en complexe avec le V₂RPP (peptide correspondant aux 29 acides aminés C-ter phosphorylés du récepteur V₂ de la vasopressine) en jaune (PDB 4jqi) (Shukla et al., 2013).

1.1.1.2.4 Vers une notion d'agonisme biaisé

Pendant longtemps on a considéré que les RCPG fonctionnaient selon un modèle on/off dans lequel le ligand active (agoniste) ou inactive (antagoniste) l'ensemble des voies de signalisation associées au récepteur. Depuis quelques années, ce dogme est remis en question avec le concept de sélectivité fonctionnelle : un agoniste biaisé est capable d'activer sélectivement une voie de signalisation par rapport à une autre, ce qui d'un point de vue thérapeutique pourrait être intéressant avec le développement de médicaments ciblant une voie de signalisation pour diminuer les effets indésirables et/ou améliorer leur efficacité (Galés, 2012; Kenakin, 1995). Les premiers ligands biaisés ont été découverts sur les récepteurs muscariniques M1, il s'agit d'analogues de l'acétylcholine conçus pour n'activer que certaines voies dépendantes de M1 au niveau central, avec l'idée d'une stratégie thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer (Fisher et al., 1993). Certains RCPG sont alors capables, en fonction du ligand, de se coupler et d'activer un sous-type préférentiel de G α ou de β -arrestines, permettant un engagement possible dans plusieurs voies de signalisation et donc une réponse cellulaire variable (Shenoy and Lefkowitz, 2011). Pour permettre l'engagement spécifiquement dans une voie de signalisation, il est possible de stabiliser le récepteur dans un état d'activation grâce à un agoniste biaisé. Ces agonistes biaisés vont préférentiellement stabiliser l'une des nombreuses conformations que le RCPG peut adopter, ne permettant ainsi que des interactions spécifiques entre le récepteur et les protéines intracellulaires spécifiques en aval (Delaitre et al., 2021). Les RCPG activés peuvent recruter plusieurs transducteurs différents et par conséquent produire des réponses biologiques distinctes.

Ce phénomène a été étudié pour de nombreux récepteurs avec l'idée d'améliorer la thérapeutique associée. Notamment, le tramadol est un antalgique largement utilisé, dont le métabolite actif, le desmétramadol, induit une production d'AMPC dépendante des protéines G sans affecter le recrutement de la β -arrestine 2 contrairement au fentanyl et à la morphine après liaison au récepteur μ -opioïde. Cela permettrait de limiter les risques de dépression respiratoire associée à la prise de ces opioïdes (Zebala et al., 2019).

Cette notion de RCPG pouvant activer plusieurs voies de signalisation indépendamment les unes des autres est appelée 'signalisation biaisée', 'sélectivité fonctionnelle', ou encore 'efficacité pluridimensionnelle'. Cette 'sélectivité fonctionnelle' des RCPG rend l'étude de ces récepteurs plus complexe mais ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques en ciblant des voies de signalisation spécifiques afin de limiter les effets indésirables.

1.1.1.2.5 Dimérisation des RCPG

Plusieurs études suggèrent que les RCPG peuvent exister sous forme d'homo- hétérodimères avec d'autres RCPG. Cette dimérisation peut avoir des conséquences sur la liaison du ligand, sur la transduction du signal, sur l'internalisation... conférant des propriétés pharmacologiques souvent différentes de celles du monomère. Par exemple, le récepteur GABA(b) est composé de 2 sous-unités, GB1 et GB2, chacune composée de 7 domaines TM, d'une extrémité N-ter extracellulaire et d'une extrémité C-ter intracellulaire. La dimérisation des 2 sous-unités est essentielle à la fonctionnalité de GABA(b) (Galvez et al., 2001). Aussi, les récepteurs AT1 et B2 (récepteur à la bradykinine) sont connus pour former des hétérodimères, participant à l'augmentation de la vasodilatation (AbdAlla et al., 2000).

1.1.1.2.6 Les RCPG comme cibles thérapeutiques

Les RCPG représentent une famille de cibles médicamenteuses privilégiées couvrant plus de 30% des médicaments approuvés par la FDA. Grâce au clonage moléculaire de centaines de récepteurs, les efforts se sont concentrés sur le développement de ligands sélectifs pour chacun d'entre eux. Néanmoins, parmi les 460 thérapeutiques ciblant les RCPG, la plupart sont des petites molécules organiques. De nombreuses recherches de nouvelles thérapeutiques ciblant les RCPG sont mises en

avant notamment avec le développement de ligands de nature protéique qui ont l'avantage de conférer une forte spécificité de cible.

Aujourd'hui, les RCPG sont une cible majeure pour le développement de médicaments en raison de leur implication dans la régulation de nombreux processus physiologiques chez l'homme, notamment au niveau du système nerveux central (SNC) et des systèmes cardiovasculaire, respiratoire, métabolique et urogénital (Alhosaini et al., 2021). Ce sont les RCPG de classe A qui sont ciblés par 94% de ces thérapeutiques. En revanche, même si elle n'est composée que d'une quinzaine de membres, les récepteurs de la classe B1 (famille des sécrétines) sont presque tous la cible de thérapeutiques. Ils sont impliqués dans la survenue du diabète (type 2), de maladies cardiovasculaires, de cancer, ou encore de troubles psychiatriques (Alhosaini et al., 2021).

Il existe de nombreux médicaments utilisés en routine ciblant les RCPG des systèmes cardiovasculaire, nerveux, endocrinien... Parmi les médicaments anti-diabétiques de type 2, on retrouve l'albiglutide, ciblant le récepteur GLP-1 (EMA, 2018a). Comme médicament anti-agrégant plaquettaire, le clopidogrel cible le récepteur P2Y₁₂, indiqué dans le traitement du syndrome coronarien aigu (EMA, 2018b). Des antagonistes du récepteur à la bradykinine B2 sont aussi sur le marché comme l'icatibant pour le traitement de l'angioœdème (EMA, 2018c). Le latanoprost cible le récepteur F à la prostaglandine pour le traitement de l'hypertension oculaire (EMA, 2018d). Au niveau neurologique, le levodopa est indiqué dans la prise en charge de Parkinson en ciblant les récepteurs GPR143 (EMA, 2018e). Enfin, un des blockbusters mondiaux, l'aripiprazole, agoniste du récepteur 5HT-1_A, est indiqué dans le traitement de la schizophrénie et des troubles bipolaires (EMA, 2018f). Les progrès technologiques récents dans la biochimie des RCPG ont fourni une grande quantité d'informations qui bénéficient à la conception de médicaments. Néanmoins, de nombreux RCPG sont encore orphelins et nécessitent une étude pharmacologique approfondie.

1.1.1.3 LE RECEPTEUR AT1

Le récepteur AT1, généralités

L'AngII est le ligand endogène principal du récepteur AT1 avec une affinité de 2 nM (Bosnyak et al., 2011). L'angiotensine III (AngIII) est connue comme étant aussi un ligand endogène du récepteur AT1 avec une affinité similaire (Yugandhar and Clark, 2013). C'est un RCPG de classe A de 359 acides aminés dont le gène (*AGTR1*) est situé, chez l'homme, sur le chromosome 3 (Sandberg et al., 1992). Il est classiquement constitué de 7 domaines transmembranaires hydrophobes formant des hélices α , ainsi que 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires reliant chaque domaine

transmembranaire entre eux (de Gasparo et al., 2000). C'est au niveau des domaines extracellulaires et de la queue N-ter que se trouvent les 3 sites de glycosylation (Asn4, Asn176 et Asn188), ainsi que les 4 résidus cystéines d'AT1, formant un pont disulfure entre les cystéines 101 et 180, ainsi qu'entre les cystéines 18 et 274 permettant de stabiliser la structure du récepteur (Fillion et al., 2013). L'extrémité C-ter est impliquée dans plusieurs processus importants d'AT1 comme la transduction de signal, la désensibilisation et l'internalisation à la suite de l'activation du récepteur. Le début de ce domaine est composé d'une dizaine d'acides aminés structurés en hélice α formant l'hélice 8, positionnée de façon presque parallèle à la membrane plasmique. Cette hélice 8 joue notamment un rôle dans le couplage et à l'activation de protéines G (Karnik et al., 2015). Après activation, le récepteur AT1 subit une rapide désensibilisation, il perd sa capacité à répondre à un autre stimulus, et est internalisé (Zhang et al., 2017).

Le récepteur AT1, expression et rôles biologiques

Les récepteurs AT1 sont largement exprimés : au niveau vasculaire (sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux) ; au niveau cardiaque (sur les cardiomyocytes) ; au niveau rénal (au niveau du tube proximal) ; au niveau surrénalien (sur les cellules de la zone glomérulée de la corticosurrénale) ; au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques ; au niveau de la neurohypophyse (Kaschina and Unger, 2003; Reid, 1992).

La liaison de l'AngII à AT1 entraîne des effets physiologiques multiples finement régulés, notamment aux niveaux cardiovasculaire et cérébrovasculaire. L'AngII agit directement sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux en augmentant la concentration cytosolique de calcium responsable d'une vasoconstriction ; sur les cardiomyocytes, l'activation de ces récepteurs entraîne une hypertrophie et un remodelage cardiaque (Paradis et al., 2000). Au niveau des glandes surrénales, l'AngII entraîne la sécrétion d'aldostérone qui augmente la réabsorption de Na^+ , l'excrétion de K^+ et mène ultimement à une augmentation de la réabsorption d'eau au niveau des reins (Leite et al., 2022). Une autophagie dans les cardiomyocytes, accompagnée d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires *via* l'activation de PKC ϵ est aussi observée (Xiao et al., 2021).

En plus de son importance majeure au niveau cardiovasculaire, ce récepteur semble être aussi impliqué dans l'activité immunitaire ainsi que dans les processus inflammatoires et dégénératifs. Les cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes T, les cellules natural killer (NK), les

macrophages et les cellules dendritiques, expriment les récepteurs de l'angiotensine et réagissent aux concentrations locales d'AngII (Nataraj et al., 1999). Il a été démontré que les inhibiteurs de l'ECA et les ARAlI avaient des effets bénéfiques sur la régénération osseuse, avec un intérêt thérapeutique dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Flammer et al., 2008). Enfin, de nombreuses études ont lié les facteurs de risque cardio- et cérébro-vasculaires à la survenue de maladies neurodégénératives (Wu et al., 2022). Il a ainsi été mis en évidence que bloquer AT1 pourrait être une piste thérapeutique dans le traitement de la maladie de Parkinson (Udovin et al., 2021).

Le récepteur AT1, liaison de l'AngII

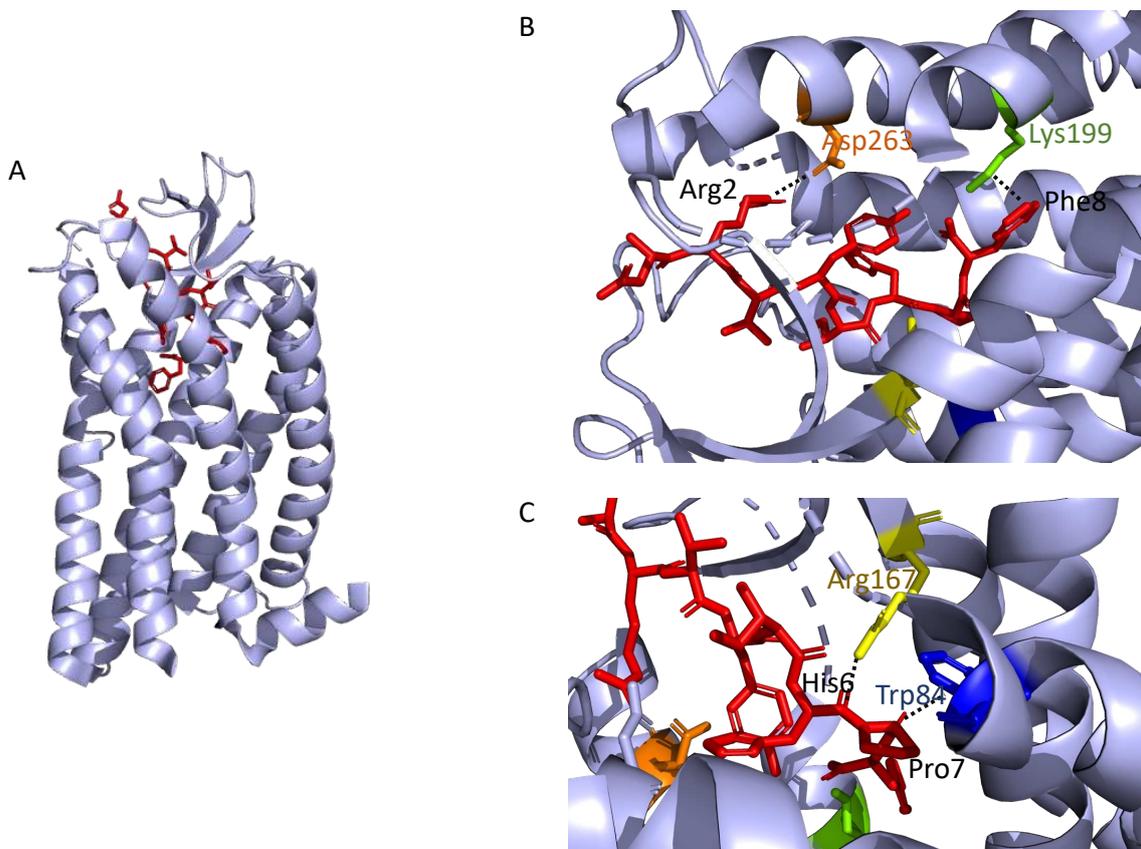


Figure 9: Structure cristallographique du récepteur AT1. (A) Structure cristallographique de AT1 stabilisé dans l'état actif en gris avec l'AngII en rouge (PDB 6os0) (Wingler et al., 2020). (B-C) Zoom des principales interactions entre l'AngII et AT1.

Le récepteur AT1 régule presque toutes les actions de l'AngII et peut exister sous plusieurs isoformes dont une conformation active (**Figure 9A**) responsable des effets physiologiques de l'AngII. Plus spécifiquement, le récepteur AT1 est capable d'acquérir différentes conformations en fonction du ligand stabilisant un état conformationnel particulier, cela entraîne l'engagement dans différentes voies de signalisation. A ce jour, 6 structures cristallographiques de complexe AT1-ligands ont été

résolues. En premier lieu, Zhang et al. ont réussi à obtenir la structure du récepteur AT1 en présence de l'antagoniste sélectif précurseur du candésartan ZD7155 (PDB 4yay) (Zhang et al., 2015). La structure du complexe AT1-AngII a ensuite été résolue (PDB 6os0) (Wingler et al., 2020). La structure cristallographique du peptidomimétique de l'AngII Sar1, Ile8-AngII (SI), de séquence NH₂-Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile-COOH, dans lequel l'Asp1 est remplacé par une Sar et la Phe8 par une Ile, a aussi été résolue après liaison au récepteur AT1 (PDB 6do1) (Wingler et al., 2019).

Ces résolutions de structures cristallographiques fournissent ainsi des informations importantes sur les relations structure-activité du récepteur. Il en résulte que la partie N-ter de l'AngII est orientée vers le côté extracellulaire, alors que le C-ter du peptide pénètre dans le récepteur, avec la phénylalanine ou l'isoleucine enfoncée dans le cœur du récepteur. Ces informations structurales renseignent sur les modes de liaison de ligands sur AT1. Pour les peptides angiotensines, leur liaison à AT1 est modulée entre autres par leur(s) résidu(s) en C-ter. Plus particulièrement, au niveau de la poche de liaison, la Phe8 interagit avec la Lys199, induisant une rotation vers l'intérieur du TM5 puis un mouvement de Leu112 pour déplacer le TM3. La Pro7 interagit aussi avec le Trp84 et l'Arg167 ; la His6 préférentiellement avec l'Asp281 et l'Arg167 ; enfin l'Arg2 interagit surtout avec l'Asp263 (Wingler et al., 2020) (**Figure 9B,C**).

Le récepteur AT1, signalisation intracellulaire

Le récepteur AT1 active de nombreuses voies de signalisation, dépendantes ou indépendantes des protéines G.

L'implication de G α q est la voie principale activant la voie de la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG) avec *in fine* augmentation du calcium cytosolique. C'est le principal mécanisme de transduction du signal impliquant AT1 surtout dans les cellules vasculaires, neuronales, cardiaques, rénales... Le récepteur AT1 active aussi les protéines G α i/o inhibant l'adénylate cyclase et donc diminuant la production d'AMPc (Shibata et al., 1996). L'activation d'AT1, *via* son couplage à G α 12/13, peut également activer la voie RhoA/Rho kinase, participant ainsi à la contraction, au remodelage et à l'inflammation vasculaires induits par l'AngII (Wirth et al., 2008). AT1 recrute aussi certaines voies des MAPK comme ERK1/2 (Tsuda T et al., 1992), la tyrosine kinase JAK2 (Marrero et al., 1995) ou encore la NADPH oxydase (Griendling et al., 1994; Nguyen Dinh Cat et al., 2013). L'activation de AT1 phosphoryle et active la PLA₂, permettant le relargage d'acide arachidonique impliqué dans la régulation du tonus musculaire (Freeman et al., 1998) (**Figure 10**).

Après stimulation par l'AngII, AT1 subit également une phosphorylation sur ses résidus Ser et Thr en C-ter par les GRK. Comme mentionné, ce processus de phosphorylation est une caractéristique commune des RCPG de classe A et augmente les affinités des β -arrestine 1 et β -arrestine 2 pour le récepteur. Cela permet le recrutement de ces protéines à la membrane intracellulaire du récepteur, voie indépendante des protéines G et aux conséquences physiologiques opposées à celles des protéines G (Hunyady and Catt, 2006). Une fois recrutées par AT1, les β -arrestines permettent l'engagement dans des voies de signalisation alternatives aux effets cardiobénéfiques. En effet, la β -arrestine 2 agit peut activer les protéines Src, ERK1/2, AKT et PI3K concourant à des effets cytoprotecteurs, anti-apoptotiques, anti-inflammatoires (Delaitre et al., 2021).

La phosphorylation de ERK1/2 médiée par l'AngII via AT1 est ainsi protéines G-dépendante et β -arrestine dépendante. Néanmoins, la composante protéines G-dépendante active ERK rapidement après stimulation de l'AngII (pic de phosphorylation entre 3 et 5 min), alors que la composante β -arrestine dépendante stabilise ce signal plus tardivement (Ahn et al., 2004).

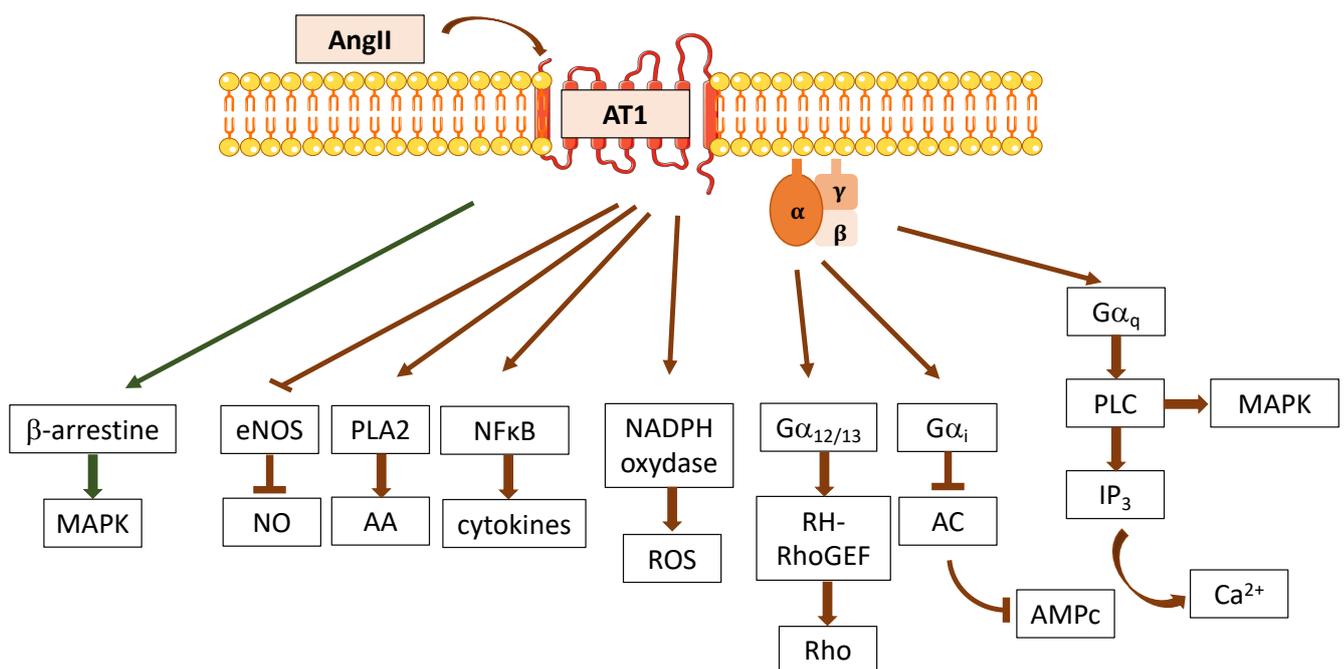


Figure 10 : Voies de transduction du signal après activation de AT1 par l'AngII. AA : acide arachidonique ; NO : nitric oxid ; ROS ; reactive oxygen species.

Ligands biaisés et récepteur AT1

Le récepteur AT1 est un RCPG qui module les effets de l'AngII à la fois à travers les voies des protéines G et à la fois à travers la voie β -arrestine. Néanmoins, bloquer la capacité de AT1 à activer $G\alpha_q$ n'affecte pas son internalisation, ni sa capacité à recruter la β -arrestine (Wei et al., 2003). Il a donc été montré une sélectivité fonctionnelle pour le récepteur AT1 entre les voies $G\alpha_q$ et β -arrestine mettant en évidence 2 classes distinctes d'agonistes biaisés pour le récepteur AT1 : les agonistes biaisés $G\alpha_q$ et les agonistes biaisés β -arrestine qui activent préférentiellement ou exclusivement ces voies.

C'est le peptide Sar1, Ile8-AngII (SI) qui le premier a été reporté comme agoniste partiel du récepteur AT1. Il permet l'engagement préférentiel dans la voie de la β -arrestine par rapport à l'activation de $G\alpha_q$, avec cependant la possibilité d'impliquer d'autres protéines G. Son affinité est de l'ordre de 1 nM et il est particulièrement utilisé lors des tests *in vitro* sur AT1 (Miura and Karnik, 1999). Surtout, le premier agoniste biaisé β -arrestine a été découvert par Wei H *et al.* qui ont montré l'engagement dans la voie β -arrestine du récepteur AT1 après fixation par le Sar1, Ile4, Ile8-AngII (SII). Malgré une affinité plus faible pour AT1 que SI, ce peptide est incapable d'activer les protéines G mais recrute la β -arrestine, entraînant l'internalisation du récepteur et l'activation de ERK1/2. Cela entraîne des effets physiologiques différents de ceux de l'AngII (Holloway et al., 2002; Wei et al., 2003).

Les RCPG ne se retrouvent pas seulement dans une conformation active ou inactive, mais adoptent une série de conformations dynamiques variant rapidement entre elles. Il a été montré que AT1 adopte plusieurs états conformationnels : au moins une conformation inactive, une conformation active canonique qui peut se coupler à la fois aux voies $G\alpha_q$ et β -arrestine, et également une conformation active alternative lors du recrutement de β -arrestine. De nombreuses études structurales ont ainsi mis en évidence que la liaison d'un agoniste biaisé β -arrestine, *a contrario* d'un ligand biaisé $G\alpha_q$, entraîne des changements de conformation du récepteur, conformation responsable de l'engagement dans une voie de signalisation (Nivedha et al., 2022). Le récepteur AT1 est un récepteur modèle pertinent pour l'étude de ces phénomènes biaisés car de petites modifications structurelles de l'AngII conduisent à une signalisation fortement biaisée.

Nous avons comparé les structures du récepteur AT1 en présence de l'antagoniste ZD7155 (forme inactive en bleu foncé), ou en présence de l'AngII (forme canonique active en cyan), ou en présence du ligand biaisé β -arrestine, le TRV023, de séquence NH_2 - Sar-Arg-Val-Tyr-Lys-His-Pro-Ala - COOH

(forme active alternative en bleu gris) (**Figure 11A, B, C**). On observe tout d'abord un changement marqué de conformation de l'hélice 8 entre les 2 formes actives et la conformation inactive. La position de l'hélice 8 de la forme inactive provoque un encombrement stérique qui l'empêche de se lier aux protéines G et à la β -arrestine, *a contrario* des 2 autres formes. On observe aussi qu'en présence de l'AngII ou de l'agoniste biaisé TRV023 il y a un déplacement vers l'extérieur du TM6 pour les formes canonique active et active alternative, à la différence de la forme inactive. Cette modification est une caractéristique de l'activation du récepteur, caractéristique aussi des récepteurs classe A. Ce réarrangement du TM6 est dû à un changement de l'interaction à l'état inactif entre N111 et N295 (Yang et al., 2021). En effet, l'interaction entre ces 2 Asn stabilise le récepteur dans une conformation inactive (Rosenbaum et al., 2009).

La liaison de ligands biaisés β -arrestine et de l'AngII provoque un changement de conformation de N295, tandis que seule la liaison d'AngII entraîne le mouvement de N111. Ce mouvement de N111 paraît essentiel dans l'activation de $G_{\alpha q}$ car les TM5 et 6 sont déplacés vers l'extérieur, créant un site de liaison pour les protéines G_{α} sur la face cytoplasmique du récepteur (Lu et al., 2021; Wingler et al., 2020) (**Figure 11D**). La chaîne latérale de la Phe8 de l'AngII entraîne aussi une légère rotation du TM3, non retrouvée en présence de l'Ala8 du TRV023. Globalement, ce sont les acides aminés en C-ter du peptide qui ont un impact majeur sur la signalisation biaisée. Une substitution de cette Phe8 de l'AngII par une Ile ou Ala diminue la signalisation médiée par $G_{\alpha q}$ mais pas le couplage β -arrestine (Strachan et al., 2014). Ces changements de conformation entre les 2 formes canonique active et active alternative sont plus subtiles, mais montrent la plasticité intrinsèque des RCPG (Wingler et al., 2020).

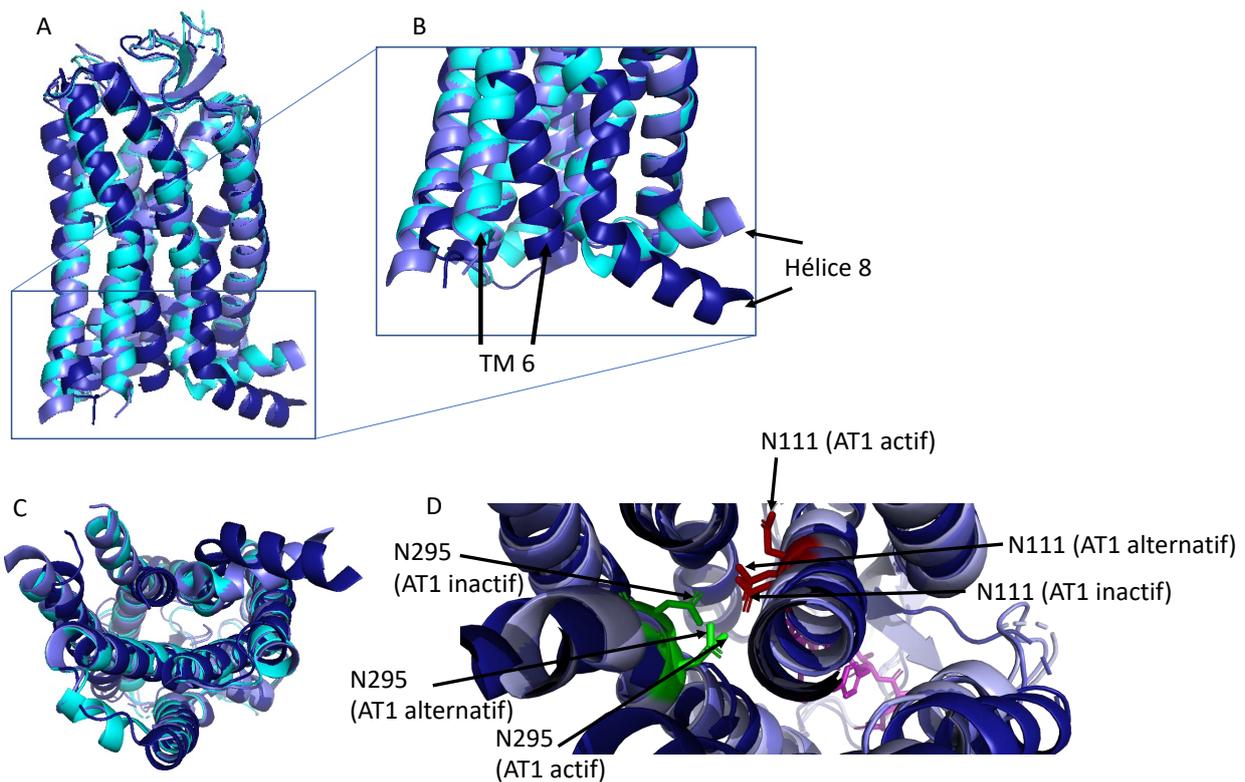


Figure 11: Structure cristallographique des différentes conformations du récepteur AT1. (A) Superposition des structures cristallographiques de la forme canonique active de AT1 en cyan (PDB 6os0) (Wingler et al., 2020), de la forme inactive de AT1 en bleu foncé (PDB 4yay) (Zhang et al., 2015), de la forme active alternative en bleu-gris (PDB 6os1) (Wingler et al., 2020). (B) Zoom de (A). (C) Vue intracellulaire de la superposition de (A). (D) Mise en évidence des résidus N111 (en rouge) et N295 (en vert) de la forme active, de la forme alternative et de la forme inactive de AT1. TM6 : domaine transmembranaire 6.

Les agonistes biaisés $G\alpha_q$ entraînent une augmentation de la pression artérielle et les agonistes biaisés β -arrestine augmentent la contractilité des cardiomyocytes et la performance cardiaque, favorisant ainsi des effets cardioprotecteurs. Des études sur le modèle murin ont mis en évidence ces effets bénéfiques du recrutement de β -arrestine dans l'hypertrophie cardiaque, l'insuffisance cardiaque, l'ischémie et l'hypertension (Lino and Barreto-Chaves, 2022). Les ARAll sont des antagonistes des récepteurs AT1 bloquant à la fois la voie β -arrestine et la voie $G\alpha_q$, pouvant expliquer les effets indésirables de ces thérapeutiques. Ainsi, l'intérêt de développer des ligands biaisés β -arrestine s'est accru et a mené aux agonistes biaisés TRV par Trevena (Soergel et al., 2013; Violin et al., 2010). Notamment, le TRV027 est analogue du SII mais avec une affinité bien meilleure pour le récepteur AT1 qui est allé jusqu'en phase IIb pour le traitement de l'insuffisance cardiaque aigue n'apportant pas de bénéfice par rapport au placebo (Pang et al., 2017; Yang et al., 2021).

Une activité constitutive du récepteur AT1

La plupart des RCPG possèdent une activité basale : même en absence d'agoniste, une certaine population de récepteurs peut être dans un état actif (Weis and Kobilka, 2018). C'est le cas de AT1, qui contient un pool constitutivement actif d'environ 5% (Unal and Karnik, 2014). Dans l'état inactif de AT1, il y a une interaction stable entre l'Asn111 et l'Asn295 du récepteur. Lors de la fixation de l'AngII, l'Asn111 située dans le TM3 joue un rôle central dans l'activation du récepteur AT1 (Noda et al., 1996). Cette activation pivote le TM6 vers l'extérieur et déstabilise l'interaction entre Asn111 et Asn295. Pour l'étude de l'activité basale constitutive, il est possible d'utiliser des mutants de AT1, par exemple, le mutant N111G, dans lequel l'Asn111, pilier de la stabilisation dans un état inactif par interaction avec l'Asn295, est remplacée par une glycine. Cela permet d'induire une activité constitutive du récepteur (Feng et al., 1998). Ce récepteur AT1 mutant N111G est un outil important dans la caractérisation pharmacologique de petites molécules organiques ou de peptides. Cette activation constitutive est néanmoins bloquée par les antagonistes des récepteurs à l'AngII comme le losartan.

1.1.1.4 LE RECEPTEUR AT2

Le récepteur AT2, généralités

Le récepteur AT2 est aussi un RCPG de classe A de 363 acides aminés dont le gène codant (*AGTR2*) est situé sur le chromosome X (Kambayashi et al., 1993). L'AngII est aussi le ligand endogène principal du récepteur AT2 avec une affinité similaire à celle pour AT1 (Bosnyak et al., 2011). Les récepteurs AT1 et AT2 ont seulement 34% d'homologie de séquence avec des disparités notamment au niveau de la partie C-ter et de la boucle ICL3 (Namkung et al., 2018). Comme pour le récepteur AT1, AT2 possède 4 cystéines du côté extracellulaire formant un pont disulfure entre les cystéines 35 et 290, ainsi qu'entre les cystéines 117 et 195 (Zhang et al., 2017). Il est plus difficile de comprendre les fonctions associées au récepteur AT2 et ces fonctions sont encore controversées aujourd'hui. Cela est dû en partie au fait que ce RCPG est à la fois nettement moins exprimé au niveau périphérique que le récepteur AT1 et à la fois surtout exprimé pendant la vie fœtale. Il semblerait néanmoins que le récepteur AT2 soit une voie protectrice du SRA, contrebalançant les effets de l'axe AngII/AT1.

Le récepteur AT2, expression et rôles biologiques

Le récepteur AT2 est fortement exprimé pendant la vie embryonnaire. Néanmoins, chez l'adulte, le récepteur AT2 est surtout exprimé dans le rein et dans le cœur, mais en nettement moins grande

quantité que le récepteur AT1 (Miyata et al., 1999). L'axe AngII/AT2 a des effets opposés à l'axe AngII/AT1. Le récepteur AT2 a de nombreuses actions physiologiques préventives. Il entraîne des effets antifibrotique, anti-inflammatoire, neuroprotecteur, anti-hypertenseur, vasodilatateur, anti-apoptotique et augmente la natriurèse (Carey and Padia, 2008; Johnson and Malvin, 1977; Namsolleck et al., 2014). Ces effets concourent à abaisser la pression artérielle dans le modèle murin hypertendu (Carey et al., 2022b). Le récepteur AT2 est aussi exprimé au niveau du SNC proche des aires de contrôle cardiovasculaire, dans le noyau du tractus solitaire, dans l'area postrema, et y influencerait la pression artérielle (Sumners et al., 2020).

Son activation provoque une action anti-inflammatoire qui aurait aussi son intérêt dans le traitement d'autres pathologies comme la goutte ou l'arthrite chez le modèle murin (Sehnert et al., 2022; Vieira et al., 2022). L'agoniste C21 est même en phase IIa pour le traitement du syndrome de Raynaud et a montré un bénéfice dans le réchauffement plus rapide des doigts (Herrick et al., 2022). Il est aussi en phase III pour le traitement de patients hospitalisés pour une infection au SARS-CoV-2 et montre un intérêt en limitant les lésions pulmonaires à long terme (Vicore Pharma AB, 2022). Par ailleurs, un blocage du récepteur AT2 permettrait de diminuer la progression de glioblastome dans un modèle de xénogreffe orthotopique (Perryman et al., 2022).

Le récepteur AT2, liaison de l'AngII

Asada et al. ont résolu la structure cristallographique du récepteur AT2 avec la Sar1, Ile8-AngII puis avec l'AngII: de la même façon que pour le récepteur AT1, la partie C-ter du ligand s'enfonce dans le récepteur alors que sa partie N-ter reste exposée en extracellulaire. La poche de liaison est étroite, expliquant pourquoi les peptides plus longs en C-ter comme l'AngI ne peuvent pas se fixer au récepteur AT2 (Asada et al., 2020, 2018) (**Figure 12A**). Le mode de liaison de AngII et de Sar1, Ile8-AngII au récepteur AT2 est très similaire et les principaux résidus responsables de l'interaction sont conservés de façon équivalente entre les récepteurs AT1 et AT2. Il y a de nombreuses interactions entre le ligand et le récepteur AT2, par exemple, la Pro7 interagit avec l'Arg182, la Phe8 est en interaction avec la Lys215 et Met128, l'His6 avec la Tyr104 ou encore l'Arg2 interagit avec l'Asp279 (Asada et al., 2018) (**Figure 12B,C**). Dans sa forme inactivée (Perryman et al., 2022), l'interaction stabilisant la forme inactive majeure équivalente à celle de AT1 est entre Asn127 et Ser311 (Asada et al., 2020).

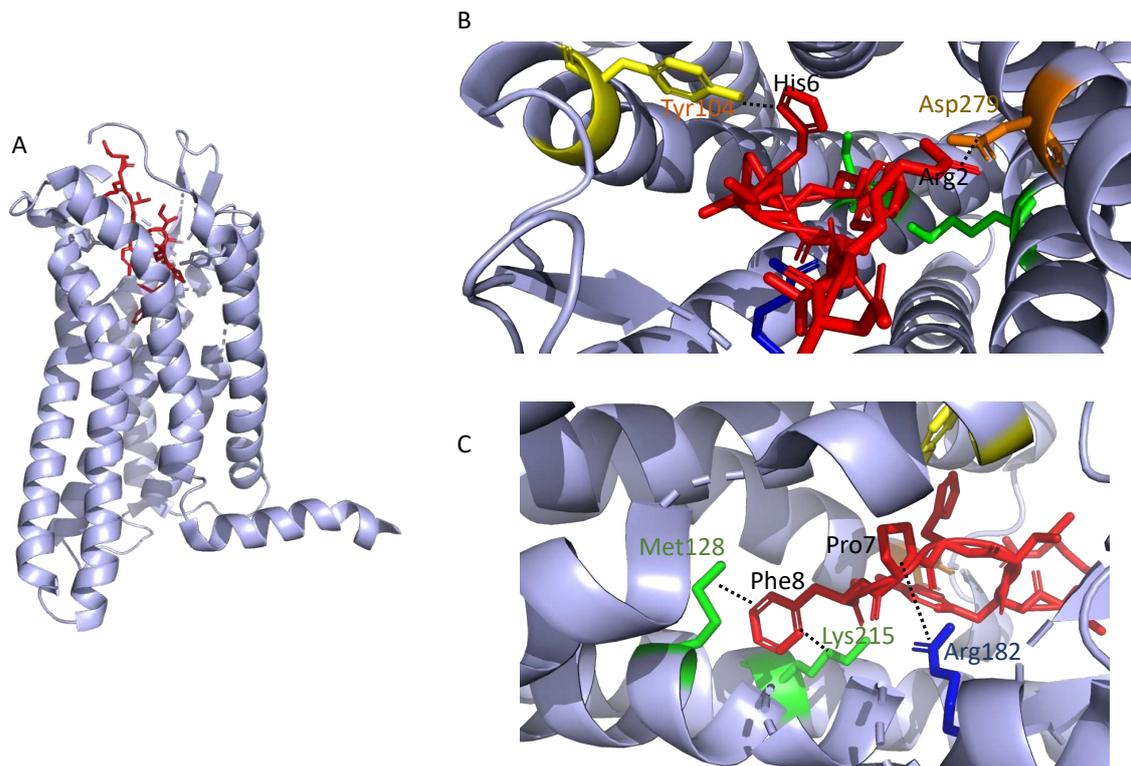


Figure 12: Structure cristallographique du récepteur AT2. (A) Structure cristallographique de AT2 stabilisé dans l'état actif en gris avec l'AngII en rouge (PDB 6jod) (Asada et al., 2020). (B-C) Zoom des principales interactions entre l'AngII et le récepteur AT2.

Le récepteur AT2, signalisation intracellulaire

La signalisation du récepteur AT2 est atypique pour un RCPG et incomplètement comprise. Les effets opposés des récepteurs AT1 et AT2 sont expliqués par des engagements dans différentes voies de signalisation. En effet, contrairement aux récepteurs AT1, AT2 ne semble pas être en mesure d'activer les protéines G. Le récepteur AT2 n'agirait ni sur G α s, ni sur G α q ni sur G α 12/13 (Zhang and Pratt, 1996). Quelques études montrent que AT2 active G α i (Hansen et al., 2000; Hayashida et al., 1996; Kang et al., 1994), ou une protéine G non spécifiée qui n'est pas G α i (Buisson et al., 1995). D'autres études montrent que les voies de signalisation semblent être indépendantes de toute protéine G (Connolly et al., 2019). Il reste encore de nombreuses zones d'ombre sur l'activation des protéines G par AT2, surtout concernant la voie G α i.

Le récepteur AT2 pourrait néanmoins stimuler différentes phosphatases, comme les Tyr et Ser/Thr phosphatases : PP2A, MKP-1 et SHP-1 (Bedecs et al., 1997; Fischer et al., 1998; Peluso et al., 2018). À la suite de son activation par AT2, SHP-1 forme un complexe avec ATIP et SHP-1-ATIP transloque ensuite au noyau où elles induiront une augmentation de l'expression de MMS2 (Li et al., 2007). Récemment, l'inhibition de HDAC1 et l'activation de p53 ont été identifiées comme de nouveaux

mécanismes de signalisation couplés au récepteur AT2 (Peluso et al., 2022). Le récepteur AT2 permet d'activer la eNOS (Hiyoshi et al., 2005; Peluso et al., 2018) et une des seules voies de signalisation communes à AT1 serait celle du NO/GMPc. Enfin, au contraire du récepteur AT1, le récepteur AT2 n'est pas internalisé après la stimulation par un agoniste (Nouet and Nahmias, 2000; Turu et al., 2006).

En comparant les structures cristallographiques active et inactive, on remarque que l'hélice 8 est totalement retournée à 180° vers l'intérieur du récepteur dans la forme inactive, empêchant totalement la fixation de protéines G et de β -arrestine. Asada et *al.* ont résolu la structure de AT2 dans l'état actif en présence de l'AngII (PDB 6jod), dans ce cas, l'hélice 8 adopte une conformation plus canonique (Asada et al., 2020). Néanmoins, la structure de la forme inactive révèle certaines caractéristiques habituellement uniquement présentes pour les récepteurs actifs. Par exemple, le TM6 est aussi plus ouvert vers l'extérieur dans la forme inactive, et le TM5 au contraire déplacé vers l'intérieur (Zhang et al., 2017) (Figure 13).

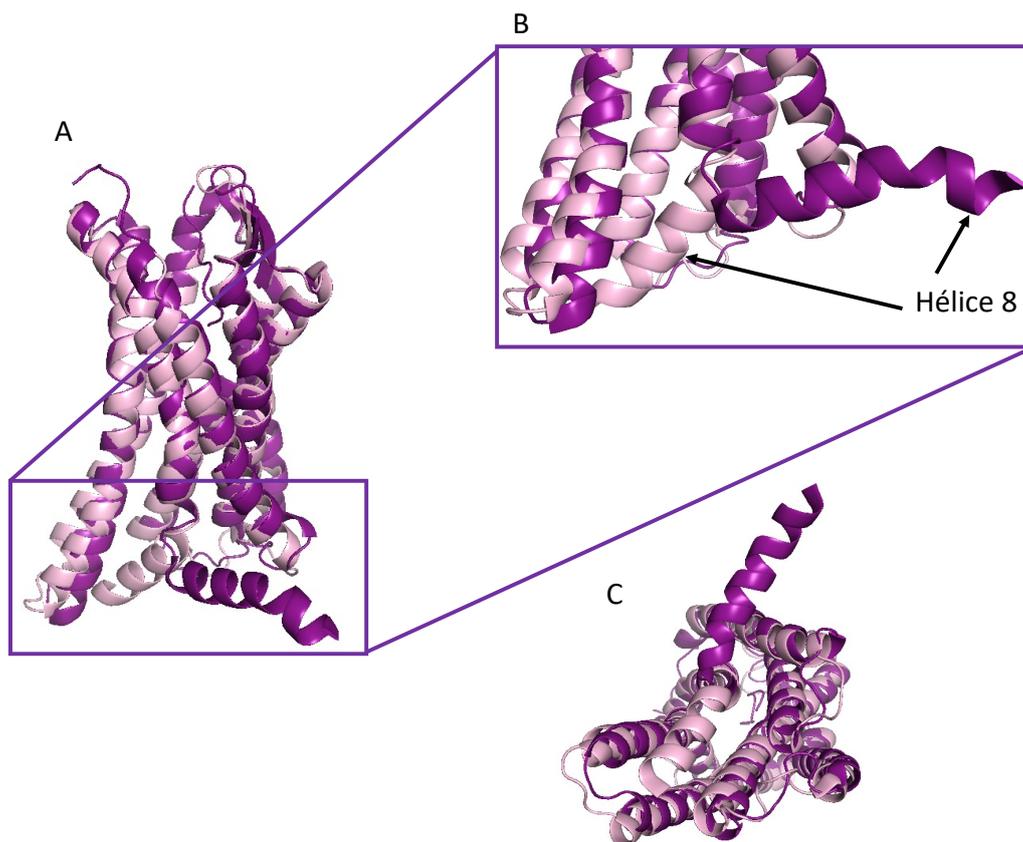


Figure 13: Structure cristallographique du récepteur AT2. (A) Superposition des structures cristallographiques de la forme canonique active de AT2 avec l'AngII en violet (PDB 6jod) (Asada et al., 2020) et de la forme inactive de AT2 avec l'EMA401 en rose pâle (PDB 7jni) (Perryman et al., 2022). (B) Zoom de (A). (C) Vue intracellulaire de la superposition de (A).

En comparant les formes actives des récepteurs AT1 et AT2, la position de l'hélice 8 du récepteur AT2 est légèrement différente de celle du récepteur AT1 : en remplissant un peu plus la poche de liaison il est possible qu'elle stabilise le récepteur AT2 dans une conformation active et provoque une gêne stérique. Cela bloquerait le recrutement de protéines G et de β -arrestines, pouvant expliquer ainsi les disparités dans l'activation de certaines voies de signalisation et donc leurs effets physiologiques opposés.

Toutefois, la séquence de l'ICL3 et la queue C-ter divergent fortement entre les récepteurs AT1 et AT2. Il a été suggéré dans la littérature que ce soit l'une des raisons pour lesquelles le récepteur AT2 ne semble pas capable de s'associer aux protéines G. Cela pourrait aussi expliquer l'absence de phosphorylation par les GRK de la queue C-ter et l'absence de recrutement de β -arrestine suite à la stimulation par l'AngII (Karnik et al., 2015) (**Figure 14**). Connolly et al. suggèrent aussi qu'une interaction entre l'ICL1 et l'hélice 8 empêcherait aussi le couplage aux protéines G et aux β -arrestines (Connolly et al., 2019).

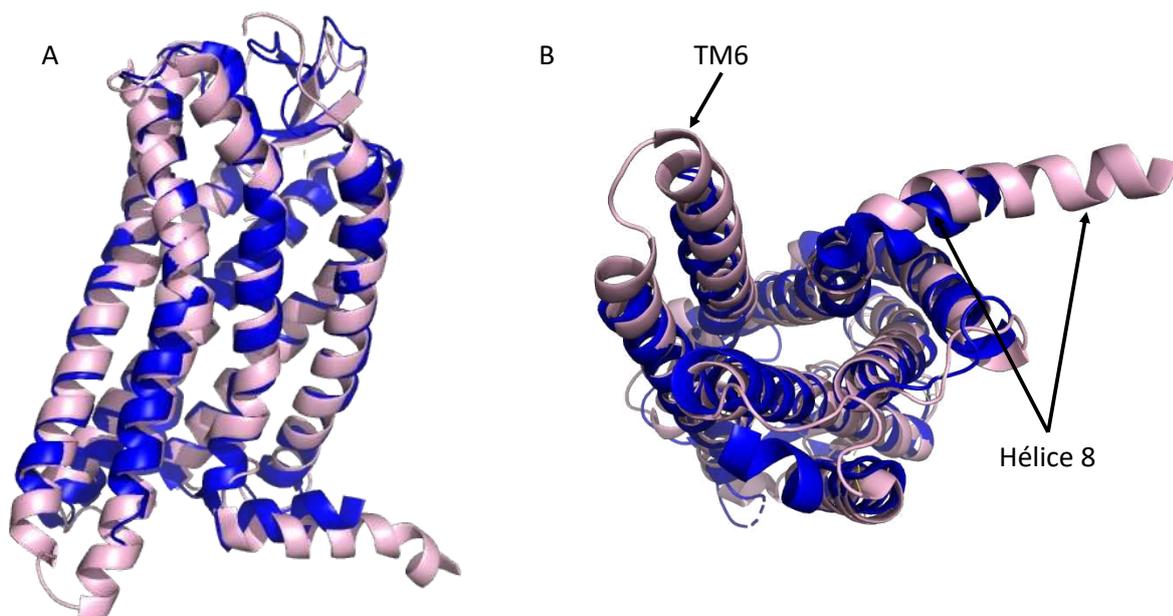


Figure 14: Structures cristallographiques des récepteurs AT1 et AT2. (A) Superposition des structures de la forme canonique active du récepteur AT1 en bleu (PDB 6os0) (Wingler et al., 2020) et du récepteur AT2 en rose pâle (PDB 6jod) (Asada et al., 2020). (B) Vue intracellulaire de (A).

1.1.2 QUELLES SONT LES CONSEQUENCES D'UNE SURACTIVATION DU SRA ?

Une hyperactivité du SRA et donc une stimulation excessive de l'axe ECA/AngII/AT1 entraîne une augmentation de la vasoconstriction, de la sécrétion de vasopressine et d'aldostérone, de l'activation du système nerveux sympathique, de la volémie et *in fine* de la pression artérielle (Wright et al., 2008). Cela provoque aussi une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène délétère dans les cellules endothéliales ainsi que dans les cellules musculaires lisses vasculaires par la NADPH oxydase, mais aussi stress cellulaire, apoptose, thrombose, dysfonction endothéliale, remodelage vasculaire... (Nguyen Dinh Cat et al., 2013). Cette suractivation est à long terme responsable d'effets délétères entraînant HTA, insuffisance cardiaque congestive ainsi qu'une insuffisance rénale chronique (Cotter and Davison, 2014; de Gasparo et al., 2000; Taal and Brenner, 2000). Au niveau cérébrovasculaire, une suractivation de l'AT1 par l'AngII pourrait contribuer à la survenue d'ischémie cérébrale, principalement par ses effets vasoconstricteurs sur les artères cérébrales (Delaitre et al., 2021). Cependant, l'AngII peut aussi se fixer au récepteur AT2, qui, activé, a des effets physiologiques opposés au récepteur AT1. Néanmoins, *in vivo*, le récepteur AT2 ne contrebalance pas entièrement les effets du récepteur AT1 car il est moins présent physiologiquement. C'est ainsi surtout l'axe ECA/AngII/AT1 qui est impliqué dans la régulation de la pression artérielle et qui est la cible des thérapeutiques anti-hypertensives à l'heure actuelle.

1.1.3 AUTRES RECEPTEURS AUX ANGIOTENSINES ET AUTRES PEPTIDES ANGIOTENSINES

Il existe de nombreux autres peptides angiotensines dérivés de l'AngII. Notamment, l'Ang1-7 et l'alamandine sont des peptides qui se lieraient aux récepteurs Mas et MrgD respectivement et ni au récepteur AT1 ni au récepteur AT2. Ils contrebalanceraient les effets cardiodelétères d'une suractivation de l'axe classique AngII/AT1. Néanmoins, la littérature est encore relativement pauvre à ce sujet, surtout concernant la liaison effective de ces peptides à leurs cibles. Une seule équipe a réussi à mettre en évidence *in vitro* la liaison de l'Ang1-7 au récepteur Mas : en effet, les effets observés avec ces peptides ont été montrés sur des modèles murins.

1.1.3.1 AXE ECA2/ANG1-7/MAS: GENERALITES

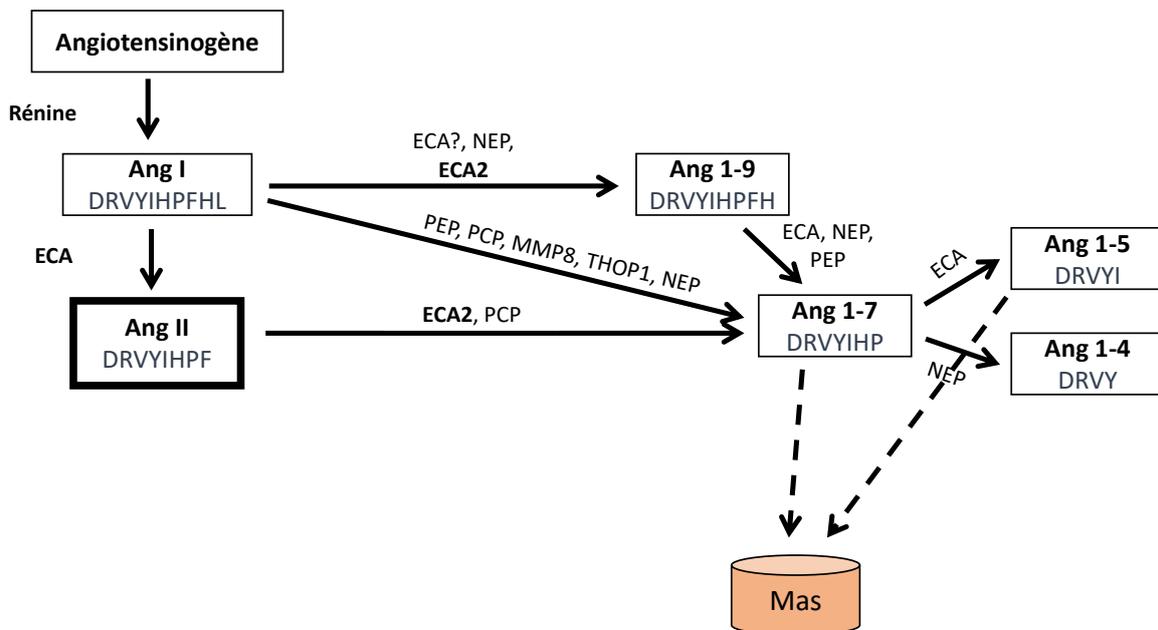


Figure 15: Représentation de l'axe Ang1-7/Mas. ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine ; NEP, neutral endopeptidase ; ECA2, enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 ; PEP, prolyl endopeptidase ; PCP, pyrrolidone carboxyl peptidase ; MMP8, matrix metalloproteinase-8 ; THOP1, thimet oligopeptidase.

Contrairement à l'AngII, un de ses métabolites produit par l'enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 (ECA2), l'Ang 1-7, est connu pour avoir des effets cardioprotecteurs. C'est le RCPG Mas qui serait le récepteur privilégié de l'Ang1-7 (Santos et al., 2003) mais cette liaison n'a été montrée *in vitro* que par cette équipe et est encore très controversée. Il existerait d'autres récepteurs activés par l'Ang1-7 et plusieurs métabolites de l'Ang1-7 qui sont encore peu connus (Iwai and Horiuchi,

2009; Teixeira et al., 2017) (**Figure 15**). De nombreuses recherches se sont ainsi portées sur la voie ECA2/Ang1-7/Mas dont la stimulation permettrait de contrebalancer les effets délétères en cas de suractivation de la voie ECA/AngII/AT1.

Tipnis et al. ont ainsi montré que l'ECA2 permet la conversion de l'AngII en Ang1-7, mais aussi de l'AngI en Ang1-9 elle-même convertie par l'ECA en Ang 1-7. L'ECA2 constitue une enzyme clé pour la formation de l'Ang1-7 (**Figure 16A**). C'est une monocoxy-peptidase aussi appelée homologue de l'ECA qui possède un domaine catalytique et une extrémité C-ter ancrée à la membrane (**Figure 4**) (Donoghue Mary et al., 2000; Tipnis et al., 2000). L'activité peptidase est dépendante de la séquence C-ter de son substrat. En effet, en général, les substrats de l'ECA2 ont des résidus basiques ou hydrophobes en C-ter ou précédés d'un motif Pro-X-Pro (Guy et al., 2003). L'Ang1-7 est un heptapeptide NH_2 - Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro - COOH (**Figure 16B**). Par la suite, l'Ang1-7 est métabolisée en grande partie dans les poumons par l'ECA pour former l'Ang1-5 ainsi que le dipeptide His-Pro, sans pour autant pouvoir cliver le pentapeptide par la suite (Chappell et al., 1998). L'Ang1-7 est aussi métabolisée en alamandine par une décarboxylase (Tetzner et al., 2018) (**Figure 15**).

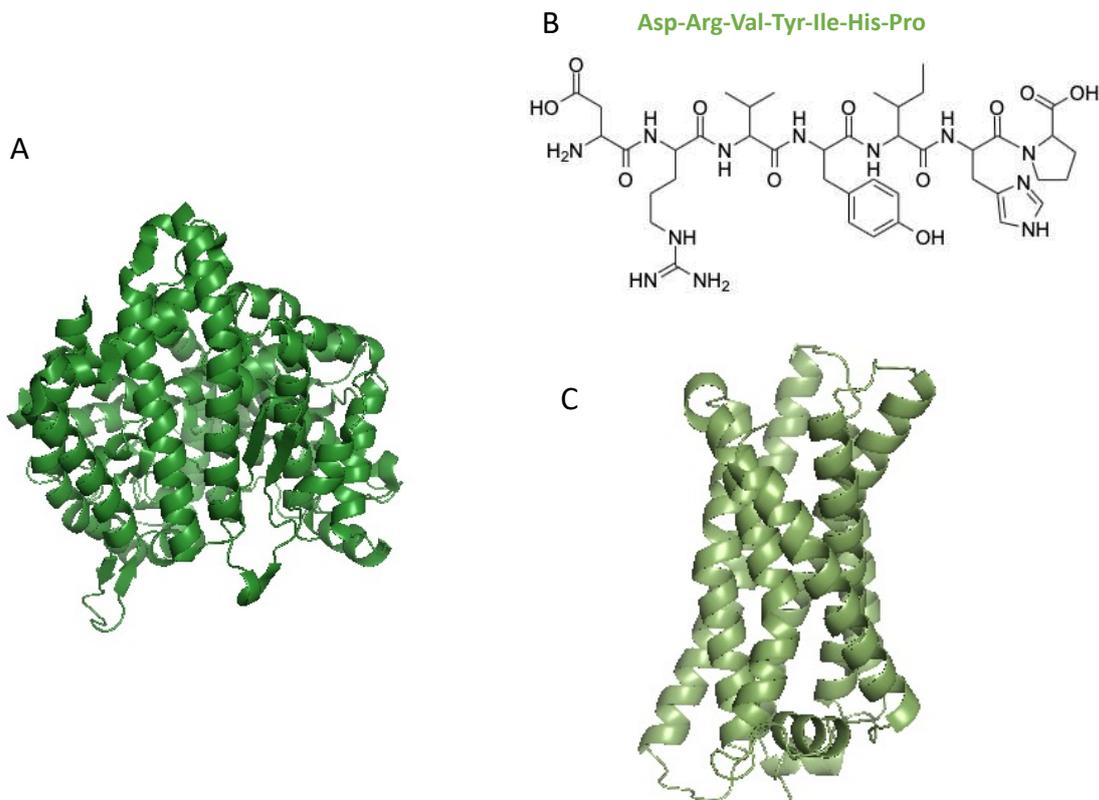


Figure 16: Représentation des effecteurs de l'axe ECA2/Ang1-7/Mas. (A) Structure cristallographique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 (PDB 7u0n) (Geng et al., 2022). (B) Séquence peptidique de l'Ang1-7. (C) Représentation du récepteur Mas, modèle AlphaFold (Uniprot P04201) (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022).

Dong et al. ont décrit une famille d'une cinquantaine de RCPG apparentés au récepteur Mas codés par *mrgs*, c'est la famille des Mrgpr, pour Mas related G protein coupled receptor. Cette famille de récepteurs est retrouvée en partie dans les neurones sensoriels détectant les stimuli de douleur, dans les neurones ganglionnaires spinaux où ils ont été décrits initialement et dans les mastocytes. La plupart des membres de la famille Mrgpr est aussi exprimée dans d'autres tissus (Dong et al., 2001; Solinski et al., 2014). Il existe environ 50 sous-types de Mrgpr répartis en plusieurs classes : MrgprA, B, C, D, E, F, G, H et MrgprX spécifique des primates (Choi and Lahn, 2003), la plupart étant encore orphelins (Santos et al., 2003). Le récepteur Mas (**Figure 16C**) est ainsi devenu éponyme pour la famille entière des Mrgpr.

L'Ang1-7 et le récepteur Mas sont largement exprimés au niveau cardiovasculaire et participeraient aussi à la régulation de ce système. Au niveau périphérique, l'Ang1-7 aurait un effet cardioprotecteur. Elle est vasodilatatrice (Murugan et al., 2016), participe à limiter le vieillissement vasculaire (par effet anti-sénescence des cellules vasculaires, anti-inflammatoires et antioxydants) (Romero et al., 2022; Valencia et al., 2022), réduit l'apoptose et la prolifération cellulaire, contrebalançant les effets de l'AngII (Bihl et al., 2015). L'Ang1-7 peut agir comme un inhibiteur endogène des effets pathologiques de l'AngII et son déficit peut faciliter le développement de l'hypertension primaire (Ferrario et al., 1997). Les taux d'Ang1-7 se retrouvent fortement diminués chez le patient insuffisant cardiaque, notamment au niveau du myocarde, tout comme les taux d'ACE2 (Pavo et al., 2021). Au niveau central, l'Ang1-7 a un effet anti-inflammatoire en diminuant les niveaux de TNF- α et en augmentant ceux d'IL-10 (Kangussu et al., 2021). Globalement, la plupart des effets de l'Ang1-7 ou du récepteur Mas ont été montrés sur le modèle animal. Les souris KO ACE2 ou KO Mas souffrent entre autres d'une majoration de la fibrose cardiaque, mais une surexpression des gènes codant pour Mas ou ACE2 participe à l'amélioration de cet état pathologique (Peiró et al., 2007; Tikellis et al., 2014). Il y a encore des doutes sur la cible pharmacologique de l'Ang1-7 et les voies de signalisation impliquées dans ces processus ne sont pas encore bien décrites. Même si une seule équipe, Santos et *al.*, a mis en évidence *in vitro* la liaison de l'Ang1-7 à Mas. Ils ont montré que la ^{125}I -Ang1-7 se liait à Mas (Santos et al., 2003), l'interaction directe entre Ang1-7 et le récepteur Mas est très controversée et n'a pas été définitivement démontrée. De nombreuses équipes ont tenté de caractériser la liaison de l'Ang1-7 sur Mas, en vain. Par ailleurs, des travaux suggèrent que l'Ang1-7 ne serait pas le ligand préférentiel du récepteur Mas (Gaidarov et al., 2018; Stoyell-Conti et al., 2021; Tirupula et al., 2014).

1.1.3.2 AXE ALAMANDINE/MRGD : GENERALITES

Lautner et *al.* ont supposé qu'il existait un peptide Ala-Ang1-7 (correspondant à l'Ang1-7 avec une alanine à la place de l'acide aspartique en N-ter) par analogie à l'AngA. Un heptapeptide, l'alamandine, a été découvert (**Figure 17**). L'alamandine a pour cible le RCPG MrgD. Il semblerait que cet axe alamandine/MrgD ait aussi un rôle cardiaque bénéfique en cas de suractivation de l'axe classique AngII/AT1 (Lautner Roberto Queiroga et al., 2013).

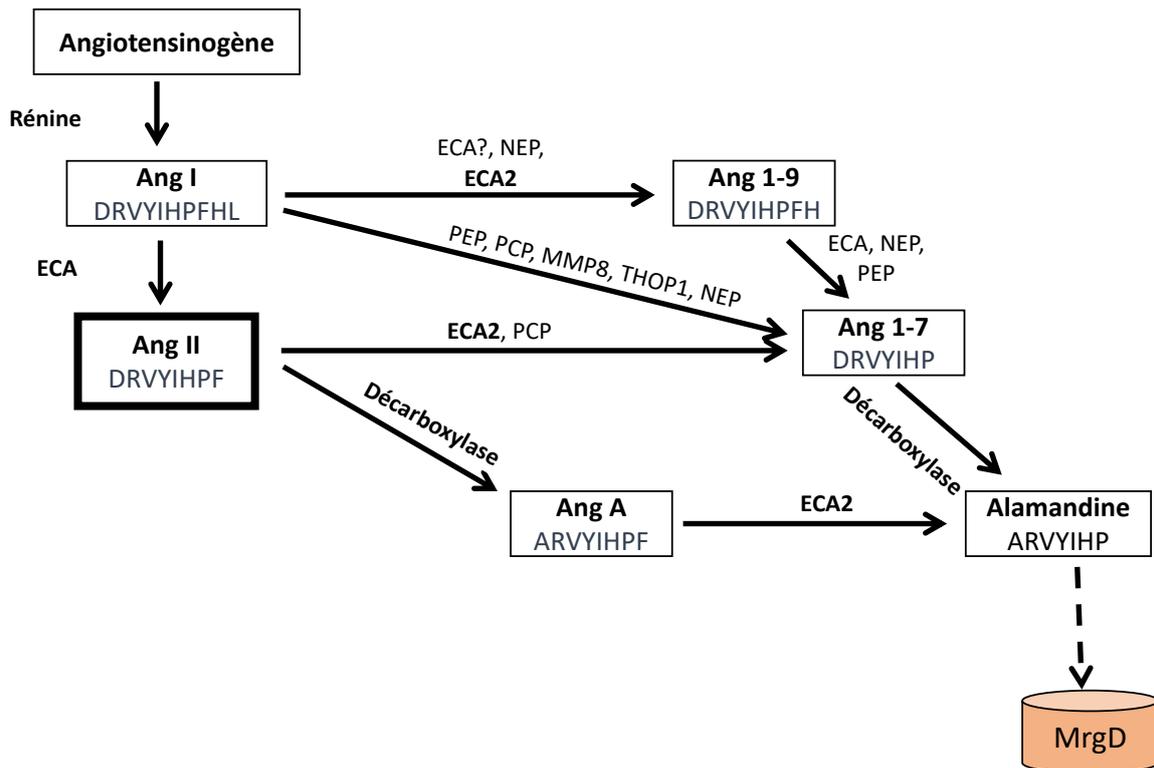


Figure 17: Représentation de l'axe Alamandine/MrgD. ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine ; NEP, neutral endopeptidase ; ECA2, enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 ; PEP, prolyl endopeptidase ; PCP, pyrrolidone carboxyl peptidase ; MMP8, matrix metalloproteinase-8 ; THOP1, thimet oligopeptidase.

L'alamandine, de séquence NH₂ - Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro - COOH (**Figure 18A**), est obtenue par hydrolyse catalytique de l'AngA par l'ECA2 ou directement à partir de l'Ang1-7 par décarboxylation du résidu Asp (Jankowski Vera et al., 2007; Lautner Roberto Queiroga et al., 2013). Elle peut être formée dans le cœur de rat après perfusion d'Ang1-7, indiquant que le tissu cardiaque contient tous les composants nécessaires pour permettre la décarboxylation de l'Asp de l'Ang1-7 en N-ter (Lautner Roberto Queiroga et al., 2013). L'alamandine est retrouvée chez le rat, la souris et l'homme où elle produirait les mêmes effets que l'Ang 1-7 (vasodilatatrice, antifibrotique, antihypertensive).

Néanmoins ces effets ont été observés chez le modèle murin, sans pouvoir mettre en évidence de liaison effective de l'alamandine sur MrgD *in vitro*.

La découverte de l'alamandine suggère que la régulation du SRA fait intervenir d'autres membres que le récepteur Mas de la famille des Mrgpr. L'alamandine interagirait avec le récepteur MrgD (**Figure 18B**) préférentiellement et non avec le récepteur Mas. L'expression de la plupart des membres de la famille Mrgpr est ubiquitaire, le récepteur MrgD est particulièrement retrouvé au niveau artériel mais aussi dans les testicules, la vessie et l'utérus (Lautner Roberto Queiroga et al., 2013). L'activation du récepteur MrgD entraîne rapidement son internalisation (Shinohara et al., 2004). Comme l'Ang 1-7, l'alamandine serait vasodilatatrice par activation de la voie du NO (Qaradakhi et al., 2016) et inhiberait les voies de signalisation PI₃K/Akt et certaines MAPK (Hu et al., 2021). L'alamandine diminuerait la prolifération et la migration des cellules endothéliales entraînant une diminution de l'athérogénèse (Habiyakare et al., 2014), et diminuerait aussi le développement de la fibrose pulmonaire (Fernandes et al., 2021). Aujourd'hui, il y a encore moins de recherches associées à ce dernier que pour le récepteur Mas, notamment car il n'a commencé à être étudié dans le tissu non neuronal il y a seulement quelques années (Park et al., 2018). Au niveau central justement, l'alamandine a des effets proches de ceux observés pour l'Ang1-7 (Schleifenbaum, 2019).

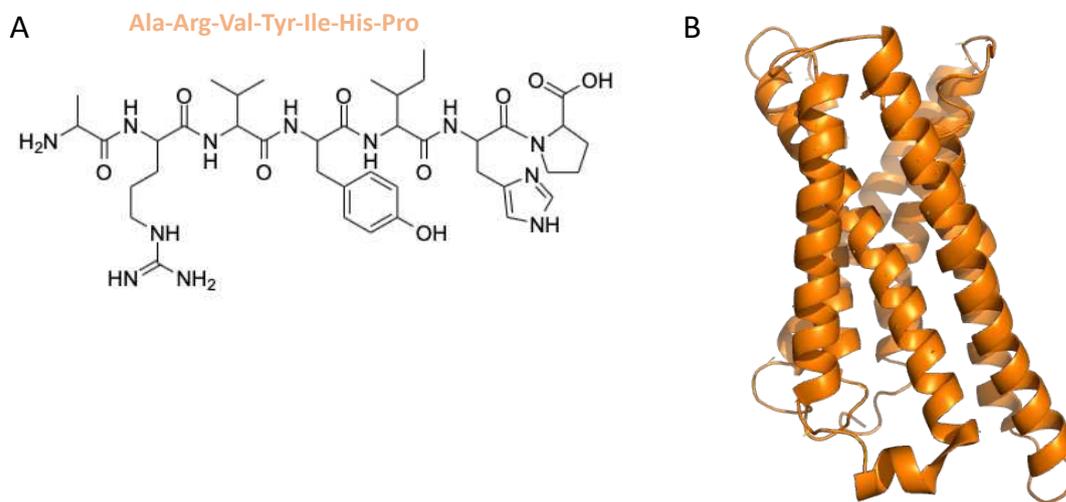


Figure 18: Représentation des effecteurs de l'axe alamandine/MrgD. (A) Séquence peptidique de l'alamandine. (B) Représentation cristallographique du récepteur MrgD (PDB 7y14) (Suzuki et al., 2022).

1.1.3.3 AUTRES ANGIOTENSINES

Le SRA est beaucoup plus complexe que le simple axe ECA/AngII/AT1, puisqu'il existe de nombreux métabolites dérivés de l'AngI et de l'AngII par clivage de la partie C-ter ou N-ter. Ces peptides ont des séquences peptidiques proches mais ont des rôles et effets physiologiques particuliers (**Tableau 2**).

Angiotensines	Séquences	Cibles	Principales actions cardiaques
AngII (Ang1-8)	DRVYIHPF	AT1 AT2	Hypertensive, pro-proliférative, vasoconstrictrice
Ang1-7	DRVYIHP	Mas	Anti-hypertensive, anti-proliférative, anti-fibrotique, vasodilatatrice, anti-athérosclérotique
AngA (Ala1-AngII)	ARVYIHPF	AT1 AT2	Pro-proliférative, vasoconstrictrice
Alamandine (Ala1-Ang1-7)	ARVYIHP	MrgD	Anti-hypertensive, anti-proliférative, anti-fibrotique, vasodilatatrice
AngIII (Ang2-8)	RVYIHPF	AT1 AT2	Pro-proliférative, hypertensive
AngIV (Ang3-8)	VYIHPF	AT4	Hypertensive
Ang1-9	DRVYIHPFH	AT2	Anti-fibrotique, anti-hypertrophique

Tableau 2: Récapitulatif des principaux peptides angiotensines.

L'Ang1-9 est un peptide vasodilatateur diminuant l'hypertrophie des cardiomyocytes, la pression artérielle et le remodelage cardiovasculaire pathologique (Ocaranza et al., 2014). Il est métabolisé en Ang1-7 par l'ECA (Donoghue Mary et al., 2000) ou peut agir directement sur le récepteur AT2 (Flores-Muñoz et al., 2011), ces 2 mécanismes concourant aux effets physiologiques opposés à l'AngII (**Tableau 2**). L'Ang1-9 se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'ECA et participe ainsi à la diminution des taux d'AngII, et à une augmentation des effets de la bradykinine (Flores-Muñoz et al., 2011).

L'angiotensine A (AngA) est un octapeptide de séquence NH₂ – Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe – COOH dérivé de l'AngII au sein duquel le résidu Asp de l'AngII est remplacé par un résidu Ala grâce à l'aspartate décarboxylase (Jankowski Vera et al., 2007). L'AngA cible les récepteurs AT1 et AT2 avec une affinité similaire et a des effets proches de ceux de l'AngII : elle est notamment pro-proliférative et vasoconstrictrice (Habiyakare et al., 2014; Yang Rui et al., 2011)(**Tableau 2**).

L'AngIV aussi appelée Ang3-8 de séquence NH₂ – Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe – COOH (**Tableau 2**) est issue de l'hydrolyse de l'AngIII (Swanson et al., 1992). Les cibles et rôles physiologiques de l'AngIV ne sont

pas encore bien décrits et des contradictions existent encore. L'AngIV ne se fixerait ni au récepteur AT1 ni au récepteur AT2 mais plutôt au récepteur AT4, qui n'est pas un RCPG mais une aminopeptidase régulée par l'insuline insérée à la membrane (Bernier and Guillemette, 1996). Elle aurait un rôle dans la régulation de la réponse vasculaire inflammatoire après liaison à ce récepteur (Stragier et al., 2008). Au niveau central, l'AngIV pourrait se lier au récepteur AT1 pour augmenter la pression artérielle, et aussi au récepteur AT4 pour augmenter l'activité psychotrope et moduler les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Dupont and Brouwers, 2010; Wright et al., 1993).

1.1.4 SRA ET SYSTEME NERVEUX CENTRAL

L'existence d'un SRA au niveau central, initialement proposé par Bickerton et Buckley en 1961, a permis une avancée majeure dans l'étude du SRA dans sa globalité. Depuis la découverte que l'AngII centrale induit une puissante réponse pressive, plusieurs nouveaux rôles du SRA ont été identifiés (Nakagawa et al., 2020). En effet, on retrouve tous les composants du SRA au niveau central. L'AngII en se liant à AT1 dans le cerveau contrôle l'homéostasie cellulaire et les voies autonomes régulant le système cardiovasculaire et le système neuroendocrinien. L'administration centrale d'AngII provoque aussi une augmentation de l'apport en sodium (Avrith and Fitzsimons, 1980; Grobe et al., 2010). Cependant, une suractivation de l'AT1 par l'AngII pourrait contribuer à la sévérité de l'ischémie cérébrale et de ses conséquences, principalement par ses effets vasoconstricteurs sur les artères cérébrales (Näveri et al., 1994). Le récepteur AT2 est aussi impliqué au niveau central dans la fonction cardiovasculaire contrebalançant les effets de AT1 (de Kloet et al., 2017). Il joue un rôle dans la régulation du SRA par le contrôle de l'osmolarité, ainsi que par son implication dans la modulation de certaines fonctions cognitives et comportementales. Il a donc été suggéré que le récepteur AT2 pouvait avoir un rôle important à jouer dans des processus de régénération et de protection du tissu neuronal (Steckelings et al., 2011).

Plus particulièrement, parmi les autres peptides angiotensines, l'angiotensine III (AngIII) aussi appelée Ang2-8, de séquence $\text{NH}_2 - \text{Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe} - \text{COOH}$, est un peptide de 7 acides aminés (**Figure 5C**), obtenu par clivage de l'AngII par l'aminopeptidase A (APA). L'AngII et l'AngIII ont une affinité de liaison pour les récepteurs AT1 et AT2 relativement similaire même si l'AngIII est surtout présente dans le SNC (Bosnyak et al., 2011; Reaux et al., 2001). La plupart des effets biologiques de l'AngIII sont médiés par le récepteur AT1 entraînant notamment inflammation, prolifération cellulaire, relargage de vasopressine et d'aldostérone. Comme pour l'AngII, l'AngIII entraîne aussi une réponse hypertensive (Yugandhar and Clark, 2013). C'est pourquoi le

développement d'inhibiteurs sélectifs de l'aminopeptidase A a vu le jour. Une prodrogue inhibitrice de l'APA cérébrale, le firibastat, est en essai clinique pour le traitement de l'HTA. Les résultats de la phase IIb aux États-Unis montrent une efficacité antihypertensive du firibastat chez les patients à haut risque cardiovasculaire ("Firibastat - First-in-class - hypertension as monotherapy," n.d.).

1.1.5 HTA : DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES, PHYSIOPATHOLOGIQUES, ETIOLOGIQUES

En 2015 en France, l'hypertension artérielle est la pathologie la plus courante, touchant près de 30% de la population, prévalence augmentant avec l'âge. On estime que près de 70% des 65-74 ans sont atteints d'HTA et aujourd'hui en France, seulement 1 patient hypertendu sur 4 arrive à contrôler sa pression artérielle ("Hypertension artérielle (HTA)," 2020). En 2013, l'OMS attribuait à l'HTA 10 millions de décès dans le monde, les 2 tiers touchant les pays à revenu faible ou intermédiaire. L'HTA constitue l'un des principaux facteurs de risque cardio-neuro-vasculaire, représentant encore aujourd'hui un enjeu de santé publique majeur. Si des mesures ne sont pas mises en place, la part de la mortalité imputée aux maladies cardiovasculaires devrait continuer d'augmenter (World Health Organization, 2021) (Figure 19A).

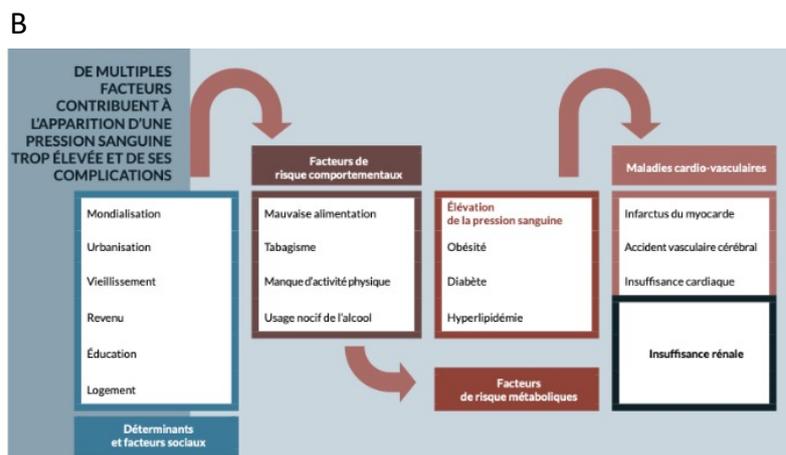
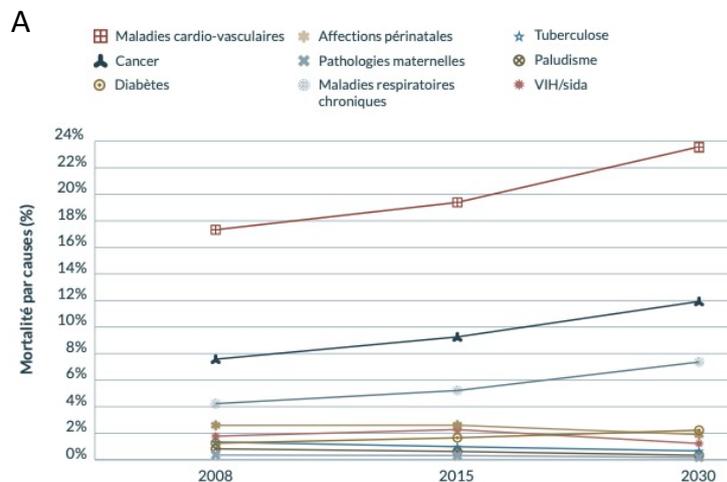


Figure 19: Épidémiologie de l’hypertension artérielle mondiale. (A) Projection de la mortalité mondiale associée aux maladies de plus haute mortalité. (B) Facteurs de risques associés à une augmentation de la pression artérielle et complications associées. Images issues du panorama mondial de l’hypertension, publié par l’OMS en 2013 (*“OMS | Panorama mondial de l’hypertension,” n.d.*).

Un patient est dit hypertendu s’il a une pression artérielle systolique supérieure ou égale à 140 mmHg et/ou une pression artérielle diastolique supérieure ou égale à 90 mmHg. Une pression artérielle trop importante s’exerçant sur les vaisseaux peut entraîner un remodelage du tissu et des modifications structurales de ces vaisseaux. L’hypertension entraîne une insuffisance cardiaque par hypertrophie ventriculaire gauche (Slivnick and Lampert, 2019), entraînant alors un risque accru de complication cardiaque (cardiopathie ischémique, accident vasculaire cérébral (AVC), insuffisance rénale...). L’OMS estime qu’environ 50% des décès par AVC sont imputés à l’HTA (World Health Organization, 2021). L’étiologie n’est pas connue dans 95% des cas, il s’agit d’HTA essentielle. Au contraire, dans 5% des cas restant, la cause est endocrinienne, rénale, vasculaire ou encore toxique, il s’agit alors d’HTA secondaire. L’HTA dépend également de nombreux facteurs environnementaux comme l’alimentation, le stress, le tabac et l’activité physique, ainsi que des prédispositions moins connues (**Figure 19B**). Certains médicaments peuvent aussi être à l’origine d’une hypertension artérielle iatrogène comme les corticoïdes. L’HTA est une maladie asymptomatique dans la plupart des cas, pernicieuse, avec néanmoins parfois l’apparition d’essoufflement, de vertiges ou encore de douleurs thoraciques (World Health Organization, 2021).

1.1.6 PRISE EN CHARGE DE L’HTA

1.1.6.1 THERAPEUTIQUES CLASSIQUES

En France, aujourd’hui, même si la prévalence reste stable depuis 2006 (*“Les résultats de l’étude ESTEBAN 2014-2015,” 2020*), encore 20% des patients hypertendus ne sont pas sous traitement anti-hypertenseur et jusqu’à 50% des patients traités n’atteignent pas les objectifs fixés (*“Hypertension artérielle,” n.d.*) (*“Prise en charge de l’hypertension artérielle de l’adulte,” 2020*). L’HTA est une maladie chronique évolutive, il n’y a donc pas de traitement curatif. La première mesure qui sera mise en place à la suite d’un diagnostic d’une HTA est la prévention et la réduction des facteurs de risques cardiovasculaires. En diminuant les possibles risques cardiovasculaires, la pression artérielle diminuera également chez certains patients de manière naturelle, sans nécessiter la mise en place d’un traitement médicamenteux. Il est ainsi primordial dans un premier temps de s’assurer des

bonnes mesures hygiéno-diététiques du patient, telles que l'arrêt du tabac, l'augmentation de l'activité physique, la réduction de la consommation en sel... ("Prise en charge de l'hypertension artérielle de l'adulte," 2020). Si ces mesures hygiéno-diététiques ne permettent pas de normaliser la pression artérielle, un traitement médicamenteux sera alors instauré. Différentes classes pharmacologiques d'antihypertenseurs sont disponibles comme :

- les médicaments ciblant le SRA, avec les IEC et les ARAII ;
- les médicaments ciblant le système nerveux sympathique, avec notamment les antagonistes des récepteurs β -adrénergiques ;
- les inhibiteurs d'influx calcique ;
- les diurétiques.

Ces médicaments ont une efficacité antihypertensive similaire mais se distinguent par leurs effets indésirables et contre-indications associées ("Les résultats de l'étude ESTEBAN 2014-2015," 2020) ("Prise en charge de l'hypertension artérielle de l'adulte," 2020). Plus particulièrement, les médicaments ciblant le SRA ont été développés pour diminuer soit la synthèse d'AngII (avec les IEC) soit les effets de l'AngII médiés par les récepteurs aux angiotensines (avec les ARAII), et ainsi diminuer les résistances vasculaires périphériques, majorer la natriurèse et la diurèse, ce qui contribue finalement à diminuer la pression artérielle.

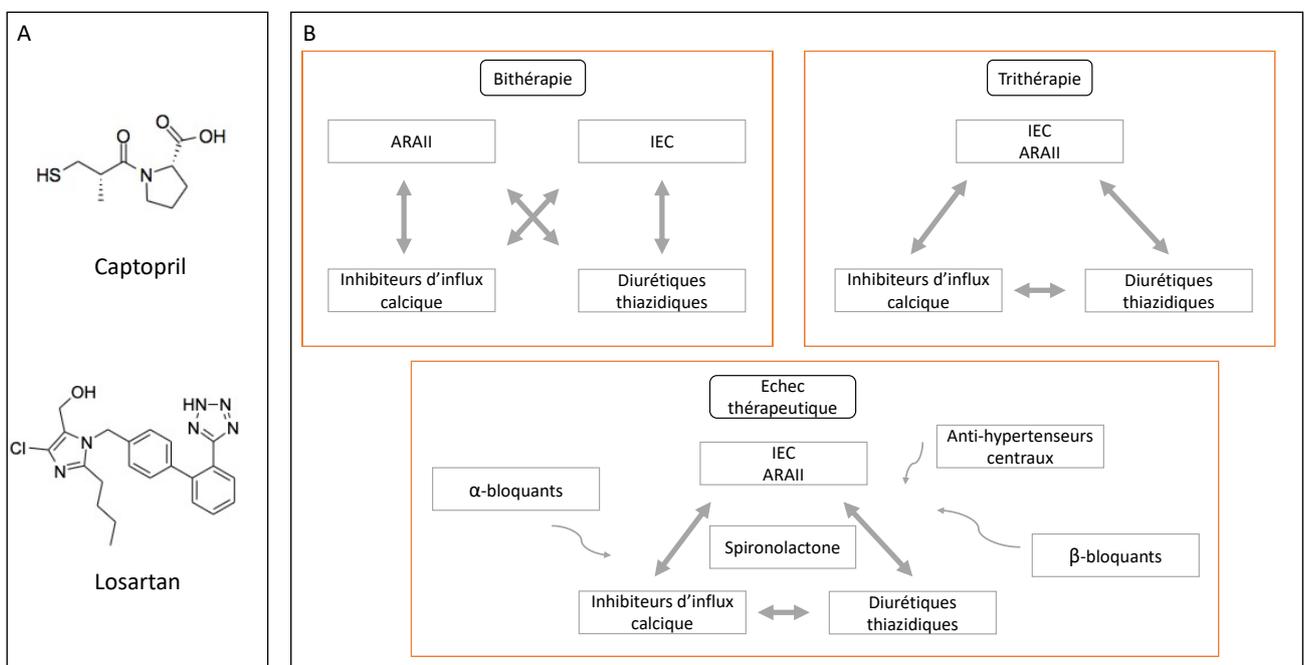


Figure 20 : Chefs de file des médicaments ciblant le SRA et prise en charge associée. (A) Captopril, chef de file des IEC ; Losartan, chef de file des ARAII. (B) Prise en charge de l'HTA en cas d'échec de la monothérapie.

C'est en 1978 que le captopril, premier médicament inhibiteur de l'ECA, est mis sur le marché pour ses effets antihypertenseurs (Brunner et al., 1978) (**Figure 20A**). Ce médicament est dérivé de toxines retrouvées chez une vipère brésilienne : les peptides potentialisateurs de la bradykinine (Hodgson and Isbister, 2009). Il représente le premier médicament développé selon une approche structure-activité reposant sur la connaissance du site catalytique de sa cible, l'ECA. Par la suite, de nombreux analogues du captopril ont été développés et synthétisés ("Prise en charge de l'hypertension artérielle de l'adulte," 2020). Cette classe de médicaments a été particulièrement étudiée et s'avère utile à la fois pour le contrôle de la pression artérielle mais aussi dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Actuellement, 10 inhibiteurs compétitifs réversibles de l'ECA sont sur le marché ("Autorisation - Accueil," 2020). Les IEC empêchent la conversion de l'AngI en AngII limitant l'activation du récepteur AT1 (mais également du récepteur AT2) et augmentent les concentrations en bradykinine, dont la conséquence majeure est l'apparition d'une toux sèche, principal effet secondaire des IEC ("Résumé des Caractéristiques du Produit," n.d.). Ils diminuent ainsi la pression artérielle par diminution des résistances périphériques totales, non pas par action directe sur des récepteurs cardiaques mais par diminution de la production d'AngII (Miguel-Carrasco et al., 2010). Les IEC ont une indication pour l'HTA essentielle en 1^{ère} intention, ainsi que pour l'HTA compliquée. Ils sont utilisés en monothérapie (ce sont des médicaments du groupe 1) ou en bithérapie associés avec un médicament du groupe 2 (comme les diurétiques thiazidiques et inhibiteurs d'influx calcique) ("Prise en charge de l'hypertension artérielle de l'adulte," 2020).

Les ARAlI bloquent l'activation des récepteurs AT1 et ont été développés après les IEC. Le chef de file de cette famille, le losartan, a été commercialisé en 1995 (**Figure 20A**). Des efforts de drug design ont été mis en avant pour la synthèse des ARAlI dans le but de mimer la structure certains groupements de l'AngII (Georgiou et al., 2021). Cette famille regroupe 7 molécules commercialisées en France qui se comportent comme antagonistes compétitifs, réversibles et sélectifs du récepteur AT1 ("Autorisation - Accueil," 2020). Ainsi, les ARAlI préviennent l'effet vasoconstricteur de l'AngII et la sécrétion d'aldostérone associée. L'effet hypotenseur est expliqué par une diminution des résistances vasculaires périphériques. Ils activent aussi la synthèse de rénine comme les IEC mais l'absence de blocage de l'ECA entraîne une augmentation de la concentration de l'AngII qui peut aller activer les récepteurs AT2, responsables d'effets bénéfiques au niveau cardiaque. Ils diminuent par ailleurs la pré-charge et la post-charge (Sukumaran et al., 2011). Les ARAlI appartiennent au groupe 1 des antihypertenseurs et sont utilisés en monothérapie ou en association avec les diurétiques ou

les dihydropyridines, mais plutôt en 2^{ème} ligne en cas d'effets indésirables avec les IEC (**Figure 20B**). L'apparition de ces blockbusters sur le marché a permis de diminuer fortement la mortalité et la morbidité dues aux maladies cardiovasculaires (Habiyakare et al., 2014).

1.1.6.2 THERAPEUTIQUES INNOVANTES INSPIREES DU SRA

Une hyperactivité du SRA est impliquée dans la survenue de nombreuses autres pathologies, même si ce manuscrit insiste sur la régulation de la pression artérielle. C'est le cas de pathologies cardiovasculaires comme l'insuffisance cardiaque, de néphropathies, ou encore de pathologies comme les douleurs chroniques neuropathiques dues à la suractivation de certains de ces métabolites et RCPG au niveau du système nerveux. C'est pourquoi la recherche actuelle se penche sur le développement de nouvelles thérapeutiques variées impliquant ce système rénine-angiotensine.

Nouvelles thérapeutiques ciblant les récepteurs AT1 et AT2

Concernant l'axe classique AngII/AT1, de nombreux travaux ont porté sur le développement de ligands biaisés : on retrouve des ligands de AT1 biaisés agonistes β -arrestine (Soergel et al., 2013; Violin et al., 2010). Le TRV027 a été développé par Trevena et mené jusqu'en phase II pour le traitement de l'insuffisance cardiaque aiguë (Collins, 2022). Il est maintenant en cours d'investigation pour le traitement de lésions pulmonaires aiguës ou d'une coagulation sanguine anormale suite à une infection au SARS-CoV-2 (Collins, 2022).

Des essais d'association de principes actifs complémentaires ont aussi été tentés : on retrouve des ARAll associés à un inhibiteur d'endopeptidase neutre (Mangiafico et al., 2013) : LCZ696, développé par Novartis, combine valsartan et un inhibiteur de NEP, le sacubitril. Ce médicament a reçu l'AMM en France en 2015 pour le traitement chez l'adulte de l'insuffisance cardiaque avec dysfonction systolique ventriculaire gauche symptomatique (EMA, 2018g). Il existe aussi des antagonistes de AT1 associés à un antagoniste du récepteur endothéline A : RE-021 est en phase II pour le traitement de glomérulosclérose focale segmentaire (Travere Therapeutics, Inc., 2022). Cette petite molécule organique permet à la fois d'antagoniser les récepteurs AT1 et endothéline A.

Enfin, le récepteur AT2 est aussi la cible du développement d'agoniste: récemment, le roxadustat a reçu l'AMM dans le traitement de l'anémie symptomatique mais pourrait être exploré comme traitement de l'hypertension grâce à son action sur la diminution de l'expression d'AT1 et sur

l'amélioration concomitante des taux d'expression du récepteur AT2 et de NO synthase endothéliale (eNOS) (EMA, 2021; Yu et al., 2021).

Nouvelles thérapies ciblant l'axe Ang1-7/Mas

Malgré le succès des petites molécules chimiques de la classe des IEC et ARAlI, la recherche de nouvelles molécules ciblant d'autres effecteurs du SRA paraît judicieuse. Les IEC et ARAlI augmenteraient aussi le taux d'Ang1-7 circulant contribuant à leurs effets bénéfiques. Face aux promesses thérapeutiques des axes annexes Ang1-7/Mas et alamandine/MrgD, de nombreuses recherches ont porté sur le développement de nouvelles molécules analogues et sur la pharmacomodulation de l'Ang1-7 ou de l'alamandine pour augmenter la demi-vie de ces peptides. Le premier mimétique de l'Ang1-7 a vu le jour : l'AVE 0991, qui présente les mêmes effets bénéfiques que l'Ang1-7, est une molécule organique non peptidique active par voie orale développée par Hoechst/Aventis en études pré-cliniques (Bader et al., 2012). Une autre étude a notamment mis en évidence le rôle de l'oligosaccharide hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) pour encapsuler l'Ang1-7 et augmenter sa demi-vie. Cette molécule aurait un impact sur l'amélioration de la performance physique d'athlètes cyclistes (de Moura et al., 2021). Le TXA127 (NorLeu3-Ang1-7) est un peptidomimétique développé entre autres contre des dystrophies comme la maladie de Duchenne par Tarix Pharmaceuticals. Il est aussi en phase II pour le traitement de forme sévère d'infection au SARS-CoV-2 (D'Armiento, 2022). Enfin, le NPA7 est un peptide bispécifique fusionnant le BNP avec l'Ang1-7 pour cibler à la fois le pCG-A (particular guanylyl cyclase A receptor, récepteur de ANP et BNP) et le récepteur Mas. Son injection en sous-cutané chez le chien entraîne une baisse de la pression artérielle (Sugihara et al., 2019).

Pour augmenter la quantité d'Ang1-7 il est aussi possible d'augmenter celle de l'ECA2 avec de l'ECA2 recombinante humaine (APN01) ou encore utiliser des activateurs de l'ECA2. Ainsi, 2 molécules ont été découvertes, activatrices de l'ECA2 : la xanthénone et la resorcinolnaphthaléine. L'APN01 est en phase II pour le traitement à l'infection au SARS-CoV-2 (Shah et al., 2022).

1.1.7 PERSPECTIVES : INTERET DE L'ETUDE DE CES RECEPTEURS

Aujourd'hui, l'axe ECA/AngII/AT1 est bien documenté ainsi que la plupart des thérapeutiques anti-hypertensives ciblant le SRA. Cependant, il ne faut plus voir le SRA comme un système linéaire dans lequel la rénine et l'ECA sont les 2 seules enzymes impactant la production d'AngII, ni penser que le produit terminal AngII est le composé biologiquement actif final. L'action des médicaments anti-hypertenseurs serait aussi due à l'action des métabolites de l'AngII (Karnik et al., 2017). Par exemple, chez 50% des patients traités par des IEC, des taux plus élevés d'AngII sont observés, probablement dus à une augmentation des taux d'AngI et de l'activité d'une chymase présente dans les mastocytes (M. Li et al., 2004). Ainsi, cette production d'AngII indépendante de la voie de l'ECA met en évidence un besoin de mieux connaître les contributions de tous les composés du SRA dans la survenue de pathologies diverses. De nombreux autres métabolites des angiotensines existent et ont un rôle dans la régulation du SRA et de la pression artérielle : les peptides alamandine et Ang1-7 permettraient de diminuer la pression artérielle *via* les récepteurs MrgD et Mas alors que l'AngA par exemple augmenterait la pression artérielle *via* le récepteur AT1. Cependant, il existe des zones d'ombre quant à leurs mécanismes d'action.

Les actions physiologiques de l'Ang1-7 et de l'alamandine ne dépendent *a priori* pas des récepteurs AT1 et AT2 mais de nouveaux RCPG, Mas et MrgD. En effet, l'AngII s'enfonce dans le site orthostérique de AT1 (**Figure 21A**) mais la superposition des structures AlphaFold des récepteurs Mas (**Figure 21B**) et MrgD (**Figure 21C**) montre que l'AngII ne peut pas se fixer (tout du moins de la même façon) à ces récepteurs. Les sites de liaison de ces récepteurs sont plus étroits et moins profonds que pour AT1.

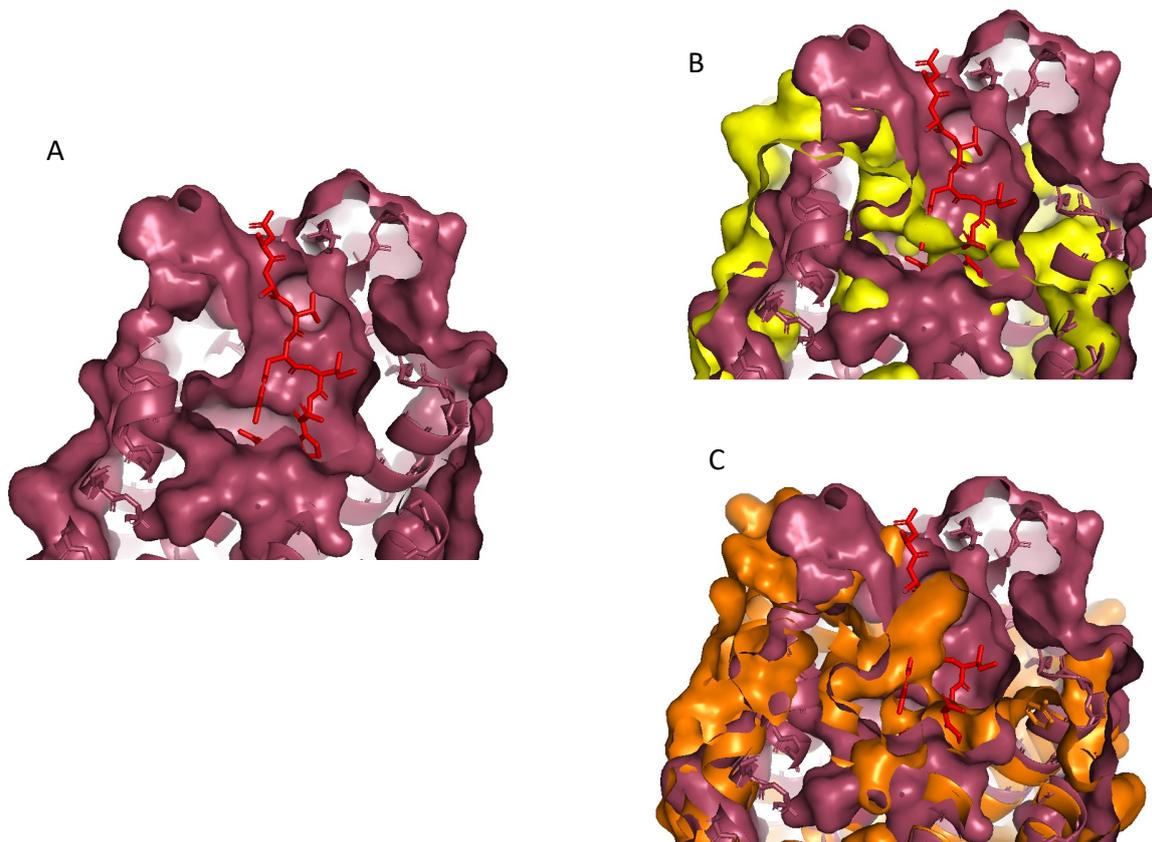


Figure 21: Poches de liaison des récepteurs AT1, Mas et MrgD. (A) Représentation cristallographique de AT1 (en bordeaux) avec l'AngII (en rouge) (PDB 6oso) (Wingler et al., 2020). (B) Superposition avec le récepteur Mas en jaune, modèle alpha fold (Uniprot P04201). (C) Superposition avec le récepteur MrgD en orange, modèle alpha fold (Uniprot Q8TDS7) (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022).

Il est fort probable que l'alamandine et l'Ang1-7 aient des effets très similaires et notamment cardioprotecteurs, ces 2 peptides contrebalançant ainsi les effets délétères de l'axe ECA/AngII/AT1. Y aurait-il alors intérêt d'une action combinée de ces 2 peptides ? Par ailleurs, est-ce que les bénéfices apportés par l'Ang1-7 seraient dus à son activité intrinsèque ou à sa conversion en alamandine ?

Face à cette multiplicité d'angiotensines et de récepteurs, il faut ajouter une multiplicité fonctionnelle des récepteurs, due à une multiplicité des voies de signalisation activables parfois sélectivement.

Comment mieux approfondir l'étude fonctionnelle des récepteurs aux angiotensines : AT1, mais surtout AT2, Mas et MrgD ? Quelles sont les voies de signalisation impliquées ? Quel est le rôle physiologique des axes annexes à l'axe ECA/AngII/AT1 ? L'étude détaillée de ces peptides, RCPG et voies de signalisation permettrait ainsi de mieux comprendre la pharmacologie fondamentale du SRA

et donc d'expliquer davantage les effets bénéfiques et indésirables des thérapeutiques ainsi que d'orienter le développement de nouveaux médicaments anti-hypertenseurs. En effet, aujourd'hui encore, les voies de signalisation impliquant les récepteurs aux angiotensines ne sont pas encore totalement décrites, notamment en raison du manque d'outils pharmacologiques permettant leur étude. L'idée de notre travail est donc de trouver de nouveaux outils permettant l'étude fonctionnelle de ces récepteurs et d'exploiter les toxines animales comme source originale de telles molécules.

1.2 LES TOXINES COMME OUTILS PHARMACOLOGIQUES

1.2.1 GENERALITES

La médecine traditionnelle s'est toujours inspirée de la nature comme source de thérapeutique et encore aujourd'hui de nombreux principes actifs sont issus ou inspirés des règnes animal et végétal (Newman and Cragg, 2016). Elle s'est inspirée, par exemple, des toxines : ce sont des substances d'origine biologique qui peuvent être produites par des procaryotes ou des eucaryotes. Ici, nous nous focaliserons sur l'étude des toxines produites par des animaux venimeux. Les animaux marins et terrestres (cônes, scorpions, araignées, serpents, cnidaires,...) sont considérés comme des prédateurs spécialisés qui produisent des venins contenant des myriades de toxines avec une incroyable diversité structurelle et fonctionnelle à leurs propres fins biologiques. Cette source de venins peut être considérée comme une réserve inexploitée de composés biologiquement actifs et comme une source possible de nouvelles thérapeutiques.

Les venins d'animaux constituent une vaste bibliothèque de toxines peptidiques biochimiquement stables aux propriétés pharmacologiques particulières, qui ont évolué pour doter leur hôte de capacité de capture ou de défense.

Les venins sont des mélanges complexes qui peuvent contenir plus de 1000 produits différents, comme des petites molécules organiques, des peptides, des protéines, composition en lien avec la fonction propre du venin. Nous définissons les toxines comme des composés peptidiques sans présumer de leur activité toxique. On estime que les 200 000 espèces d'animaux venimeux existant sur terre pourraient produire environ 40 millions de toxines, qui sont encore largement inexploitées (Gilles and Servent, 2014). Les toxines contiennent souvent des cystéines, créant ainsi des ponts disulfure leur conférant des motifs de réticulation particuliers et diverses structures tridimensionnelles. Cette structuration tridimensionnelle est nécessaire à la bonne fonctionnalité des toxines, permettant d'augmenter leur stabilité dans le sang en résistant aux protéases. Les animaux venimeux subissent un mécanisme évolutif et les toxines peuvent acquérir une affinité et une sélectivité élevées pour leurs cibles. Puisque les venins sont caractérisés par leur toxicité, l'étude des toxines s'est faite par la recherche des composés responsables de cette toxicité. Cela peut expliquer leur impact majeur sur le système nerveux central ou périphérique et le système cardiovasculaire des proies. Notamment, les principales atteintes cardiovasculaires sont les troubles de l'hémostase, de la pression artérielle ou encore de l'intégrité des parois vasculaires et des cellules cardiaques. Aussi, au niveau du système nerveux, la transmission neuromusculaire est perturbée par l'atteinte des

différents types de canaux ioniques impliqués, aussi bien au niveau pré- que postsynaptique (Casewell et al., 2013).

Néanmoins, les effets biologiques et les cibles moléculaires de nombreuses toxines présentes dans les venins sont encore inconnus, ce qui explique pourquoi la recherche sur les venins pour identifier de nouveaux couples ligand-récepteur a pris de l'ampleur.

Toxine ou poison ?

Les animaux venimeux sont généralement associés au danger et à la peur, chez l'homme et aussi chez les animaux aux sens développés. Cette crainte peut être justifiée étant donné que certaines espèces venimeuses peuvent produire des toxines très nocives pour leur proie. Sont estimés à près de 3 millions le nombre de personnes mordues par un serpent chaque année dans le monde, causant de nombreuses invalidités et près 2% de ces morsures s'avèrent mortelles. Ces décès restent spectaculaires, souvent causés par paralysie, hémorragie ou défaillance cardiaque (Oliveira et al., 2022). La mortalité liée à l'envenimation par certains venins peut être limitée par traitement antivenimeux précoce après l'envenimation de l'hôte. Actuellement, sur les 7 000 toxines découvertes et caractérisées, une grande majorité est associée à l'effet toxique des venins *via* leur interaction avec les canaux ioniques (Van Baelen et al., 2022). La composante toxique des venins est aussi associée à la présence d'enzyme comme les PLA2 (phospholipase A2), les SVMP (snake venom metalloproteinases), les SVSP (snake venom serine proteases), les LAAO (L-amino acid oxydase) qui exercent leur effet toxique en entraînant thrombose, hémorragie, nécrose... La proportion de ces composés varie fortement en fonction de l'espèce les produisant. Par exemple, les PLA2 sont fortement retrouvées dans les venins des *Elapidae* et des *Viperidae* même s'il existe de nombreuses variabilités intra-espèces (Oliveira et al., 2022).

Historiquement cependant, les serpents et leurs toxines ont toujours eu une grande importance. Ce n'est pas pour rien que le bâton d'Asclépios, le dieu grec de la médecine, ainsi que la coupe d'Hygie, la déesse de la santé, sont entourés d'un serpent, symbole de vie et de vigueur et de connaissance des vertus des plantes médicinales, donnant lieu aux caducées des médecins et des pharmaciens.

Processus évolutif

Les toxines peptidiques des venins ont subi un long processus évolutif permettant la défense de l'hôte ou la capture de proies et les rendant hautement sélectives et puissantes pour leur cible. Il en a résulté l'émergence d'un large panel de toxines issues d'une grande diversité d'espèces, aux

structures variées et aux multiples fonctions biologiques associées. Ainsi, les toxines animales constituent un réservoir inépuisable de thérapeutiques en raison de leurs propriétés pharmacologiques intéressantes. L'évolution des toxines est mieux comprise chez les serpents. De nombreuses protéines issues de leur proie ont été recrutées dans leur venin, dupliquées chez le serpent pour produire des familles de toxines multiples qui vont à nouveau cibler spécifiquement le récepteur endogène d'intérêt de leur proie. Souvent ces toxines sont soumises à une vaste diversification fonctionnelle (Fry et al., 2009). Ces peptides endogènes devenus 'toxines' ont alors subi un processus de 'militarisation' associé à des adaptations structurelles clés. De plus, certaines toxines peuvent également exercer un effet délétère en raison de leur inoculation seulement à très forte concentration chez les proies. C'est le cas par exemple des sarafotoxines des serpents *Atractaspis*, qui induisent une vasoconstriction mortelle chez leur proie en interagissant avec les récepteurs de l'endothéline (Ducancel, 2002). La composition du venin est aussi adaptative et peut dépendre des changements du régime alimentaire. Par exemple, les araignées mâles *Atrax robustus* produisent en étant jeunes un venin contre les insectes mais qui une fois adultes, arrêtent de se nourrir pour se consacrer à la recherche d'une femelle et développent un venin défensif contre les vertébrés (Jelinek, 2001).

Enfin, il était communément supposé qu'un prédateur venimeux injecte le même cocktail de toxines à une proie et à un assaillant. Cependant, il semblerait que la composition du venin soit en réalité différente suivant le stimulus extérieur ou même au sein du canal venimeux. Par exemple, en cas de défense, *Conus geographus* administre des toxines paralysantes bloquant les récepteurs neuromusculaires, expliquant l'effet mortel chez l'homme. Au contraire, pour capturer une proie, le venin ne contient pas ces toxines et sa composition est spécifique de la proie (Dutertre et al., 2014b, 2014a).

Place de l'étude des toxines

Ces toxines se sont néanmoins révélées être des ligands hautement sélectifs et puissants pour une large gamme de canaux ioniques et de récepteurs. Par conséquent, ils représentent des composés intéressants pour le développement thérapeutique. Quelques toxines issues de venins sont utilement exploitées comme insecticides par exemple ou agents thérapeutiques (1.2.2.2). Actuellement, la majorité de la recherche sur les toxines porte sur leur action sur les canaux ioniques ou encore sur le développement d'anti-venins (Z. Cao et al., 2022). Néanmoins, compte tenu de leur grande diversité et de la multiplicité des cibles inexplorées, il est probable que de nombreuses combinaisons

toxine/cible à haute importance thérapeutique restent à découvrir. A l'heure actuelle, un nombre limité de toxines sont connues pour agir sur les récepteurs couplés aux protéines G.

1.2.2 QUELS SONT LES INTERETS DE L'UTILISATION DE TOXINES ?

1.2.2.1 LES TOXINES OFFRENT UNE DIVERSITE STRUCTURALE

Toxines linéaires et à 1 pont

Les toxines possèdent en général de nombreuses cystéines, leur conférant des structures réticulées particulières. En revanche, il en existe quelques-unes de forme linéaire ou avec un seul pont disulfure. Notamment, cette structuration est surtout retrouvée chez les toxines issues de cônes, les conotoxines. Les conotoxines qui ne contiennent aucun ou 1 pont disulfure et qui ciblent les RCPG sont regroupées en : contulakines (interagissant avec les récepteurs de la neurotensine) (Craig et al., 1999), conorfamides (interagissant avec le récepteur RFamide) (Aguilar et al., 2008) et conopressines (interagissant avec les récepteurs de la vasopressine) (Dutertre et al., 2008). On retrouve aussi la famille des conantokines (qui interagissent avec le récepteur glutamate ionotrope du N-méthyl-D-aspartate) (Donevan and McCabe, 2000), ou encore la famille des contryphans (qui interagissent avec les canaux calciques ou potassiques voltages dépendants) (Lebbe and Tytgat, 2016; Sabareesh et al., 2006).

Toxines à 2 ponts

Les toxines à deux ponts disulfure sont beaucoup moins présentes dans les venins que les toxines à 3 ou 4 ponts disulfure et la plupart d'entre elles se trouvent dans les venins de cônes (Reynaud et al., 2020). Il existe une grande diversité de toxines à 2 ponts disulfure dans les venins de cônes offrant cinq motifs de cystéines différents (I, V, X, XIV et XXIV) (Kaas et al., 2012). Le motif CC-C-C est le plus courant, comprenant les α -conotoxines actives sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, les ρ -conotoxines actives sur les récepteurs adrénergiques et les χ -conotoxines actives sur le transporteur de noradrénaline. Le motif CC-CC contient de nombreux membres appartenant à la superfamille T, y compris les τ -conotoxines interagissant avec les récepteurs de la somatostatine (Petrel et al., 2013). Le motif C-CC-C a également été récemment découvert dans le venin de *Conus vexillum*, délimitant une nouvelle superfamille α B-conotoxine (Luo et al., 2013). Enfin, le motif C-C-CC (superfamille L) et le motif C-C-C-C (superfamille Q) sont des motifs de conotoxines pour lesquels aucune activité biologique claire n'a encore été décrite. La sarafotoxine, issue du venin de vipère (détaillé 1.2.2.3.1) est aussi un exemple d toxine à 2 ponts. Trois possibilités d'appariement des cystéines appelées 'globular' (ponts I-III ; II-IV), 'ribbon' (ponts I-IV ; II-III) et 'beads' (ponts I-II ; III-IV)

sont décrits pour les toxines avec 4 cystéines (**Figure 22**). L'organisation 'globular' est la plus courante comprenant par exemple les α -, ρ - et τ -conotoxines. Beaucoup moins de conotoxines sont organisées avec la structure en 'ribbon' comme les χ -conotoxines et aucune conotoxine avec une organisation en 'beads' n'a encore été décrite.

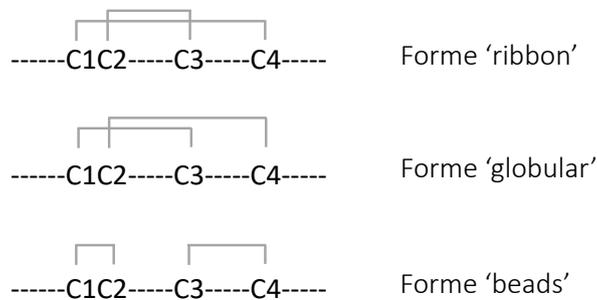


Figure 22: Représentation schématique des toxines à 2 ponts disulfure.

Toxines à 3 ponts

Les toxines à 3 ponts disulfure sont largement retrouvées chez presque tous les animaux venimeux et ciblent surtout des canaux ioniques. Elles peuvent former 15 combinaisons possibles et 9 motifs de cystéines ont déjà été décrits uniquement dans les venins de cônes tels que le motif CC-C-C-CC des μ -conotoxines, agissant sur les canaux Na_v , ou le motif CC-C-C-C-C des α A-conotoxines, interagissant avec les nAChR (Kaas et al., 2012). Le motif 'inhibitory cysteine knot' (ICK) est un motif très répandu et caractérisé par le motif -C-C-CC-C-C- (ponts I-IV ; II-V ; III-VI) (**Figure 23**). Les toxines ICK sont généralement composées de 23-35 acides aminés et se trouvent chez de nombreux animaux venimeux, tels que les araignées, les scorpions, les cônes et les anémones de mer, et sont principalement associées à l'inhibition des canaux ioniques voltage-dépendants (Na_v , Ca_v , K_v , KCa), des récepteurs-canaux 'transient receptor potential' (TRP) et 'acid-sensing ion channel' (ASIC). Les toxines $\text{CS}\alpha\text{B}$ sont caractérisées par le motif -C-C-C-C-C-C- (ponts I-IV ; II-V ; III-VI) (**Figure 23**). Cette classe de toxines se trouve en grande partie chez les scorpions et agit surtout sur les canaux potassiques voltage-dépendants. Un autre motif très fréquent dans les toxines à 3 ponts disulfure est le motif Kunitz. Il s'agit d'un motif -C-C-C-C-C-C- (ponts I-VI ; II-IV ; - III-V), retrouvé dans des peptides de 55 à 65 acides aminés (**Figure 23**). Cette classe de toxines est connue pour son activité anti-protéase et pour son rôle bloqueur des canaux potassiques (Peigneur et al., 2011). Néanmoins, des toxines Kunitz interagissant avec les canaux ASIC, TRPV1 ou Ca_v ont déjà été décrites. De plus, Ciolek et al. sont parvenus à isoler une toxine Kunitz ciblant un RCPG, la mambaquarétine-1, antagoniste des récepteurs de type 2 à la vasopressine V_2 (cf 1.2.2.3.2) (Ciolek et al., 2017).

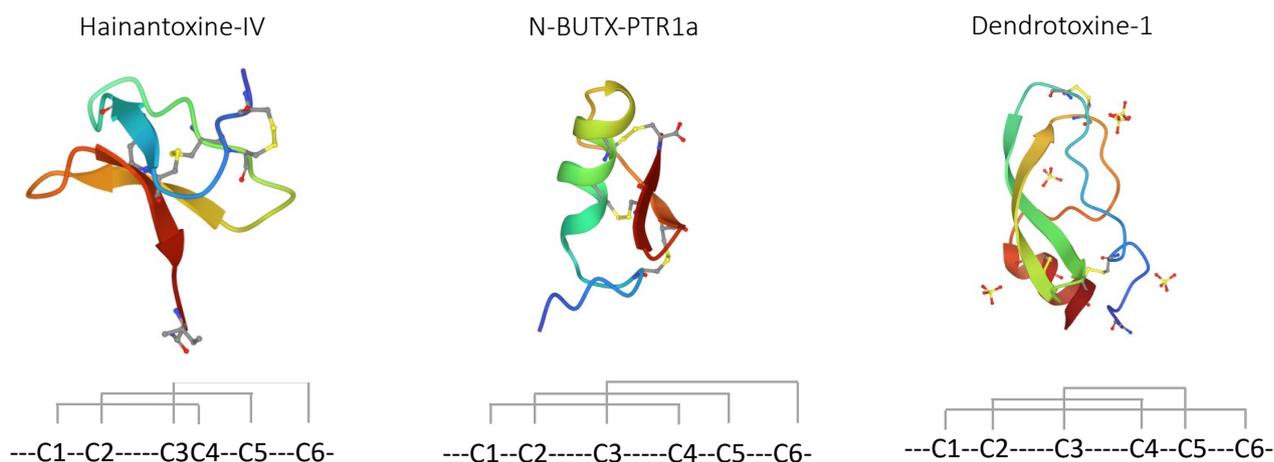


Figure 23: Représentation schématique des toxines à 3 ponts disulfure. Structuration de la forme 'ICK' avec la Hainantoxine-IV (1niy) (D. Li et al., 2004), structuration de la forme 'CS α B', avec la N-BUTX-PTR1a (6sab) (Reynaud et al., 2020) et structuration de la forme 'Kunitz', avec la Dendrotoxine-1 (1dtx) (Skarzyński, 1992).

Toxines à 4 ponts

Les toxines à 4 ponts disulfure sont largement présentes dans les venins d'animaux et présentent une diversité structurale importante. Chez les scorpions, elles appartiennent à la famille des $\alpha\beta$ composées d'un feuillet de 3 brins β antiparallèles et d'une hélice α , comme dans les toxines α interagissant avec les canaux sodiques (**Figure 24A**) (Bosmans and Tytgat, 2007) ou dans la chlorotoxine, qui cible les canaux chlorure des insectes (Cohen et al., 2018; Lippens et al., 1995). Chez les araignées, les toxines à 4 ponts ciblent différents canaux ioniques, comme la ω -agatoxine IVA qui est un puissant bloqueur des canaux calciques voltage-dépendants dans le système nerveux central des insectes et des vertébrés (Bourinet and Zamponi, 2017; Mintz et al., 1992). Les toxines issues de cônes sont regroupées en 7 familles de motifs de cystéines différents (XI, XII, XIII, XV, XVII, XXII et XXVI), et leurs cibles moléculaires sont en grande partie inconnues (Kaas et al., 2012). Enfin, chez les serpents, deux familles structurales différentes ont été identifiées, les toxines avec le motif $3_{10}\beta$ de l'omwaprin (**Figure 24B**) (Nair et al., 2007) et les toxines à 3 doigts qui représentent souvent les structures les plus fréquentes trouvées dans les venins de serpents *Elapidae*. Ce dernier motif est caractérisé par la présence de 3 doigts, chacun formé par 2 brins β antiparallèles reliés entre eux par une boucle formant l'extrémité du doigt. Ces 3 boucles sont réticulées par 4 ponts disulfure hautement conservés (ponts I-III ; II-IV ; V-VI ; VII-VIII). Les toxines 3 doigts peuvent interagir avec une grande diversité de cibles moléculaires étant donné leur grande diversité structurale (**Figure 24C**) et

ont été utilisées comme outils pharmacologiques et structuraux spécifiques (Kessler et al., 2017). Les toxines 3 doigts peuvent bloquer une grande diversité de fonctions des canaux ioniques, comme la calciseptine, qui bloque le canal calcique de type L (de Weille et al., 1991), la δ -calliotoxine, qui cible sélectivement le canal sodique $Na_v1.4$ (Yang et al., 2016) ou encore la mambalgine qui se caractérise par sa capacité à bloquer les canaux ASIC (Diochot et al., 2012). Ces toxines sont aussi capables de cibler les RCPG en particulier avec les récepteurs muscariniques et adrénergiques (Maïga et al., 2012; Näreoja and Näsman, 2012; Servent et al., 2011; Servent and Fruchart-Gaillard, 2009).

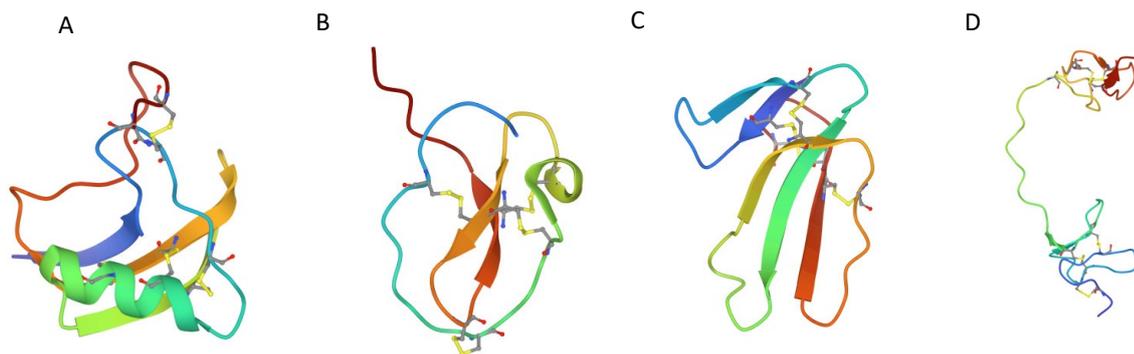


Figure 24: Représentation schématique des toxines à 4 ponts disulfure et plus. (A) Représentation d'une toxine α de scorpion, la LQH III (PDB 1fh3) (Leipold et al., 2004). (B) Représentation d'un motif $3_{10}\beta$ avec l'omwaprin (PDB 3ngg) (Nair et al., 2007). (C) Représentation d'un motif de toxine 3 doigts, la cardiotoxine (PDB 1ug4) (Chen et al., 2005). (D) Représentation de la toxine dimérique DkTx (PDB 6cuc) (Bohlen et al., 2010).

Toxines à 5 ponts et plus

Historiquement, les premières cibles identifiées des toxines ont été les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs) avec notamment l' α -bungarotoxine issue du venin *Bungarus multicinctus* qui est une toxine 3 doigts longue contenant 5 ponts disulfure (Changeux et al., 1970).

Néanmoins, peu de toxines très riches en cystéines, contenant plus de 5 ponts disulfure, ont été décrites. Les conotoxines de la superfamille D (D-conotoxines) peuvent agir spécifiquement sur les nAChR. On y retrouve des peptides à 10 résidus cystéine avec des motifs très variables ; notamment, la Lt28.1 est une conotoxine de 5 ponts disulfure ciblant les nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Lu et al., 2017). La conotoxine GVIIIA est un peptide de 41 acides aminés, composée de 5 ponts disulfure et cible les récepteurs 5-HT3 (England et al., 1998). La toxine B issue du cobra *Naja naja* est une toxine de 71 acides aminés, structurée avec 5 ponts disulfure (Ota and Hayashi, 1973). La toxine DkTx (double-knot toxin) est retrouvée dans le venin de la tarentule *Ornithoctonus huwana*. C'est une toxine

contenant 12 cystéines formée par 2 motifs ICK reliés entre eux ciblant les récepteurs TRPV1 (**Figure 24D**) (Bohlen et al., 2010).

1.2.2.2 DES TOXINES COMME THERAPEUTIQUES

Le développement de nouveaux médicaments à partir de venin d'animal est une source prolifique mais encore peu exploitée. Néanmoins, ce développement a permis l'accès au marché de quelques toxines dont sont mentionnés ci-après les exemples les plus connus (**Figure 25**).

- C'est en 1978 que le captopril, premier médicament inhibiteur de l'ECA, est mis sur le marché pour ses effets antihypertenseurs et comme première intention dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Il n'existe qu'une seule famille de toxines connues pour cibler le SRA: ce sont les peptides potentialisateurs de la bradykinine issus du venin de *Bothrops jararaca*. C'est l'étude de ces peptides qui a conduit au développement d'un dérivé, le captopril (Tipnis et al., 2000). Il permet donc de diminuer les taux d'AngII pour diminuer la pression artérielle. Aujourd'hui, c'est le chef de file des IEC et de nombreux dérivés sont sur le marché (cf 1.1.6).
- Le ziconotide, est un analogue synthétique d'une conotoxine issue du venin de *Conus magus*, composé de 3 ponts disulfure. C'est une des toxines médicaments les plus connues approuvées par la FDA. C'est un bloqueur du canal calcique $Ca_v2.2$, utilisé comme antalgique chez les patients résistants à la morphine (Williams et al., 2008).
- L'exendine-4 est une toxine linéaire isolée de la salive du monstre de Gila, analogue du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (Eng et al., 1990). L'exenatide est la version synthétique de l'exendine-4. C'est un agoniste du récepteur GLP-1 commercialisé pour le traitement du diabète de type 2 (Furman, 2012).
- L'éptifibatide est un peptide cyclique dont la séquence est retrouvée dans la barbourine, toxine issue du serpent *Sistrurus miliarius*. C'est un antiagrégant plaquettaire, bloquant les récepteurs intégrines GP IIb/IIIa. Il est indiqué dans le traitement de l'angor instable et en cas d'infarctus du myocarde (EMA, 2018h).
- Le tirofiban, peptide linéaire dérivé de l'échistatine, toxine présente dans le venin de la vipère *Echis carinatus*, a le même mécanisme d'action que l'éptifibatide et est indiqué dans la prise en charge de l'infarctus du myocarde (EMA, 2018i).

Même s'il existe des toxines comme médicament, encore très peu d'entre elles ciblent les RCPG alors qu'ils représentent plus de 30% des thérapeutiques.

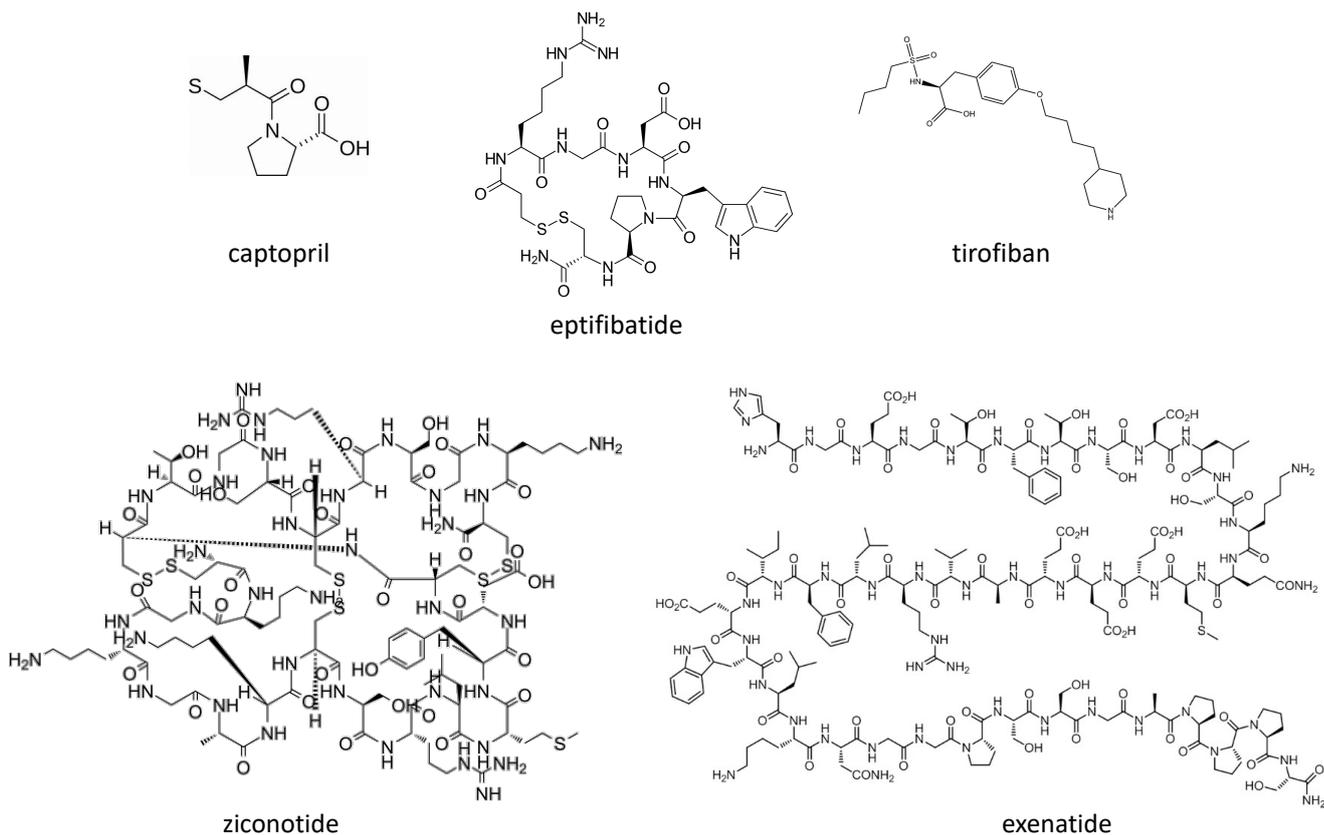


Figure 25: Représentation des structures des principales toxines médicaments.

1.2.2.3 DES COUPLES RCPG-TOXINES

Les toxines interagissant avec les RCPG sont classées en 2 groupes, celles qui présentent une forte homologie structurale avec un ligand endogène et qui activent généralement le récepteur associé; et celles qui ne présentent pas d'homologie structurale avec un ligand endogène mais qui ont des profils pharmacologiques multiples sur les RCPG (Van Baelen et al., 2022).

1.2.2.3.1 Les toxines mimant un ligand endogène

Les toxines présentes dans les venins présentent une grande diversité de séquences et de structures chimiques et ont parfois une forte homologie avec des peptides produits chez des animaux non venimeux pour mieux contrôler plusieurs fonctions physiologiques. En effet, les animaux venimeux ont su évoluer pour produire des toxines ciblant de façon spécifique leur proie. Cette évolution est corroborée par l'existence de toxines produites par l'animal qui ressemblent fortement au peptide agoniste endogène de la proie et qui active le récepteur impliqué. Les couples majeurs caractérisés sont détaillés.

Exendine-4 et le récepteur GLP-1

Le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) est une hormone incrétine impliquée dans l'homéostasie du glucose, ciblant le récepteur GLP-1 et entraînant une augmentation de la sécrétion d'insuline dépendante du glucose par les cellules β pancréatiques (Eng et al., 1990). C'est l'étude de la composition et de l'activité du venin produit dans les glandes salivaires du monstre de Gila, *Heloderma suspectum*, qui a permis d'isoler une toxine : l'exendine-4 est un peptide de 39 acides aminés qui présente une homologie de séquence de 53 % avec le GLP-1. L'exendine-4 cible le récepteur GLP-1 dans les cellules β pancréatiques (Eng et al., 1992) et partage un profil pharmacologique similaire avec le GLP-1 (Raufman et al., 1982) (**Figure 26A**). Sa séquence a été déterminée par spectrométrie de masse et séquençage de petits fragments peptidiques obtenus par digestion à la trypsine : HEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSSGAPPPS. Les modifications de séquence présentent un intérêt pour augmenter la résistance aux protéases et donc la demi-vie *in vivo* (Eng et al., 1990).

Sarafotoxines et les récepteurs ETA et ETB

Les endothélines (ET1, ET2 et ET3), initialement décrites comme des effecteurs endogènes du système cardiovasculaire, ciblent les récepteurs à l'endothéline ETA et ETB. Parmi les multiples effets des endothélines, le plus documenté est cardiovasculaire et participe au contrôle du tonus vasculaire au niveau des cellules musculaires lisses (Davenport et al., 2016). Les sarafotoxines forment une famille de toxines isolées du venin de vipère du genre *Atractaspis*, serpents venimeux du Moyen-Orient (Ducancel, 2005). Les premières sarafotoxines SRTX-6a, SRTX-6b, SRTX-6c ont été découvertes par fractionnement de ces venins par HPLC et par analyse de la cardiotoxicité de chaque fraction chez la souris (Kloog et al., 1988). Comme les endothélines, ils sont composés de 21 acides aminés de long et contiennent 2 ponts disulfure conservés. Les sarafotoxines sont des mimes des endothélines et sont des agonistes des récepteurs ETA et ETB (**Figure 26B**).

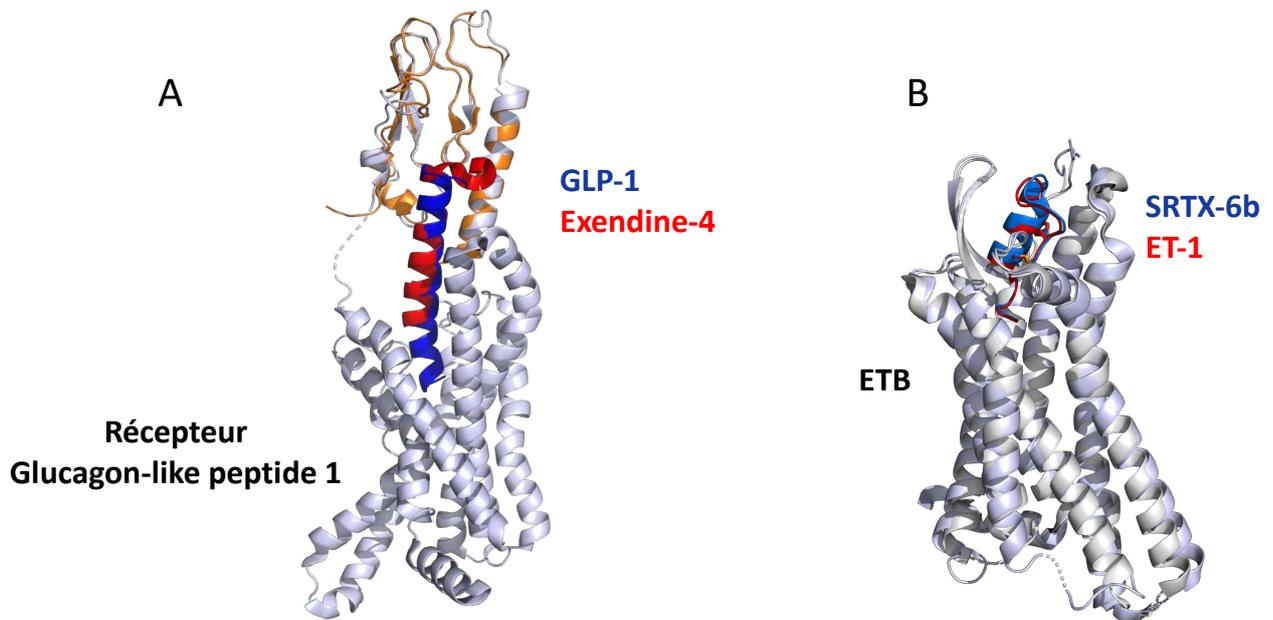


Figure 26: Représentation de l'exendine-4 et de la SRTX-6b, avec leur ligand mime et leur récepteur cible. (A) Superposition de la structure cryo-EM du GLP-1 en bleu foncé avec le récepteur GLP-1 en gris clair (PDB 5vai), et de la structure cristalline de l'exendine-4 en rouge, avec le domaine extracellulaire du récepteur GLP-1 en orange (PDB 3c5t). (B) Superposition de la sarafotoxine SRTX-6b (PDB 5glh) en bleu, et de ET-1 (PDB 6lry) en rouge, en interaction avec le récepteur ETB en gris clair. Figure adaptée de (Van Baelen et al., 2022).

Conopressine et les récepteurs à la vasopressine

La vasopressine est un ligand peptidique endogène qui cible les récepteurs V1a, V1b et V2. V1a médie les actions sur la vasoconstriction de la vasopressine ; la liaison de la vasopressine au récepteur V1b permet d'augmenter la libération d'ACTH ; enfin, les récepteurs V2 médient l'action antidiurétique de la vasopressine. A cause de la vasoconstriction médiée par V1a et de la rétention d'eau induite par V2, ces récepteurs représentent une cible thérapeutique potentiellement intéressante pour les maladies œdémateuses. Les conopressines sont des toxines mimes de la vasopressine, isolées des venins de cônes qui constituent une large famille de peptides, connus pour cibler la famille des récepteurs à la vasopressine. Parmi elles, la conopressine-T (con-T) a été isolée du venin de *Conus tulipa* par sa capacité à induire un effet de grattage après injection chez la souris. Sa séquence a été déterminée par séquençage de spectrométrie de masse *de novo* : CYIQNCLRV. Con-T appartient à la famille des peptides de type vasopressine et présente une homologie de séquence élevée avec les hormones de mammifères, l'ocytocine et la vasopressine. Le profil pharmacologique des conopressines est varié : la con-T est un antagoniste de V1a mais un agoniste partiel du récepteur à

l'ocytocine ; la conopressine-G est un agoniste des récepteurs à la vasopressine (Dutertre et al., 2008; Giribaldi et al., 2020).

Contulakine-G et le récepteur à la neurotensine

La neurotensine, peptide hypotenseur isolé de l'hypothalamus bovin, agit comme un neurotransmetteur au niveau du système nerveux central, et également comme une hormone locale au niveau de l'intestin grêle (Carraway and Leeman, 1973). Ce tridécapeptide est un agoniste des récepteurs de la neurotensine avec une affinité sub-nanomolaire (Checler et al., 1986). En testant des fractions du venin de *Conus geographus* sur la perte de contrôle moteur chez la souris, un peptide nommé contulakine-G, proche de la neurotensine a été isolé par HPLC. C'est un peptide linéaire de 16 acides aminés dont la séquence a été déterminée par séquençage d'Edman et hydrolyse de la O-glycosidase et de la β -galactosidase : pESEEGGSNATKKPYIL, avec la O-glycosylation [β -D-Galp-(1-3)- α -D-Gal pNAc-(1-)] sur Thr10. Cette toxine est un agoniste sub-micromolaire des trois sous-types de récepteurs de la neurotensine (Craig et al., 1999).

Conorphine-T et le récepteur opioïde kappa

Le récepteur opioïde kappa (KOR) est un RCPG connu pour moduler les effets de plusieurs neurotransmetteurs tels que la dopamine et la sérotonine, et la libération de glutamate dans le système nerveux central. Le ligand endogène du récepteur opioïde kappa est la dynorphine-A (Goldstein et al., 1981). C'est un peptide neurotransmetteur impliqué dans plusieurs maladies psychiatriques (Zhang et al., 2007). L'extraction de l'ARN total de *Conus textile* et le clonage et le séquençage de l'ADNc ont conduit à l'identification de la séquence d'ADNc de la conorphine-T : NCCRQICC (Luo et al., 2006). La conorphine-T est un nouvel agoniste sélectif du KOR qui mime la dynorphine-A (Brust et al., 2016).

Consomatine et les récepteurs à la somatostatine

La consomatine Ro1 a été récemment isolée du venin de *C. rolandi*, c'est une toxine de 13 acides aminés avec un pont disulfure mimant la séquence de la somatostatine et de l'octréotide (analogue stable commercialisé). C'est un agoniste ciblant préférentiellement les récepteurs SST1 et SST4, avec néanmoins une affinité près de 1000 fois moins bonne par rapport au ligand endogène, la somatostatine (Ramiro et al., 2022).

1.2.2.3.2 Les couples toxines-RCPG sans homologie avec un ligand endogène

Parmi les couples toxines-RCPG caractérisés, nombre de ces toxines ne présentent aucune analogie avec le ligand endogène de leur récepteur cible. Quelques exemples sont décrits ci-dessous.

MT7 et le récepteur muscarinique M1

Les toxines 3 doigts isolées des venins de mamba font partie des ligands des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine les plus sélectifs. Au cours des 30 dernières années, environ 10 toxines muscariniques différentes ont été purifiées et isolées à partir de venins de *Dendroaspis* en utilisant une stratégie bioguidée. Ce sont des toxines à 4 ponts disulfure, comprenant environ 65 acides aminés (Adem et al., 1988; Karlsson et al., 1991; Servent et al., 2011). La MT7 est un ligand très affiné du récepteur M1 avec une affinité sub-nanomolaire, et sélectif de ce sous-type de récepteur (**Figure 27A**) (Max et al., 1993; Mourier et al., 2003).

p-TIA et les récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques constituent une famille de récepteurs sensibles à l'épinéphrine et à la norépinéphrine et se divisent en trois familles ($\alpha_{1A}R$, $\alpha_{2A}R$ et $\beta_A R$), chacune d'elles comprenant trois membres (Hein, 2006). Les trois récepteurs α_1 -adrénergiques ($\alpha_{1A}AR$, $\alpha_{1B}AR$ et $\alpha_{1D}AR$) sont largement exprimés dans le corps et sont impliqués dans le contrôle du tonus des muscles lisses, comme au niveau des vaisseaux, de la vessie ou de la prostate. La p-TIA a été découverte dans le venin de *Conus tulipa* par stratégie bioguidée en suivant la réponse contractile biphasique du canal déférent prostatique du rat stimulé électriquement. La p-TIA est composée de 19 résidus (FNWRCCLIPACRRNHKKFC) réticulés par deux ponts disulfure en organisation 'ribbon', et cible les récepteurs $\alpha_{1A}AR$, $\alpha_{1B}AR$ et $\alpha_{1D}AR$ (**Figure 27B**) (Sharpe et al., 2001).



Figure 27: Représentation des structures de MT7 et de p-TIA en présence de leur récepteur cible. (A) Représentation de la liaison MT7 (PDB 2vlw) au récepteur M1 (PDB 6wjc) (Maeda et al., 2020). M1 est représenté en gris clair, MT7 est représentée en bleu clair avec les résidus critiques pour l'interaction représentés par des sphères rouges. (B) Modèle de α_{1B} AR en interaction avec p-TIA (PDB 1ien) (Ragnarsson et al., 2013). α_{1B} AR est représenté en gris clair et p-TIA en vert, les résidus importants pour l'interaction dans le récepteur sont représentés en rouge. Figure adaptée de (Van Baelen et al., 2022).

ρ -Da1a et le récepteur adrénergique α_{1A} et ρ -Da1b et les récepteurs adrénergique α_2

La ρ -Da1a (anciennement nommé AdTx-1) a été découverte par une stratégie bioguidée dans le venin du serpent mamba vert *Dendroaspis angusticeps* (Quinton et al., 2010). C'est une toxine à 4 ponts disulfure, comprenant 65 acides aminés. La ρ -Da1a offre une sélectivité élevée pour le récepteur α_{1A} par rapport aux autres sous-types d'adréno-récepteurs et plus largement par rapport aux autres récepteurs aminergiques. La ρ -Da1a agit comme un antagoniste non compétitif, réduisant l'action de l'épinéphrine (Palea et al., 2013). Aussi, la ρ -Da1b est une toxine 3 doigts de 66 acides aminés, antagonistes des récepteurs α_{2A} avec une spécificité pour ce sous-type de récepteur adrénergique (Rouget et al., 2010).

Mambaquartine-1 et le récepteur V2 à la vasopressine

La mambaquartine-1 (MQ1) a été découverte par une stratégie bioguidée dans le venin du mamba vert *Dendroaspis angusticeps* (Ciolek et al., 2017). Cette toxine a une affinité nanomolaire pour le récepteur V2 avec une forte sélectivité vis-à-vis des autres récepteurs à la vasopressine. La

mambaquarétine-1 agit comme un antagoniste sur la voie V2/G α s et a un effet diurétique chez le rat (Droctové et al., 2020) (**Figure 28A**). C'est une toxine de type Kunitz qui est composée de 57 résidus : RPSFCNLPVKPGPCNGFFSAFYYSQKTNKCHSFTYGGCKGNANRFSTIEKCRRTC VG, réticulés par 3 ponts disulfure (Ciolek et al., 2017). D'autres analogues à la mambaquarétine-1 ont été par la suite isolés dans ce venin, à l'affinité nanomolaire pour le récepteur V2. Des essais de pharmacomodulations ont permis de mettre en évidence la MQ1-K39A, variant plus puissant de la MQ1 à l'effet aussi diurétique (Droctové et al., 2022).

N-TRTX-Preg1a, N-BUTX-Ptr1a et N-CTX-Ltg1a et les récepteurs à la mélanocortine

Les récepteurs à la mélanocortine sont répertoriés en 5 sous-types et sont régulés entre autres par la MSH (melanocyte stimulating hormone) et les hormones adrénocorticotropes. Ils participent à la régulation de fonctions physiologiques comprenant l'obésité, l'inflammation, la pigmentation, la stéroïdogénèse... Deux toxines ont été isolées d'un criblage d'une banque de toxines sur le sous-type MC4. Il s'agit de la toxine d'araignée N-TRTX-Preg1a (**Figure 28B**), à 3 ponts disulfure, présentant un motif ICK, et la N-BUTX-Ptr1a (**Figure 28C**), une toxine de scorpion à 3 ponts disulfure avec une structure CS $\alpha\beta$. N-TRTX-Preg1a et N-BUTX-Ptr1a ont des affinités micromolaires pour 4 sous-types: MC1R, MC3R, MC4R et MC5R (Reynaud et al., 2020). Aussi, la N-CTX-Ltg1a est une conotoxine avec 2 ponts disulfure antagoniste du récepteur MC4R avec une affinité nanomolaire. Son analogue linéaire est encore en cours d'étude et présente un intérêt majeur pour le développement d'antagonistes du MC4R (Reynaud et al., 2022).

τ -CnVa et le récepteur à la somatostatine SST3

La découverte de τ -CnVa résulte de l'analyse du transcriptome de la glande à venin de *Conus consors*. Le peptide de 14 acides aminés contenant deux paires cystéines vicinales (ECCHRQLLCCLRFV) appartient à la famille T des conotoxines. La τ -CnVa cible le récepteur SST3, récepteur impliqué dans le relargage d'hormones, comme la TSH (Petrel et al., 2013).

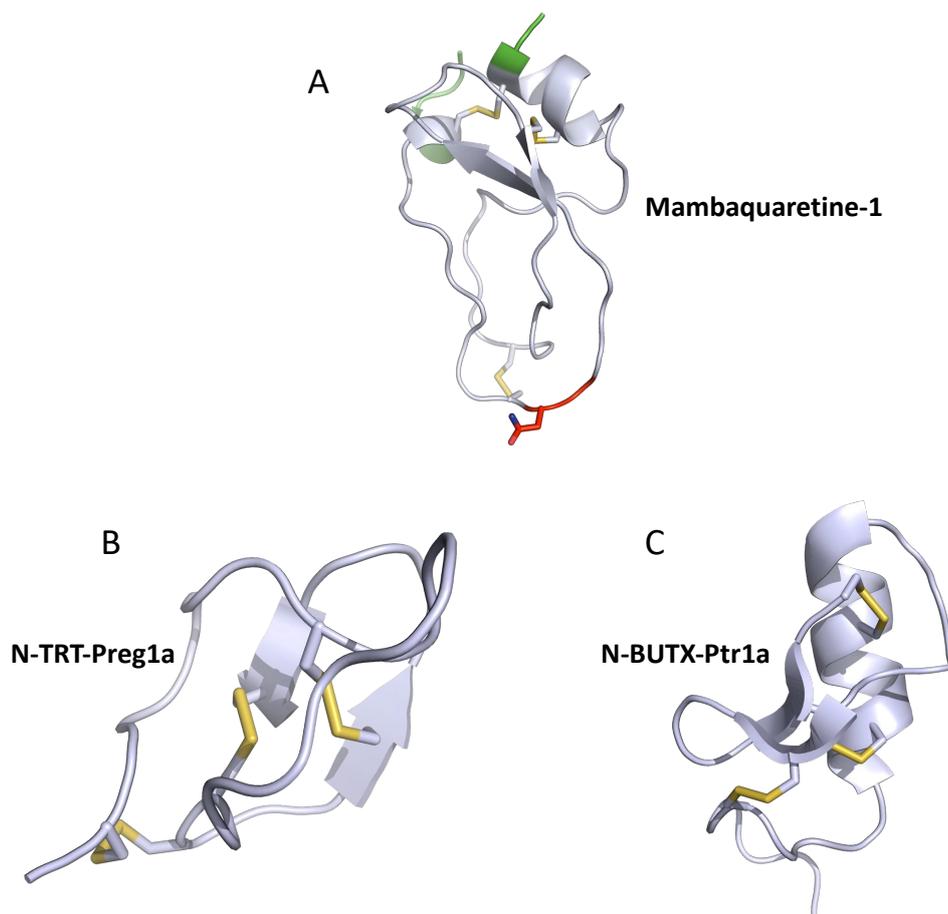


Figure 28: Représentation des structures de la mambaquaretine-1, de N-TRTX-Preg1a et de N-BUTX-Ptr1a en présence de leur récepteur cible. (A) La mambaquaretine-1 (PDB 5m4v) est représentée en gris clair. Les résidus critiques pour la liaison au récepteur V2 sont indiqués en rouge. (B) Représentation de N-TRT-Preg1a (PDB 6saa). (C) Représentation de N-BUTX-Ptr1a (PDB 6sab). N-TRT-Preg1a et N-BUTX-Ptr1a sont représentés en gris clair. Les ponts disulfure sont représentés en jaune. Figure adaptée de (Van Baelen et al., 2022).

Les poisons et venins d'animaux représentent une source de molécules avec une richesse structurale et fonctionnelle importante, qui en font un réservoir inexploité avec un large éventail d'applications pharmacologiques et thérapeutiques. Les toxines issues de ces venins se caractérisent entre autres par une forte réticulation *via* des ponts disulfure qui jouent le rôle de charpente conférant aux toxines animales une grande stabilité. Des pressions de sélection sont à l'origine d'une grande efficacité et sélectivité d'action des toxines animales sur leur cible moléculaire. Néanmoins, aujourd'hui, les méthodes omiques renseignent surtout sur la diversité moléculaire et moins sur la diversité d'activités biologiques. Ainsi seules 7000 toxines ont été caractérisées pharmacologiquement et principalement sur les canaux ioniques, délaissant de potentielles cibles thérapeutiques importantes comme les RCPG.

1.3 OBJECTIFS

De nombreux travaux mettant en évidence le rôle central de l'AngII et de AT1 dans la régulation du SRA ont permis de mettre sur le marché des blockbusters anti-hypertenseurs. Néanmoins, il existe d'autres récepteurs aux angiotensines comme AT2, Mas et MrgD, et d'autres peptides angiotensines. Il a été établi qu'*in vivo* ils contrebalançaient les effets cardiodelétères de l'axe AngII/AT1. Les récepteurs Mas et MrgD ont un potentiel thérapeutique très intéressant, mais leur fonction et leur mode d'action sont encore mal compris, notamment en raison du manque d'outils pharmacologiques disponibles pour leur étude. Aujourd'hui, une seule équipe a réussi à montrer *in vitro* une liaison de l'Ang1-7 au récepteur Mas (Santos et al., 2003). Les autres arguments en faveur de l'Ang1-7 comme agoniste endogène du récepteur Mas proviennent d'études *in vivo*, par exemple sur des modèles souris KO pour Mas ou dans la médullaire ventrolatérale du rat (Becker et al., 2007; Botelho-Santos et al., 2012; Silva et al., 1993; Xu Ping et al., 2008). Concernant MrgD, nous disposons d'encore moins d'informations dans la littérature. Les suppositions sur ces récepteurs sont qu'ils ont comme ligand respectivement l'Ang1-7 et l'alamandine et que ces axes annexes du SRA auraient un rôle cardiobénéfique contrebalançant les effets de la suractivation de l'axe classique AngII/ECA/AT1. L'activation du récepteur AT2 par l'AngII contrebalancerait aussi les effets de l'axe AngII/ECA/AT1. Néanmoins, il y a encore de nombreuses zones d'ombre quant aux voies de signalisation intracellulaires impliquées après l'activation, remettant même en cause sa dénomination de RCPG par sa potentielle absence de couplage aux protéines G. Concernant ces récepteurs aux angiotensines, les questions sur leur mode d'action et les mécanismes intracellulaires impliqués ne sont pas élucidées, et ce, notamment à cause du manque d'outils pharmacologiques pour leur étude.

Quels seraient ces outils ? Le réservoir estimé des 40 millions de toxines est aujourd'hui très peu exploité. De nombreux animaux venimeux ont développé des systèmes sophistiqués afin de sélectionner des toxines qui interfèrent spécifiquement avec les systèmes physiologiques de leurs proies. Outre les effets toxiques les plus connus et les plus puissants associés à l'inhibition de divers canaux ioniques ou enzymes, chez leur proie, d'autres stratégies semblent avoir été développées telles que celles ciblant des RCPG. De plus, toutes les toxines ne sont pas forcément responsables d'effets toxiques délétères chez l'homme. La toxicité observée chez la proie naturelle vs. l'absence d'effet toxique chez les mammifères pourrait être expliquée justement par cette extrême sélectivité de cible, par l'injection à haute dose du venin chez la proie ou encore par le mécanisme évolutif des toxines.

Allier une absence de toxicité de ces toxines, avec une haute affinité, sélectivité, stabilité habituelle de ces peptides et des profils pharmacologiques multiples pourrait alors être largement exploité pour le développement d'outils pharmacologiques pour l'étude de ces récepteurs. Nous pouvons aussi supposer qu'il doit exister dans ces venins une/des toxines ayant pour cible des récepteurs exprimés au niveau cardiovasculaire, comme les récepteurs aux angiotensines, étant donné le tropisme naturel des venins pour les systèmes cardiovasculaire et cérébral. Enfin, même si l'étude des RCPG avec l'utilisation de toxines prend de l'essor, il y a encore peu de couples toxine-RCPG décrits, et même aucun couple décrit toxines-récepteurs aux angiotensines.

L'équipe 'Toxines, récepteurs et canaux ioniques' au sein de laquelle j'ai réalisé mon projet de thèse est spécialisée dans l'étude des toxines comme outils pharmacologiques. Nous avons déjà mis en évidence l'existence de nombreux couples toxines/RCPG. Ces toxines découvertes au sein du laboratoire ont permis de mieux caractériser leur récepteur cible et dans certains cas d'envisager leur exploitation thérapeutique. C'est le cas notamment de la mambaquarétine, antagoniste sélectif et de haute affinité du récepteur V2 de la vasopressine en cours de développement pour le traitement de pathologies rénales (Ciolek et al., 2017; Droctové et al., 2020). Il en va de même pour la MT9, qui est une toxine 3 doigts issue du venin du mamba noir antagoniste des récepteurs muscariniques M2 (Ciolek et al., 2022). Récemment, l'équipe a aussi mis en évidence la toxine N-CTX-Ltg1a, antagoniste des récepteurs à la mélanocortine MC4 (Reynaud et al., 2022).

Face à ces problématiques et compte tenu de l'expertise de l'équipe, l'objectif de mon projet a alors été d'identifier des toxines animales innovantes pour l'étude fonctionnelle des récepteurs aux angiotensines. Ces toxines serviraient d'outils pharmacologiques pour mieux comprendre les voies de signalisation impliquées après activation du récepteur, mais aussi d'outils utilisables en imagerie, voire en thérapeutique. Ces ligands ont été recherchés dans la banque Venomics constituée de 900 toxines synthétiques produites au sein du laboratoire (Gilles and Servent, 2014).

Le projet de thèse s'articule ainsi en plusieurs points :

- a) Nous devons tout d'abord identifier des « hits » par criblage d'une banque de toxines synthétiques sur les récepteurs d'intérêt (Mas, MrgD, AT2). Ces hits seront sélectionnés sur la base de leur capacité à bloquer la liaison du ligand endogène.

- b) Des tests de liaison préliminaires de ces hits sur le récepteur seront menés pour mettre en évidence leur affinité. La sélection des meilleurs hits sera appuyée par une analyse de leur séquence. Les hits offrant la meilleure affinité pour le récepteur, présentant une originalité structurale et n'ayant pas encore été décrits dans la littérature seront alors produits pour être caractérisés.
- c) Pour une caractérisation complète, les hits les plus intéressants seront synthétisés chimiquement par synthèse peptidique en phase solide puis oxydés thermodynamiquement. Des stratégies de pontage dirigé pour former spécifiquement une forme finale repliée pourront être mise en œuvre pour certaines toxines. Suivra une caractérisation des toxines synthétisées par HPLC et par spectrométrie de masse adéquate.
- d) Ces toxines seront caractérisées *in vitro*, sur des modèles cellulaires adaptés. Nous étudierons le profil pharmacologique de ces toxines en mettant en évidence leur mode d'action sur le récepteur d'intérêt. Cette caractérisation comprendra l'impact de ces toxines sur l'engagement dans des voies de signalisation intracellulaires du récepteur, protéines G dépendantes et protéines G indépendantes. L'analyse sera complétée par l'étude de la cytotoxicité et de la sélectivité des toxines.

RESULTATS

2 Résultats : Criblage d'une banque de toxines sur les récepteurs aux angiotensines

La première étape a été de mettre en place un test de criblage d'une banque de toxines synthétiques sur les récepteurs aux angiotensines. Il existe plusieurs méthodes de criblage : par des tests de liaison par compétition, par des tests fonctionnels sur cellules ou encore par des tests *in vivo*.

La méthode de criblage la plus couramment utilisée est par tests de liaison par compétition avec un radioligand. C'est cette méthode de criblage que nous avons voulu mettre en place.

Pour ce criblage, nous devons ainsi disposer d'une banque de toxines synthétiques, de membranes contenant les récepteurs aux angiotensines (Mas, MrgD, AT2 ou encore AT1) et d'un radioligand.

- 1) La banque de toxines a été développée au sein du laboratoire comme expliqué ci-après (Gilles and Servent, 2014; Reynaud et al., 2020).
- 2) Nous avons produit des membranes contenant les récepteurs aux angiotensines d'intérêt.
- 3) Nous avons produit le radioligand permettant la mise en place des tests de liaison par compétition.

2.1 MISE EN PLACE DES TESTS DE LIAISON SUR LES RECEPTEURS AUX ANGIOTENSINES PAR L'UTILISATION DE RADIOLIGAND

2.1.1 PRINCIPE ET MISE EN PLACE

L'utilisation de radioligands pour la mesure d'interactions protéine-ligand est une technique répandue pour caractériser les constantes cinétiques et d'affinité de ces interactions. Le choix du radioligand est primordial et il faut s'assurer que le radiomarquage n'impacte pas la liaison du ligand marqué à son récepteur. Les principaux avantages que possède cette approche par radiomarquage sont la haute sensibilité de la mesure et le fait que l'on modifie peu le ligand lors de l'ajout d'un atome radioactif minimisant les effets de cet ajout sur l'interaction ligand-récepteur. L'iode 125 est un isotope radioactif de l'iode couramment utilisé en pharmacologie pour ces études de liaison. C'est un radionucléide émetteur X (rayonnement à 27 KeV) et émetteur γ (rayonnement à 35 KeV). Son introduction dans les biomolécules est aisée en particulier sur les chaînes latérales des acides aminés comme la tyrosine (où il est introduit en position ortho de l'hydroxyle). L'avantage de l'utilisation de l'iode 125 par rapport au tritium est qu'il possède une meilleure activité spécifique ce qui augmente la sensibilité des mesures. Sa demi-vie courte (60 j) empêche une conservation longue mais permet une meilleure gestion des déchets radioactifs.

Concrètement, dans le cas d'un criblage de molécules sur un récepteur avec l'utilisation d'un radioligand, une suspension de membranes cellulaires contenant le récepteur d'intérêt est incubée en présence du radioligand et d'une des molécules à cribler (compétiteur potentiel). Après incubation, ce mélange est filtré pour conserver les membranes sur le filtre (contenant les couples radioligands-récepteurs) et éliminer le radioligand non lié. La radioactivité retenue sur le filtre est alors mesurée. Si le compétiteur potentiel se fixe sur le récepteur il y aura alors une diminution de la radioactivité signe d'une diminution de la liaison du radioligand par rapport à la condition contrôle réalisée en absence de compétiteur.

2.1.2 LIAISON DE ^{125}I -SAR1, ILE8-ANGII SUR LES RECEPTEURS AUX ANGIOTENSINES

Nous avons souhaité savoir si notre test de liaison était réellement fonctionnel et si notre méthode de production des membranes était satisfaisante. Nous avons donc commencé l'étude des récepteurs aux angiotensines en mettant en place une méthodologie de tests de liaison avec un radioligand sur un système bien décrit : tester la liaison d'un analogue de l'AngII, la Sar1, Ile8-AngII (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile) sur les récepteurs AT1 et AT2. Cet analogue est classiquement utilisé dans les tests de caractérisation des récepteurs AT1 et AT2 et il est décrit que ce ligand a une affinité nanomolaire pour ces récepteurs.

Nous avons produit le radioligand ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII avec l'utilisation d'un oxydant dit « doux », le iodogène dont le mécanisme d'action est décrit **Figure 29**. Nous avons donc incorporé un atome d'iode 125 au niveau de la Tyr4 du peptide. Avec cette méthode nous avons réussi à produire la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII, et le produit monoiodé est présent en quantité suffisante pour pouvoir poursuivre les tests de liaison. Les analyses par MALDI-TOF de la production de ce radioligand sont données en annexe.

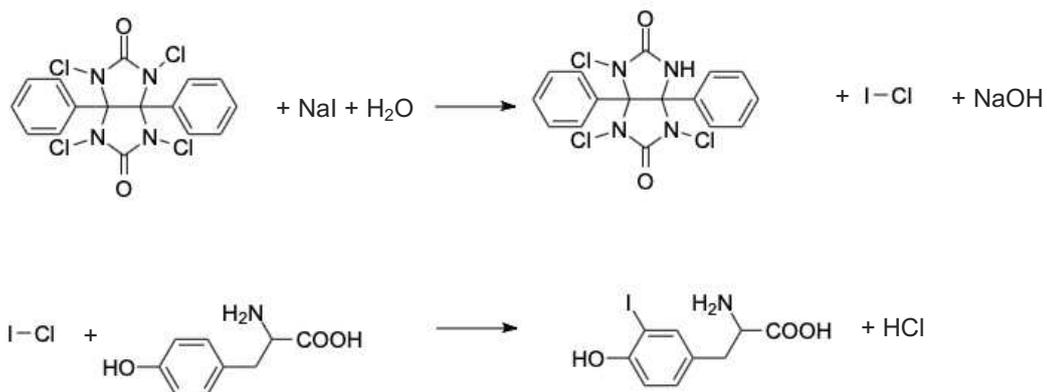


Figure 29: Mécanisme d'incorporation d'iode 125 en ortho de la fonction hydroxyle de la tyrosine par la méthode utilisant le iodogène.

Nous avons aussi produit les membranes contenant nos récepteurs d'intérêt. Pour cela, nous avons transfecté des cellules HEK293T avec le plasmide codant pour le récepteur d'intérêt pour ensuite obtenir une suspension de membranes cellulaires contenant les récepteurs AT1 ou AT2.

Pour mettre au point le test de liaison il faut optimiser (a) la quantité de membrane à utiliser, (b) la quantité / concentration de radioligand, (c) le temps d'incubation, pour obtenir un rapport liaison totale / liaison non spécifique (mentionné comme LT/LNS ci-après) optimal (on estime que ce rapport

doit être au moins supérieur à 5). La LT est mesurée en absence de tout compétiteur, la LNS est mesurée en présence d'un large excès de ligand compétiteur froid (AngII 1µM).

Nous avons alors caractérisé les propriétés du radioligand ¹²⁵I-Sar1, Ile8-AngII (¹²⁵I-S118-AngII) que nous avons synthétisé sur les récepteurs AT1 et AT2 (**Figure 30**) en réalisant des expériences de compétition dans des conditions à l'équilibre en présence d'AngII non marquée (cf annexe 13). L'analyse des courbes de compétition permet de déduire des valeurs d'IC50 qui sont ensuite converties en constantes d'affinité (Ki) grâce à l'équation de Cheng et Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973) :

$$Ki = \frac{IC50}{1 + \frac{(L)}{Kd}}$$

Avec IC50 : concentration de ligand inhibant 50% de la liaison spécifiques de ¹²⁵I-Sar1, Ile8-AngII ; L, la concentration en ¹²⁵I-Sar1, Ile8-AngII utilisée dans l'expérience (entre 0,3 et 0,5 nM) ; Kd, la constante de dissociation de ¹²⁵I-Sar1, Ile8-AngII (1 nM) (Healy et al., 1986; Katugampola and Davenport, 2002). Les expériences de saturation nécessaires à la détermination du Kd utilisent une quantité importante de radioligand. Or, notre quantité de radioligand produite n'était pas suffisante pour effectuer ces tests. Nous nous sommes donc basés sur les valeurs de Kd du radioligand obtenues dans la littérature.

En faisant varier les quantités de membranes et de radioligand, nous avons déterminé les meilleures conditions pour effectuer les tests de liaison : nous utilisons 0,3 µL de membranes et 30 000 coups par minute (CPM) proposés. 30 000 CPM correspondent à environ 67 000 désintégrations par minute (DPM), le rendement du compteur gamma étant de 45%. Nous utilisons aussi 1 µM d'AngII pour calculer la LNS et les plaques sont incubées sur la nuit. Comme montré **Figure 30A** nous observons une différence significative entre la LT et la LNS pour le récepteur AT1, avec un rapport LT/LNS de 6, ainsi que pour le récepteur AT2 avec un rapport LT/LNS de 12 (**Figure 30A**). La ¹²⁵I-Sar1, Ile8-AngII se fixe donc sélectivement sur les membranes contenant les récepteurs AT1 et AT2, liaison bloquée par l'ajout de 1 µM de ligand froid. Ces rapports satisfaisants nous permettent de valider les conditions expérimentales.

Ensuite, les courbes de liaison de la ¹²⁵I-Sar1, Ile8-AngII en présence de doses croissantes d'AngII montrent que l'AngII se fixe sur les récepteurs AT1 et AT2 de façon dose-dépendante. Les Ki de l'AngII mesurés pour ces récepteurs sont de 1,5 nM et 2,4 nM respectivement pour les récepteurs AT1 et

AT2 (**Figure 30B**) et sont cohérents avec ce qui est décrit dans la littérature (Bosnyak et al., 2011; Connolly et al., 2019).

Ainsi, les membranes cellulaires contenant les récepteurs AT1 et AT2 ainsi que le radioligand ^{125}I -S118-AngII préparés selon nos protocoles sont donc fonctionnels et exploitables dans le cadre du criblage d'une banque de ligands et de la caractérisation pharmacologique de ligands.

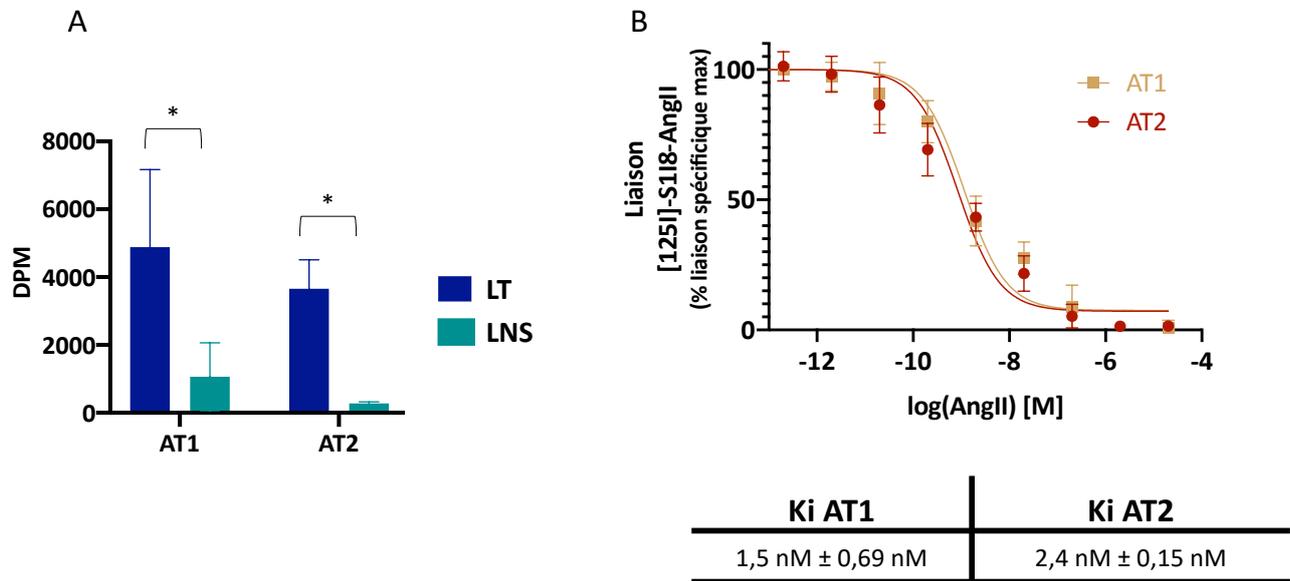


Figure 30: Liaison de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII et compétition avec l'AngII sur les récepteurs AT1 et AT2. (A) Liaison totale et liaison non spécifique (en présence de 1 μM d'AngII) de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII sur des membranes HEK293T contenant les récepteurs AT1 et AT2. (B) Courbes de liaison par compétition de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII sur des membranes HEK293T contenant AT1 (beige) ou AT2 (rouge) en présence de concentrations croissantes d'AngII. Le tableau recense les constantes d'affinité (K_i) de l'AngII pour les récepteurs AT1 et AT2. Les données sont exprimées en % de liaison spécifique de ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII en l'absence d'AngII. La LNS est calculée par rapport au plateau bas de la courbe. Les valeurs sont des moyennes (%) \pm SEM ($n = 5$).

Nous avons aussi testé ce radioligand sur les récepteurs Mas et MrgD. Les membranes exprimant ces récepteurs ont été produites dans les mêmes conditions que les membranes exprimant les récepteurs AT1 et AT2. Dans ce cas nous n'avons observé aucune liaison du radioligand, signe que le radioligand est bien spécifique des récepteurs AT1 et AT2 (**Figure 31**).

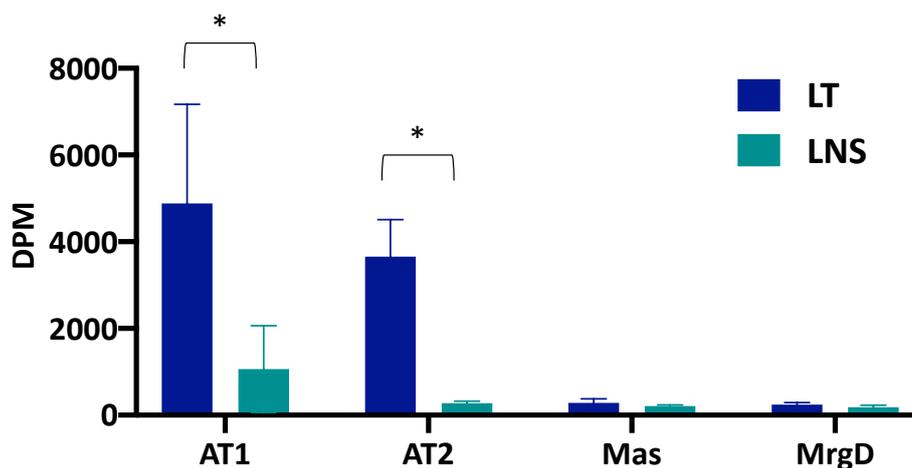


Figure 31: Liaison totale et liaison non spécifique de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII sur des membranes HEK293T contenant les récepteurs AT1, AT2, Mas ou MrgD. Les conditions sont les mêmes que pour **Figure 30**. Les résultats sont obtenus en moyennant les valeurs en désintégrations par minute (DPM) des LT et LNS (n=2). *<0,05.

2.1.3 LIAISON DE ^{125}I -ANG1-7 SUR LES RECEPTEURS AUX ANGIOTENSINES

Puisque nous avons réussi à valider notre méthodologie de test de liaison sur membrane contenant les récepteurs AT1 ou AT2 avec l'utilisation du radioligand ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII, nous avons voulu mettre en place un test de liaison fonctionnel de l'Ang1-7 sur le récepteur Mas en utilisant la même stratégie.

L'Ang1-7 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) possède aussi un résidu tyrosine en position 4 permettant le marquage par un atome d'iode 125. Nous avons donc utilisé le iodogène avec la même méthode que pour la production de ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII. Avec cette méthode nous avons réussi à produire la ^{125}I -Ang1-7 et le produit monoiodé est présent en quantité suffisante pour pouvoir poursuivre les tests de liaison.

Néanmoins, Santos *et al.* utilisent la chloramine T qui, en présence de NaI, permet théoriquement d'incorporer l'iode au sein de l'Ang1-7. Nous avons voulu utiliser cette technique pour la comparer avec la méthode de iodation au iodogène (Santos et al., 2003). Cependant, cette technique n'a pas été concluante pour produire assez de ^{125}I -Ang1-7. L'analyse par spectrométrie de masse par MALDI-TOF montre que le profil de pureté est médiocre, et le peptide monoiodé n'est présent qu'à l'état de traces.

Les chromatogrammes et les analyses de masse par MALDI-TOF des 2 techniques sont donnés en annexe.

Comme montré **Figure 32**, à partir du lot de ^{125}I -Ang1-7 produit avec l'utilisation de iodogène nous avons testé la liaison du radioligand sur les membranes contenant 1 des 4 récepteurs aux angiotensines, en présence ou en absence d'Ang1-7 non marquée en excès. Quel que soit le récepteur testé, nous n'avons pas pu observer de différence significative entre la LT et la LNS et donc de liaison spécifique de la ^{125}I -Ang1-7 sur le récepteur Mas dans notre modèle d'étude (**Figure 32**).

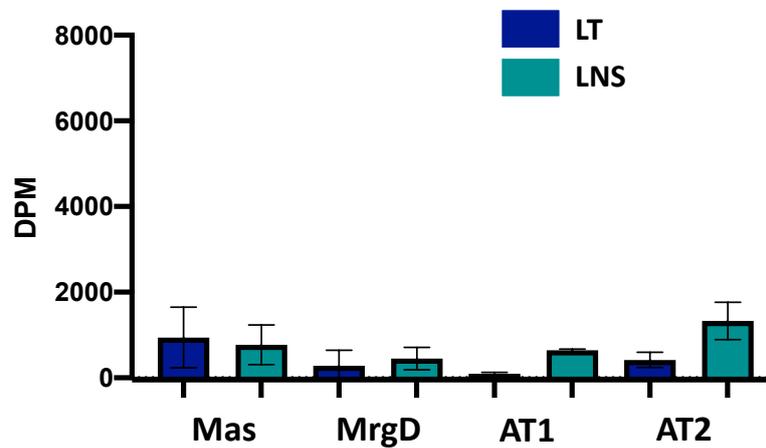


Figure 32: Liaison totale et liaison non spécifique de la ^{125}I -Ang1-7 sur des membranes contenant les récepteurs AT1, AT2, Mas ou MrgD. Les résultats sont obtenus en moyennant les valeurs en désintégrations par minute (DPM) des LT et LNS (n=2). Les puits dédiés à la mesure de la LT contenaient : 0,7 μL de membranes, 50 000 CPM proposés ; les puits dédiés à la LNS contenaient : 0,7 μL de membranes, 50 000 CPM proposés, 20 μM de compétiteur froid.

Bilan

En conclusion de cette partie, les expériences réalisées montrent que nous sommes capables de produire le radioligand ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII fonctionnel et de mettre en évidence sa liaison spécifique sur les récepteurs AT1 et AT2. Ces résultats permettent aussi de valider notre méthode d'expression des récepteurs AT1 et AT2 et notre méthode de production des membranes cellulaires pour l'étude de la liaison.

Par contre, nous n'avons pas été en mesure de mettre au point un test de liaison avec l'utilisation d'un radioligand (^{125}I -Ang1-7 ou ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII) se liant sur les récepteurs Mas (et MrgD).

Il est possible que le récepteur Mas ne soit pas assez exprimé lors des transfections et que les membranes produites ne contiennent pas assez de récepteur. Nous tenterons de répondre à cette problématique ci-après. Il est aussi possible que l'incorporation d'un atome d'iode gêne la liaison de l'Ang1-7 au récepteur Mas. Pour répondre à cette problématique, nous avons décidé d'utiliser un ligand marqué avec un fluorophore à l'extrémité N-ter du peptide. Enfin, il est aussi possible que l'Ang1-7 ne soit pas le ligand du récepteur Mas : aucun couplage à $G_{\alpha q}$, ni à $G_{\alpha i}$, ni de recrutement de β -arrestine, ni d'activation de ERK1/2 n'a été observé sur des cellules HEK293T transfectées avec le récepteur Mas (Gaidarov et al., 2018).

2.2 MISE EN PLACE DES TESTS DE LIAISON SUR LES RECEPTEURS AUX ANGIOTENSINES PAR L'UTILISATION DE LIGAND FLUORESCENT

Etant donné que nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence la liaison de la ¹²⁵I-Ang1-7 sur les récepteurs Mas et MrgD, nous avons tenté une autre approche basée sur l'utilisation d'un ligand fluorescent.

2.2.1 METHODOLOGIE

2.2.1.1 PRINCIPE DU FRET

Le FRET (transfert d'énergie par résonance de Förster) consiste en un transfert d'énergie entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur d'énergie. Ce transfert d'énergie n'a lieu que si les deux molécules sont suffisamment proches l'une de l'autre (à moins de 10 nm). L'excitation du donneur par une source d'énergie lumineuse (par exemple un laser) déclenche un transfert d'énergie vers l'accepteur, qui à son tour émet un signal spécifique à une longueur d'onde donnée (**Figure 33A**). La longueur d'onde d'émission du donneur coïncide avec la longueur d'onde d'absorption de l'accepteur qui réémet à une autre longueur d'onde. S'il y a FRET nous pouvons alors détecter une augmentation du signal de fluorescence à la longueur d'onde d'émission de l'accepteur. Le donneur et l'accepteur peuvent être greffés de manière covalente sur de multiples partenaires comme par exemple un ligand et son récepteur.

2.2.1.2 PRINCIPE DU TR-FRET

Un des problèmes liés à cette technologie du FRET est la présence d'une fluorescence intrinsèque des composants de l'échantillon lors de l'excitation. Ce type de fluorescence est extrêmement transitoire et peut être éliminé à l'aide de technologies de FRET dites en temps résolu : le TR-FRET (Time-Resolved FRET) est une technologie de détection qui combine la fluorescence en temps résolu (TR) avec le FRET. Cela permet de s'affranchir de la fluorescence de fond de courte durée due à l'excitation en mesurant la fluorescence plus tardivement.

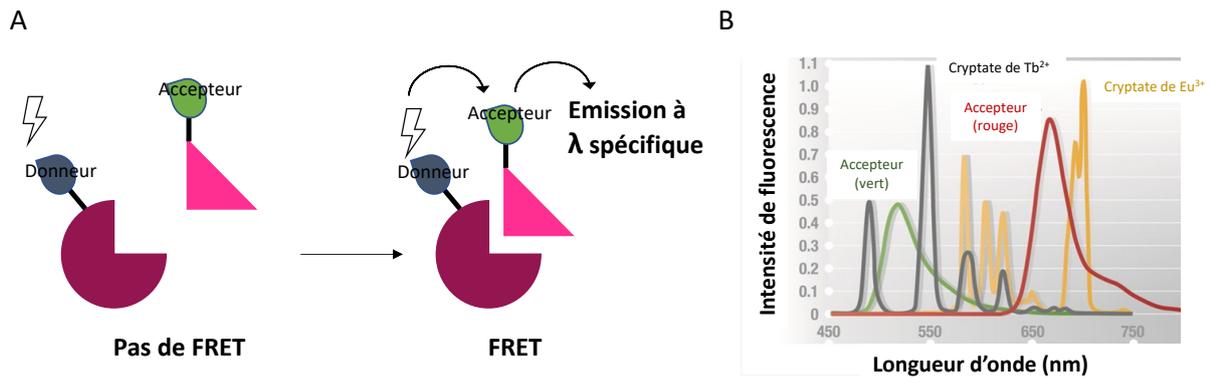


Figure 33 : Représentation schématique du FRET. (A) Principe du FRET entre un donneur d'énergie et un accepteur d'énergie. (B) Spectres d'émission de fluorescence associés aux accepteurs d'énergie et aux donneurs d'énergie (cryptates), image adaptée du guide d'application HTRF, Agilent.

La technologie HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence) développée par la compagnie Cisbio, est une technologie basée sur le FRET et sur l'utilisation d'un cryptate d'euporium (Eu^{3+}) ou de terbium (Tb^{2+}) (donneur d'énergie) et d'une molécule fluorescente (accepteur d'énergie). Ces cryptates émettent une fluorescence dont le temps de demi-vie est long, qui permet alors de faire une mesure une fois que la fluorescence de fond due à l'excitation, brève, s'est atténuée. Un lecteur de fluorescence est alors capable de détecter simultanément la fluorescence à deux longueurs d'onde (longueur d'onde d'émission des cryptates et longueur d'onde d'émission de la molécule fluorescente). L'HTRF présente des niveaux de performance en termes de stabilité et de spécificité particulièrement intéressants. Le choix du couple donneur-accepteur et de la longueur d'onde de lecture réside dans l'étude du chevauchement entre les spectres (**Figure 33B**).

2.2.1.3 TECHNOLOGIE TAG-LITE

Le Tag-lite est une technologie développée par Cisbio qui permet d'étudier les interactions ligands-récepteurs, en combinant l'HTRF avec la technologie SNAP-tag. Le SNAP-tag est une petite protéine qui peut être fusionnée à l'extrémité N- ou C-ter d'une protéine d'intérêt. En pratique, pour les RCPG, le domaine SNAP-tag est fusionné à l'extrémité N-ter du récepteur afin d'être positionné au voisinage du site de liaison des ligands. Le SNAP-tag réagit avec le groupement benzylguanidine porté par une molécule d'intérêt, un cryptate de terbium dans notre cas. Cette réaction entraîne le départ du groupement guanidine et crée une liaison covalente entre une cystéine du site catalytique du SNAP-tag et la molécule de cryptate (**Figure 34**).

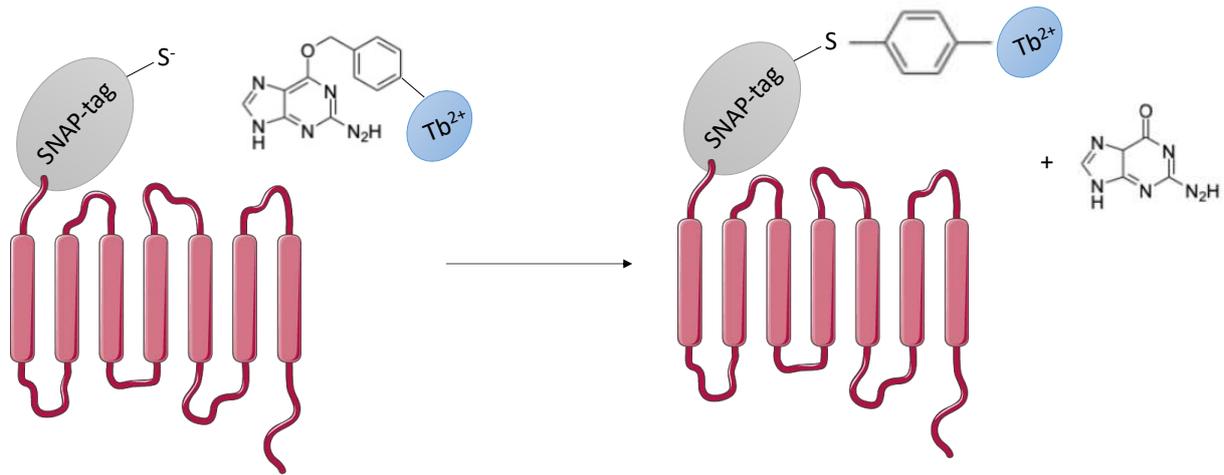


Figure 34: Marquage des RCPG au SNAP-tag et lien covalent avec le cryptate de Tb^{2+} .

Nous pouvons utiliser cette méthode pour étudier la liaison de ligand au récepteur. Cette méthode a déjà été utilisée pour l'étude de RCPG comme pour le récepteur à la vasopressine V2 (Loison et al., 2012), à l'apeline APJ (Valencia et al., 2017) ou encore à la dopamine D3 (Hounsou et al., 2015). Dans ce cas, il faut aussi greffer au ligand un fluorophore accepteur d'énergie. S'il y a liaison, il y aura transfert d'énergie entre le cryptate et le fluorophore, alors détectable par mesure de la fluorescence aux longueurs d'onde adéquates (**Figure 35**).

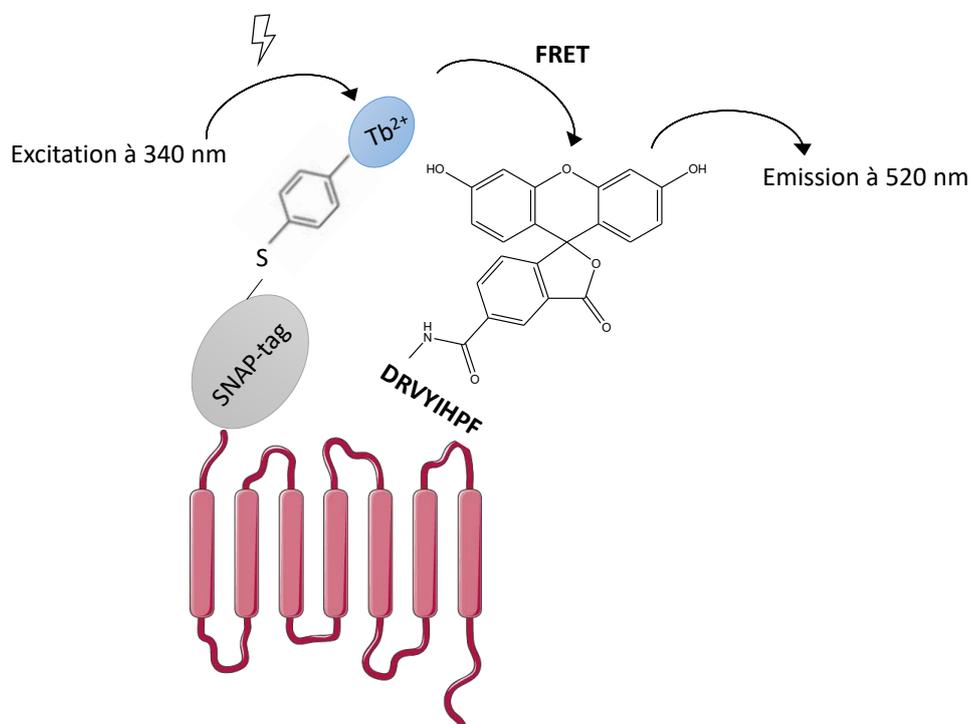


Figure 35: Exemple de TR-FRET entre le cryptate de Tb^{2+} et la 5-carboxyfluorescéine. La liaison du peptide à son récepteur provoque le rapprochement stérique entre le cryptate de Tb^{2+} et la 5-carboxyfluorescéine. Une source excite le donneur d'énergie cryptate de Tb^{2+} à 340 nm qui émet à

495 nm. L'accepteur d'énergie 5-carboxyfluorescéine absorbe à 495 nm pour émettre un signal détectable à 520 nm.

Nous avons choisi d'appliquer cette technologie pour l'adapter à l'étude des récepteurs Mas et MrgD. Pour cela, nous avons construit les plasmides codant pour les récepteurs d'intérêt fusionnés à un domaine SNAP-tag à leur extrémité N-ter et produit le ligand portant le fluorophore correspondant.

2.2.2 MISE EN PLACE DE LA TECHNIQUE SNAP-TAG

Dans un premier temps, nous avons utilisé les plasmides codant pour les SNAP-tag-RCPG. Le SNAP-tag est introduit dans le plasmide codant pour notre RCPG d'intérêt au niveau N-ter du récepteur. Nous avons au laboratoire : SNAP-tag-AT1, SNAP-tag-AT2, SNAP-tag-Mas et SNAP-tag-MrgD. Ces plasmides seront transfectés dans les cellules HEK293T avant marquage au Tb^{2+} .

Nous avons tout d'abord voulu contrôler l'expression à la membrane des récepteurs SNAP-tag. Pour cela, après avoir transfecté des cellules HEK293T avec chaque récepteur portant ou non un domaine SNAP-tag, nous les avons marquées avec le réactif SNAP-Lumi4-Tb qui permet la liaison d'un cryptate de Tb^{2+} au récepteur, puis mesuré la fluorescence à 620 nm (longueur d'onde d'émission de référence pour le cryptate de Tb^{2+}). Pour chaque récepteur, nous observons une forte fluorescence au moins 10 fois plus intense pour la version SNAP-tag que pour la version sans SNAP-tag (**Figure 36**). Ces résultats montrent que les 4 récepteurs possédant le domaine SNAP-tag peuvent être marqués au cryptate de Tb^{2+} et qu'ils le sont de manière équivalente. Le SNAP-Lumi4-Tb ne pouvant pas pénétrer dans une cellule, ces résultats indiquent que les 4 récepteurs SNAP-tag sont bien exprimés à la surface des cellules de manière identique.

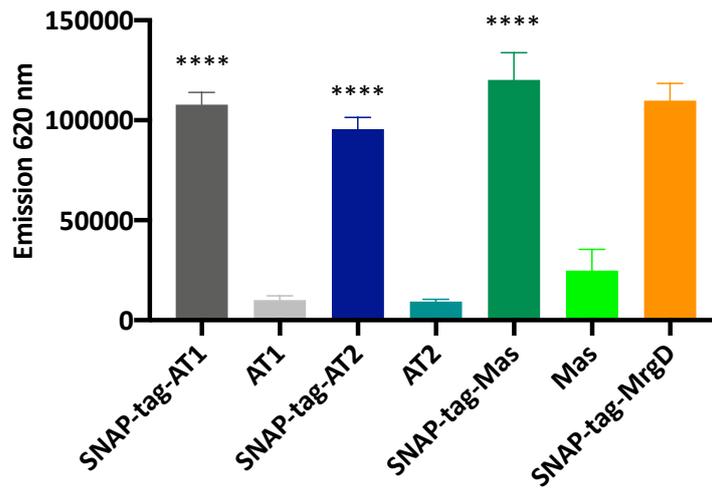


Figure 36: Contrôle du marquage au cryptate de Tb^{2+} des récepteurs SNAP-tag-AT1, SNAP-tag-AT2, SNAP-tag-Mas ou SNAP-tag-MrgD et des versions sans SNAP-tag. Les résultats sont obtenus en moyennant les valeurs du signal à 620 nm ($n=2$). **** $<0,00001$, par rapport à l'équivalent sans SNAP-tag.

Néanmoins, il fallait aussi vérifier que ce groupement SNAP-tag n'empêchait pas la liaison du ligand. Pour cela, nous avons testé le radioligand ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII, que nous avons caractérisé auparavant sur les récepteurs sans groupement SNAP-tag, pour sa capacité à se fixer sur le récepteur possédant un SNAP-tag. Les résultats montrent que la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII se fixe de manière spécifique sur les récepteurs SNAP-tag-AT1 (LT/LNS = 7) et sur les récepteurs SNAP-tag-AT2 (LT/LNS = 5). Ces résultats permettent de conclure que le groupement SNAP-tag n'affecte pas la liaison du ligand sur AT1 et AT2, en l'occurrence ici de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII (**Figure 37**). Cela est corroboré par le fait que l'AngII s'enfouit dans le site orthostérique du récepteur donc *a priori* le SNAP-tag n'affecterait pas la liaison. Comme pour les récepteurs sans groupement SNAP-tag, la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII ne se fixe pas sur SNAP-tag-Mas ni sur SNAP-tag-MrgD.

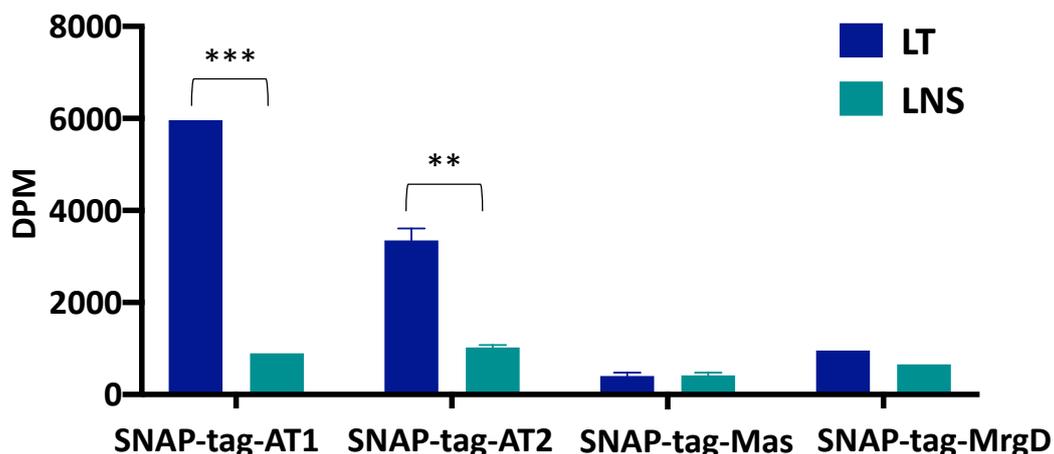


Figure 37: Liaison totale et liaison non spécifique de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII sur des membranes HEK293T contenant les récepteurs SNAP-tag-AT1, SNAP-tag-AT2, SNAP-tag-Mas ou SNAP-tag-MrgD. Les conditions sont les mêmes que pour **Figure 30**. Les résultats sont obtenus en moyennant les valeurs en désintégrations par minute (DPM) des LT et LNS (n=2). **<0,001 ; ***<0,0001.

Synthèse de ligands fluorescents

Le choix du fluorophore à greffer sur le ligand s'est porté sur la 5-carboxyfluorescéine (λ_{ex} environ 495 nm et $\lambda_{\text{ém}}$ environ 520 nm), composé fluorescent couramment utilisé pour marquer les peptides et dont le spectre d'excitation/émission est compatible avec son utilisation comme accepteur d'énergie dans les expériences de TR-FRET avec le cryptate de Tb^{2+} comme donneur. Le mode de fixation de l'AngII sur les récepteurs AT1 et AT2 est connu (*cf* 1.1.1.3). C'est la partie C-ter du peptide qui s'enfonce dans le cœur des récepteurs, laissant la partie N-ter du peptide plus en surface : la fonction amine de l'Asp1 de l'AngII est exposée en dehors du site de liaison du récepteur AT1 (**Figure 38**). C'est pourquoi nous avons produit dans un premier temps le peptide fluorescent avec la 5-carboxyfluorescéine (ci-après nommée aussi FLUO) en position N-ter du peptide pour limiter une possible diminution d'affinité causée par l'encombrement de ce fluorophore.

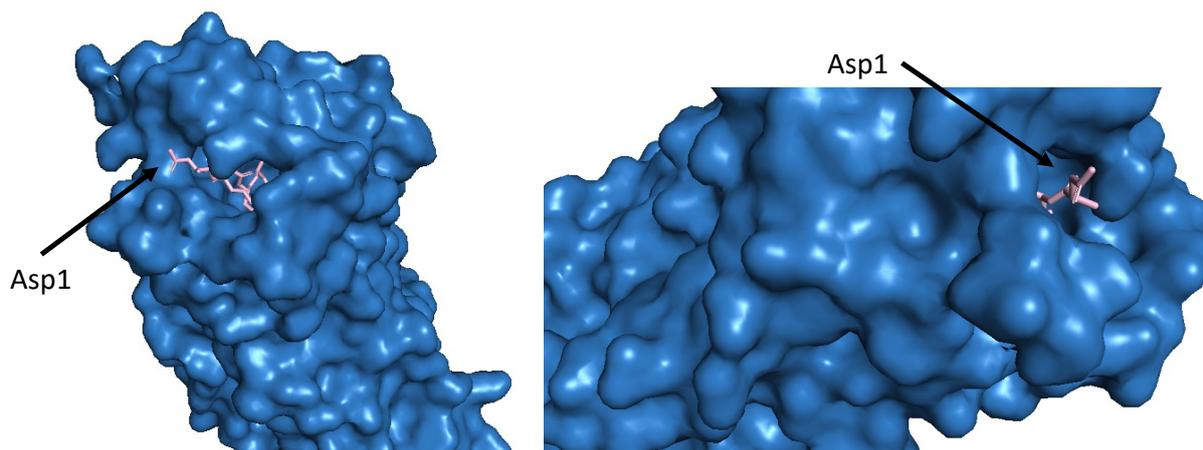


Figure 38: Structure cristallographique du récepteur AT1 en bleu, représenté en surface, et liaison avec l'AngII en rose pâle (PDB 6os0) (Wingler et al., 2020).

Pour l'étude des récepteurs SNAP-tag-Mas et SNAP-tag-MrgD nous avons produit respectivement la FLUO-Ang1-7 et la FLUO-Alamandine. Nous avons aussi étudié la liaison de la FLUO-AngII sur les récepteurs SNAP-tag-AT1 et SNAP-tag-AT2 (**Figure 39**).

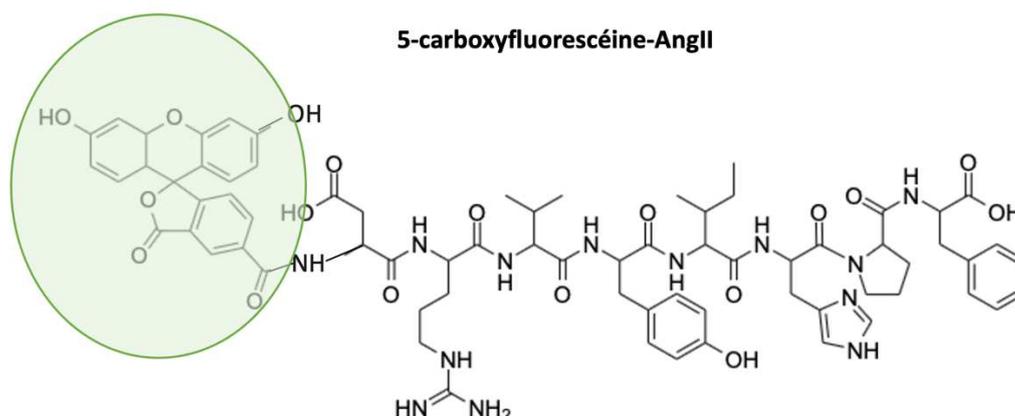


Figure 39: AngII marquée à la 5-carboxyfluorescéine en N-ter. La 5-carboxyfluorescéine est entourée en vert. Le même marquage a été effectué pour l'Ang1-7 et l'alamandine.

La synthèse des peptides linéaires angiotensines AngII (DRVYIHPF), Ang1-7 (DRVYIHP) et alamandine (ARVYIHP) est réalisée par synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) (méthode détaillée au chapitre 3). Le principe est de greffer la 5-carboxyfluorescéine sur l'amine terminale libre (donc sur le résidu D ou A). Pour cela, à la fin de la synthèse du produit linéaire, nous clivons le dernier groupement 'Fmoc' du résidu D ou A, libérant ainsi l'amine terminale. Les groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés, sensibles en conditions acides, sont encore protégés puisque le Fmoc a été clivé par une solution de pipéridine. Il n'y a donc qu'une seule amine libre avec laquelle la 5-

carboxyfluorescéine peut réagir. Cette réaction s'effectue en milieu basique en présence d'un agent activateur (l'HCTU), permettant de modifier l'acide carboxylique de la 5-carboxyfluorescéine en ester, groupe plus réactif pour le couplage peptidique avec l'amine terminale du peptide. Après greffage du fluorophore, un test de Kaiser est réalisé pour vérifier l'absence d'amine libre. Le peptide est alors clivé de son support solide et les groupements protecteurs des chaînes latérales d'acides aminés déprotégés en milieu acide (**Figure 44A**). Une purification finale par HPLC permet d'obtenir le produit final pur. Les profils d'HPLC analytique et les spectres de masse des 3 peptides marqués décrits ci-dessus sont répertoriés en annexes.

2.2.3 RESULTATS

Afin de tester la liaison des peptides fluorescents aux récepteurs, nous avons incubé les 3 peptides fluorescents (FLUO-AngII, FLUO-Ang1-7 et FLUO-Alamandine) en présence de cellules exprimant les SNAP-tag-RCPG marqués au Tb^{2+} (SNAP-tag-AT1, SNAP-tag-AT2, SNAP-tag-Mas, SNAP-tag-MrgD). Pour la détermination de la liaison non spécifique, un excès de ligand ($1 \mu M$) non marqué a été ajouté. Après 1 h d'incubation, la fluorescence est mesurée à 520 nm (peptides couplés à la fluoresceine) et à 620 nm (cryptate de Tb^{2+}) et le rapport d'HTRF (520/620) est calculé. Si celui-ci augmente, cela signifie qu'il y a un rapprochement stérique entre le cryptate de Tb^{2+} et la 5-carboxyfluorescéine donc que le ligand fluorescent est fixé au récepteur.

Pour les récepteurs AT1 et AT2, nous observons une augmentation significative du rapport d'HTRF en présence de FLUO-AngII, significativement différent de la LNS. La FLUO-AngII se lie donc de manière spécifique sur les récepteurs AT1 et AT2. Le ligand FLUO-AngII que nous avons synthétisé est donc fonctionnel et sa liaison aux récepteurs AT1 et AT2 peut être mesurée. En revanche il n'y a pas d'augmentation du rapport d'HTRF en présence de l'Ang1-7 et alamandine marquées : ces 2 peptides ne semblent donc pas se fixer sur les récepteurs AT1 et AT2, du moins à la concentration utilisée (**Figure 40**). Ceci est cohérent avec certaines données de la littérature. En effet, la co-injection d'Ang1-7 et d'AngII limite les effets biologiques de l'AngII. Ces effets ne sont pas bloqués par le losartan (antagoniste de AT1) ou le PD123319 (antagoniste de AT2), démontrant que l'Ang1-7 n'agit pas sur les récepteurs AT1 ni AT2 (Xue et al., 2012). Concernant l'alamandine, il n'y a pas de preuve réelle de sa liaison à MrgD *in vitro*.

Concernant les récepteurs Mas et MrgD, l'ajout d'AngII ou d'Ang1-7 ou d'alamandine marquées n'entraîne pas d'augmentation du rapport d'HTRF. Les valeurs de liaison non spécifiques sont

obtenues par l'ajout d'Ang1-7 et d'alamandine non marquées pour les récepteurs Mas et MrgD respectivement. La LT avec l'Ang1-7 ou l'alamandine ou l'AngII fluorescente n'est pas significativement différente de la LNS pour les récepteurs Mas et MrgD. Dans ce système nous n'observons pas de transfert d'énergie suggérant que ces peptides ne se lient pas sur les récepteurs Mas et MrgD (**Figure 40**) ou qu'ils le font d'une manière telle que la fluorescéine ne se trouve pas dans une position suffisamment proche du cryptate de Tb^{2+} pour que le FRET soit efficace.

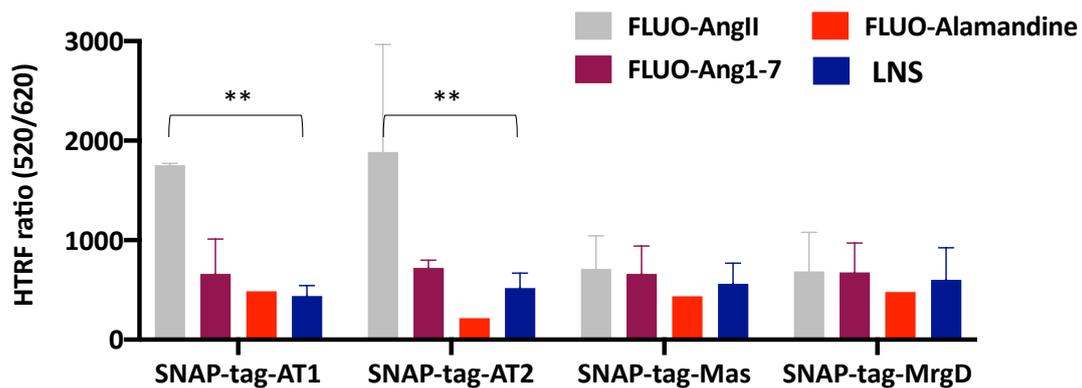


Figure 40: Liaison des peptides angiotensines marqués à la 5-carboxyfluorescéine en N-ter aux SNAP-tag-RCPG. Les cellules HEK293T transfectées avec le plasmide d'intérêt sont marquées au Tb^{2+} pendant 1h puis incubées avec le peptide marqué (100 nM) en présence ou non du peptide non marqué (10 μ M). Les résultats sont obtenus en moyennant les rapports d'HTRF (n=2). FLUO : 5-carboxyfluorescéine ; LNS : liaison non spécifique.

Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer ces résultats : (a) ces peptides ne sont effectivement pas des ligands de ces récepteurs, (b) le groupement SNAP-tag empêche la liaison des peptides (même s'il n'empêche pas la liaison de l'AngII sur les récepteurs AT1 et AT2), (c) le groupement 5-carboxyfluorescéine empêche la liaison des peptides.

2.2.4 SYNTHÈSES D'ANALOGUES PEPTIDIQUES FLUORESCENTS

Pour savoir si la position du fluorophore a un impact sur la liaison du peptide à son récepteur et donc pour répondre à l'hypothèse (c), nous avons produit plusieurs analogues fluorescents de l'Ang1-7 et de l'alamandine (**Figure 41**). Le mode de liaison de l'Ang1-7 et de l'alamandine à leur récepteur respectif n'est pas connu à l'heure actuelle. Il est possible que la présence de la 5-carboxyfluorescéine, trop encombrée, puisse empêcher ce mode de liaison. C'est pourquoi nous avons décidé « d'éloigner » cette 5-carboxyfluorescéine en ajoutant en N-ter des peptides, un ou 2 résidus β -alanine (β -Ala) pour réduire la gêne stérique potentielle. Nous avons donc produit les β -

Ala-Ang1-7, (β -Ala)₂-Ang1-7 et β -Ala-Alamandine. Nous avons ensuite greffé la carboxyfluorescéine en N-ter par le même protocole que celui mentionné ci-dessus (**Figure 44A**). Une purification finale par HPLC permet d'obtenir le produit final pur. Les profils d'HPLC analytique et les spectres de masse des peptides marqués décrits ci-dessus sont répertoriés en annexes.

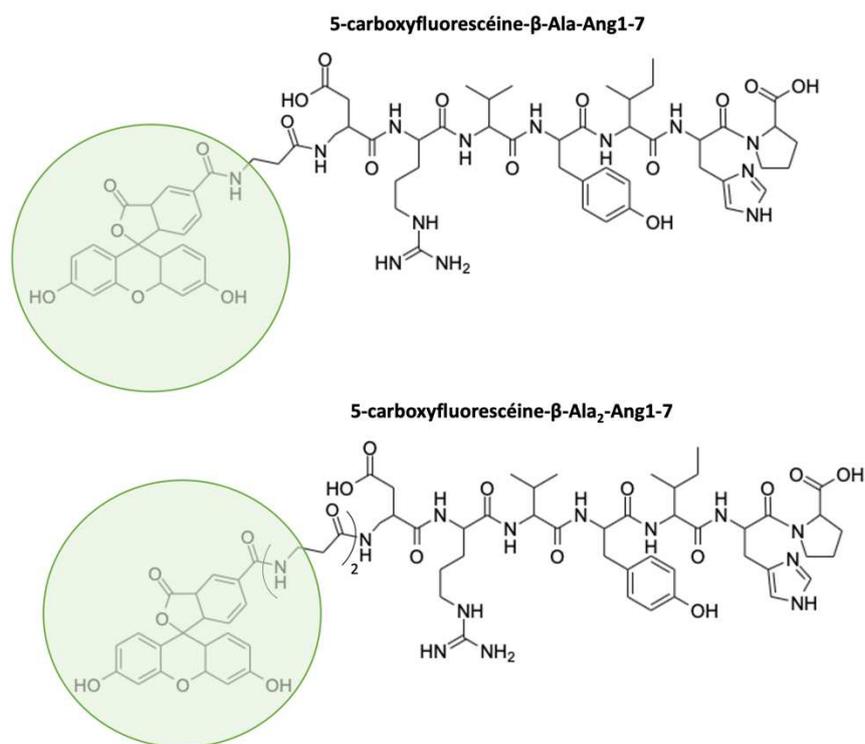


Figure 41 : β -Ala-Ang1-7 et β -Ala₂-Ang1-7 marquées à la 5-carboxyfluorescéine en N-ter. Le même marquage a été effectué pour la β -Ala-alamandine.

La liaison de ces peptides aux récepteurs Mas et MrgD a été testée comme pour la **Figure 40**. Concernant les récepteurs AT1 et AT2, nous observons comme précédemment une augmentation significative du rapport d'HTRF en présence de FLUO-AngII. En revanche il n'y a pas de modification de ce rapport en présence des analogues β -Ala de l'Ang1-7 et de l'alamandine marquées quel que soit le récepteur testé (**Figure 42**). Ces peptides angiotensines fluorescents ne se fixent sur aucun des récepteurs SNAP-tag-AT1, -AT2, -Mas et -MrgD.

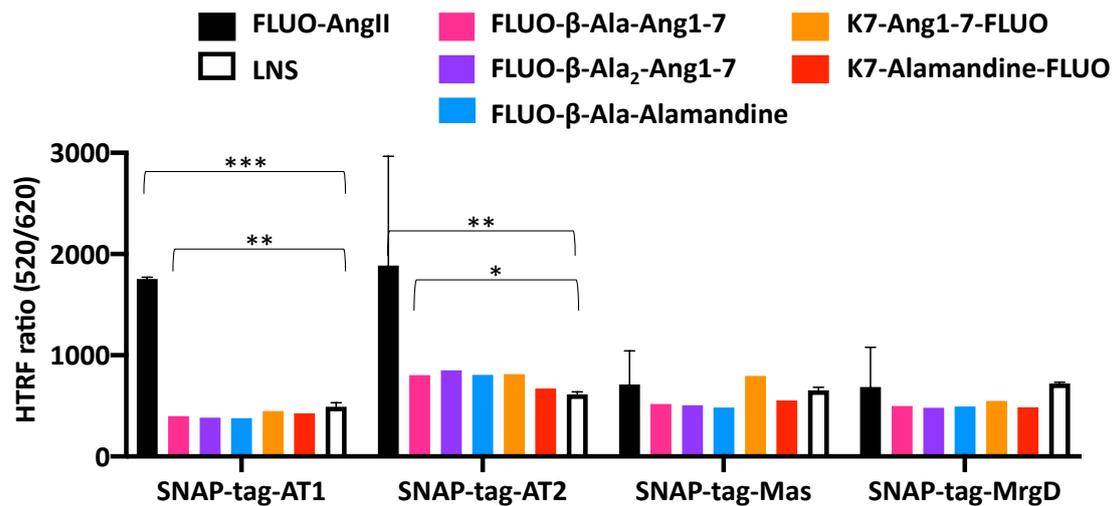


Figure 42: Liaison des peptides angiotensines analogues marqués à la 5-carboxyfluorescéine aux SNAP-tag-RCPG. Les cellules transfectées avec le plasmide d'intérêt sont marquées au Tb^{2+} pendant 1h puis incubées avec le peptide marqué (100 nM) en présence ou non du peptide non marqué (10 μ M). Les résultats sont obtenus en moyennant les rapports d'HTRF ($n=2$). FLUO : 5-carboxyfluorescéine ; LNS : liaison non spécifique.

Il est néanmoins probable que le mode de liaison de l'Ang1-7 sur Mas et de l'alamandine sur MrgD ne soit pas similaire à celui de l'AngII sur AT1 et AT2. C'est pourquoi nous avons voulu produire ces peptides avec le fluorophore en C-ter au lieu du N-ter.

Nous avons donc produit par SPPS les peptides Ang1-7 et alamandine en remplaçant l'acide aminé en C-ter (la Phe) par une Lys_{ivDde} : Ang1-7- K_{ivDde} (DRVYIH- K_{ivDde}) et alamandine- K_{ivDde} (ARVYIH- K_{ivDde}). La Lys est ici greffée possède un groupement $ivDde$, groupement orthogonal clivé par l'hydrazine (**Figure 43**). L'acide aminé en N-ter (Ala ou Asp) est dans ce cas protégé par un groupement Boc et non Fmoc, labile en conditions acides.

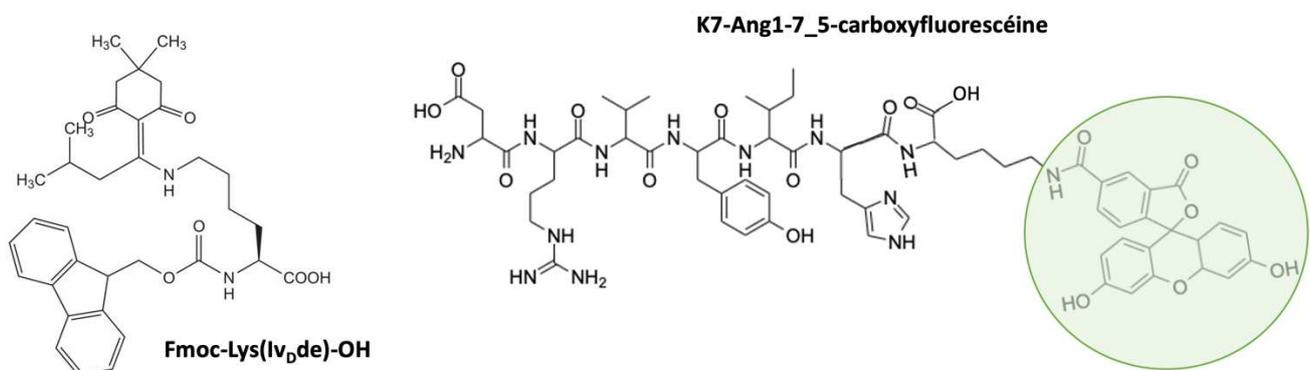


Figure 43: Représentation de la $Fmoc-Lys_{ivDde}-OH$ et de K7-Ang1-7 marquée à la 5-carboxyfluorescéine en C-ter entourée en vert. Le même marquage a été effectué pour l'alamandine.

La stratégie de synthèse est de libérer une amine en C-terminal pour y greffer le groupement FLUO. Pour cela, à partir du peptide linéaire brut encore greffé à son support nous ajoutons l'hydrazine qui clive sélectivement le groupement ivDde de la Lys. L'amine N-terminale est toujours protégée par le Boc et les chaînes latérales encore protégées. Nous ajoutons alors la 5-carboxyfluorescéine en présence d'HCTU pour permettre son incorporation au niveau de l'amine libre de la Lys. Un test de Kaiser nous permet de vérifier l'absence d'amine libre. Nous pouvons alors éliminer le groupement Boc, cliver le peptide de son support et déprotéger les chaînes latérales en milieu acide (**Figure 44B**). Une purification finale par HPLC permet d'obtenir le produit final pur. Les profils d'HPLC analytique et les spectres de masse des 2 peptides marqués décrits ci-dessus sont répertoriés en annexes.

Ces 2 peptides K7-Ang1-7-FLUO et K7-Alamandine-FLUO ont aussi été testés sur les 4 SNAP-tag-RCPG. Malheureusement, comme pour les autres dérivés testés nous n'avons observé aucune liaison de ces peptides quel que soit le récepteur (**Figure 42**).

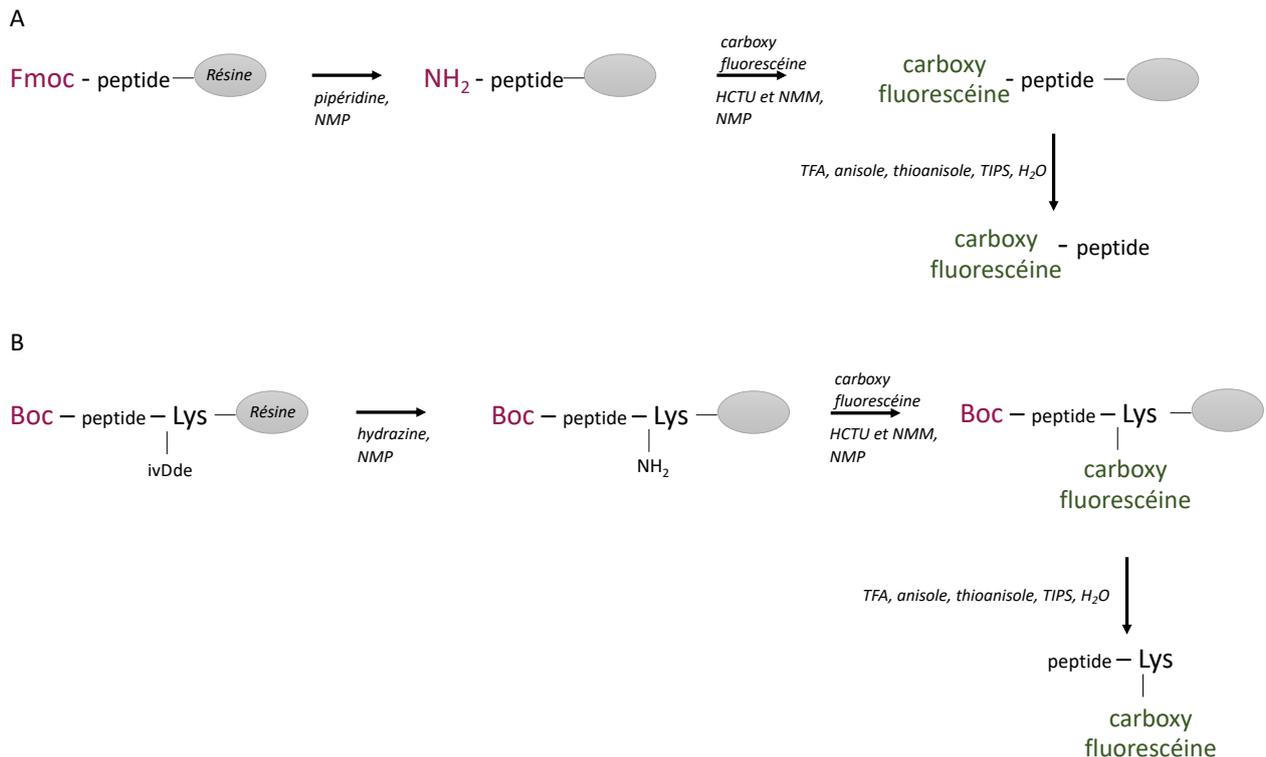


Figure 44: Principe du marquage à la 5-carboxyfluorescéine en (A) N-ter et (B) C-ter des peptides angiotensines.

Bilan

Nous avons pu mettre au point une méthode de liaison de l'AngII sur les récepteurs AT1 et AT2 basée sur le principe du TR-FRET : l'AngII fluorescente se fixe de façon spécifique aux récepteurs AT1 et AT2. Pour cela nous avons modifié les récepteurs AT1 et AT2 par l'ajout d'un domaine SNAP-tag en N-ter et nous avons synthétisé l'AngII modifiée avec l'ajout d'un groupement 5-carboxyfluorescéine en N-ter.

Concernant les récepteurs Mas et MrgD nous avons utilisé cette même approche mais qui n'a pas été concluante. Malgré la synthèse d'autres types de dérivés fluorescents (avec l'ajout d'un groupement 5-carboxyfluorescéine en C-ter, ou en N-ter, avec l'ajout de résidus β -alanine pour éloigner le fluorophore en N-ter) de l'Ang1-7 et de l'alamandine aucune liaison spécifique n'a pu être mise en évidence sur les récepteurs SNAP-tag-Mas et SNAP-tag-MrgD, ni sur les récepteurs SNAP-tag-AT1 et -AT2 d'ailleurs.

Compte tenu de ces résultats, il sera donc impossible de cribler une banque de toxines sur ces récepteurs Mas et MrgD.

Néanmoins, nous restons confiants quant à l'idée de pouvoir utiliser les toxines de notre base de données pour l'étude du système rénine-angiotensine. Le point le plus délicat du projet étant de trouver un test de liaison fiable, donc d'avoir des certitudes quant à la liaison d'un ligand sur sa cible RCPG, nous avons cherché à étudier un récepteur pour lequel la caractérisation de la liaison du ligand endogène est bien décrite.

2.3 CRIBLAGE DE LA BANQUE VENOMICS SUR LE RECEPTEUR AT2

2.3.1 INTRODUCTION

Le récepteur AT2 et son ligand endogène AngII est un couple caractérisé de longue date. L'AngII a une affinité similaire pour AT1 et pour AT2 (Bosnyak et al., 2011). Notre intérêt s'est d'autant plus tourné vers ce récepteur qui aurait des effets physiologiques opposés à ceux du récepteur AT1. Néanmoins, contrairement à AT1, sa caractérisation pharmacologique paraît peu classique, la littérature est encore pauvre concernant sa caractérisation fonctionnelle et les voies de transduction du signal impliquées. De plus, il n'existe à ce jour pas d'autres ligands peptidiques que les angiotensines, décrits pour ce récepteur.

Bien que nous ayons mis au point 2 méthodes de mesure de liaison pour le récepteur AT2 (par l'utilisation de ligand fluorescent et de radioligand), nous avons décidé d'utiliser la méthode classique faisant appel au radioligand : ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII. En effet cette méthode est plus facilement adaptable à un criblage comprenant un très grand nombre de points expérimentaux. Nous avons donc décidé de cribler la banque de toxines synthétiques Venomics, grâce au test de liaison de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII sur le récepteur AT2.

Le projet Venomics a été développé par un consortium européen dont N. Gilles, au sein de notre équipe, a été coordinateur. L'objectif était de mettre en place une banque riche de toxines animales synthétiques représentative de la diversité moléculaire des venins. Il était ensuite nécessaire que cette banque soit techniquement facilement criblée sur nos cibles d'intérêt. L'analyse des venins de près de 200 espèces par des approches protéomique et transcriptomique a permis d'identifier plus de 20 000 toxines. Ces toxines ont été ensuite produites par voie recombinante (celles de plus de 35 acides aminés) ou par SPPS (celles de moins de 35 acides aminés) (Gilles and Servent, 2014; Reynaud et al., 2020). La partie de la banque de toxines produites par SPPS contient environ 900 toxines, c'est cette partie que nous avons criblée sur le récepteur AT2.

L'ensemble de ces toxines a été synthétisé par SPPS pour obtenir un produit linéaire qui a été oxydé pour former la forme finale tridimensionnelle fonctionnelle (les détails de synthèse des toxines sont détaillés dans le chapitre suivant). Chaque toxine a été déposée dans un puits de plaque 96 pour conservation. Pour ce criblage nous avons utilisé 11 plaques de 96 puits comprenant chacune 80 toxines différentes à cribler.

2.3.2 MISE AU POINT DES CONDITIONS DE CRIBLAGE

Nous avons mis au point les conditions de criblage en utilisant des membranes de cellules HEK293T exprimant le récepteur AT2 et le radioligand ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII produit et purifié au laboratoire. Il fallait s'assurer des conditions pour le criblage : quelle quantité de membranes par puits, quelle quantité de radioligand introduite, quel temps d'incubation du radioligand pour obtenir un rapport LT/LNS optimal. Nous avons mis au point des conditions avec des tests à petite échelle, par mesure de LT et de LNS. L'analyse des puits dédiés à la mesure de la liaison totale et de la liaison non spécifique permet de calculer la médiane associée ainsi que le MAD (median absolute deviation). Ces valeurs sont ensuite nécessaires au calcul du facteur Z qui est une mesure statistique de l'effet de taille. Ce facteur permet de quantifier l'aptitude des paramètres d'un test à petite échelle à être utilisés dans un test de criblage à plus grande échelle. Il comprend 4 paramètres : les médianes et les MAD associées. Le facteur Z est considéré comme très bon s'il est $> 0,5$.

$$\text{Avec } Z = 1 - \frac{3 \text{ MAD LT} + 3 \text{ MAD LNS}}{\text{médiane LT} - \text{médiane LNS}}$$

Les conditions suivantes : 0,3 μL de membranes contenant le récepteur AT2, 30 000 CPM de radioligand introduit nous ont permis d'obtenir un facteur Z de 0,72 et un rapport LT/LNS de 6,5 et ont été validées pour le criblage (Figure 45).

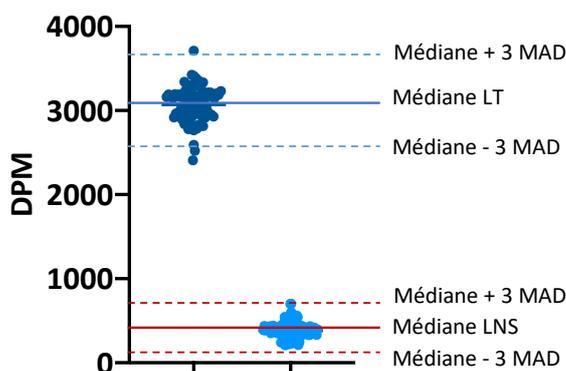


Figure 45: Résultats des tests préliminaires pour le criblage sur le récepteur AT2. La radioactivité est mesurée en désintégrations par minute (DPM). LT : liaison totale ; LNS : liaison non spécifique ; MAD median absolute deviation.

2.3.3 CRIBLAGE DE LA BANQUE DE TOXINES

Nous avons donc effectué le criblage de cette partie de la banque Venomics de toxines synthétiques sur le récepteur AT2 par inhibition de la liaison de ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII.

Chaque puits de criblage contient entre 1 et 10 μM de peptides oxydés. Une colonne par plaque est dédiée à la mesure de la LT et une colonne dédiée à la mesure de la LNS. Après incubation, les plaques sont filtrées et la radioactivité résiduelle est mesurée avec un compteur gamma. Nous avons calculé la médiane des valeurs de radioactivité de chaque puits, ainsi que la MAD. Nous avons sélectionné les peptides pour lesquels la valeur de liaison était en dehors de l'intervalle de $\pm 3\text{MAD}$ autour de la médiane. Sur les 880 toxines criblées, 26 donnent des valeurs s'écartant de la médiane $\pm 3\text{MAD}$. Ces toxines appelées « hit » représentent donc 3% des peptides testés (**Figure 46**). De plus, ces hits sont répartis dans des plaques différentes, nous n'observons pas « d'effet de plaque ».

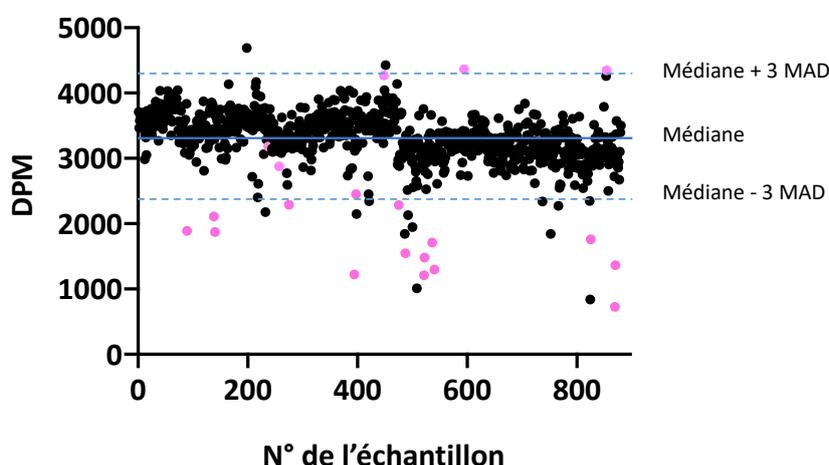


Figure 46: Résultats du criblage de la banque Venomics sur le récepteur AT2. Toutes les valeurs de radioactivité de chaque puits sont répertoriées. En rose, sont représentés les hits sélectionnés pour la suite de la caractérisation. La radioactivité est mesurée en désintégration par minute (DPM).

2.3.4 CARACTERISTIQUES DE LIAISON DES TOXINES

Le criblage de la banque Venomics sur AT2 a permis de mettre en évidence 26 hits. Parmi ces hits et en plus d'une analyse détaillée des séquences des zones proches des 3 MAD, nous avons sélectionné 20 toxines pour les synthétiser et effectuer une confirmation et une première caractérisation de leur liaison sur les récepteurs aux angiotensines. Ces hits ont été sélectionnés pour les raisons suivantes : (a) leur séquence n'était renseignée dans aucune banque peptidique, (b) ils n'avaient pas d'homologie de séquence entre eux ni avec d'autres peptides connus, (c) ils sont issus d'organismes multiples et offrent des motifs de cystéines variés (**Tableau 3**).

N° Venomics	Organisme	Séquence	Motifs de cystéines
P010342	<i>Conus miliaris</i>	CCPRRPVCCFP	CC-CC
P010343	<i>Conus miliaris</i>	LQTHWNKRCCPRRPVCCFP	CC-CC
P010658	<i>Conus lividus</i>	CGHSGAGCYRRPCCPGLHCSGGHAGGLCV	C-C-CC-C-C
P011105	<i>Hadrurus arizonensis</i>	SGTKCSSNQCTRPCRYGGGTHGKCMNGRCRCYG	C-C-C-C-C-C
P011298	<i>Hottentotta trilineatus</i>	DFCSKCSSICRGRKKGVKVCRPPYSCKCTHG	C-C-C-C-C-C
P011726	<i>Parabuthus transvaalicus</i>	RCPFSSRCVLHCRDNGFSNGKCRWFKCKCL	C-C-C-C-C-C
P011881	<i>Poecilotheria regalis</i>	CSQLLGSTKDSDCCLMSCPPNWPRYCSWYSVF	C-C-CC-C-C
P014565	<i>Conus miliaris</i>	CHFVWCP	C-C
P014704	<i>Conus canonicus</i>	CCSWDHDCVSDGECGM	CC-C-C
P014781	<i>Conus litoglyphus</i>	FHYCQCECPPGFKGKFCQFKLRPP	C-C-C-C
P014822	<i>Conus arenatus</i>	GCCSMKYCDFMCDCC	CC-C-C-CC
P016638	<i>Centruroides gracilis</i>	CRSHRDCRYCGPFGGRCTGYRQCLCNYGR	C-C-C-C-C-C
P017577	<i>Poecilotheria ornata</i>	CRRFWGGCSRDSDCCKHLHCKRKPNI	C-C-CC-C-C
P018689	<i>Avicularia avicularia</i>	ACRWMFVGCTVDADCKHLHCVGKSSCLWSLTV	C-C-CC-C-C
P018826	<i>Avicularia avicularia</i>	DCATFWSSCTKHNCGLKCSRRGGVCKFG	C-C-CC-C-C
P018857	<i>Avicularia avicularia</i>	RGCFREGHACTKSAPCCRPMKCKERKCTKT	C-C-CC-C-C
P018868	<i>Avicularia avicularia</i>	DNCIHGGQFCGLPQYGPLCCSGFCAGACL	C-C-CC-C-C
P020670	<i>Lasiadora parahybana</i>	FCFPEGRPCTTSARCCIPMVCKQRKCLRS	C-C-CC-C-C
P020701	<i>Lasiadora parahybana</i>	ASALMAQADLRGCCSNPPCSYLNACG	CC-C-C
P021763	<i>Phoneutria pertyi</i>	KEIIVPVLQRNRSDEEECCIYPWCDGGCRCC	CC-C-C-CC

Tableau 3: Liste des 20 peptides sélectionnés lors du criblage sur le récepteur AT2.

Dans un premier temps, ces 20 peptides ont dû être synthétisés en quantité suffisante pour leur étude. Ils ont été produits selon la méthode détaillée ci-après : synthèse du peptide linéaire par SPPS, purification par HPLC, oxydation du peptide pour former les ponts disulfure, purification par HPLC de la forme oxydée (Chapitre 3).

Dans un second temps, afin de confirmer ou infirmer la potentialité de chaque peptide à se lier au récepteur AT2, des tests de liaison par compétition ont été réalisés dans des conditions similaires à

celles utilisées pour le criblage mais en testant l'effet dose-dépendant pour chacun d'entre eux. Nous avons testé chaque toxine à des doses allant de 45 nM jusqu'à 100 μ M en présence de 0,5 nM de radioligand 125 I-S118-AngII. Dans ces conditions un effet dose-dépendant d'inhibition de la liaison du radioligand doit être observé pour que le peptide testé soit confirmé comme hit. De plus, cet effet dose-dépendant permet de déterminer son affinité. Nous avons observé cet effet dose-dépendant pour 3 toxines (hits confirmés, **Figure 48**), les 17 autres ne montrant pas d'effet sur la liaison du radioligand au récepteur AT2 (**Figure 47**) ont été qualifiés de faux positifs. Ce taux de faux positif de 85% est exceptionnellement élevé. Des explications sont possibles :

- (a) Chaque puits criblé contient le brut de synthèse peptidique, et non la toxine purifiée. Il est donc possible que l'activité trouvée lors du criblage soit due à un dérivé de synthèse plutôt qu'à la toxine elle-même.
- (b) La concentration de produit dans chaque puits criblé n'est pas mesurée de façon précise. Il est possible que cette concentration soit sous-évaluée et qu'elle ne soit pas atteinte en test de compétition.

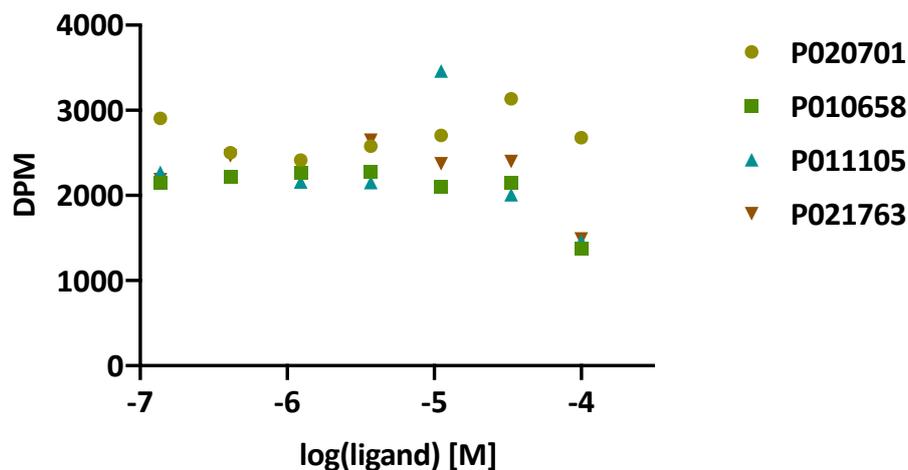


Figure 47: Courbes de liaison par compétition de 125 I-Sar1, Ile8-AngII sur des membranes contenant le récepteur AT2 en présence de 4 peptides issus du criblage primaire : P020701 P010658, P011105, P021763. Les données sont exprimées en DPM.

Comme montré par l'analyse des courbes de compétition avec la 125 I-Sar1, Ile8-AngII, les 3 toxines retenues montrent une affinité de l'ordre du micromolaire pour le récepteur AT2 (**Figure 48**). Elles ont été nommées selon la nomenclature suivante :

-La première lettre fait référence au système physiologique ciblé par la toxine : A pour angiotensine.

-Les 3/4 lettres suivantes font référence à la famille de toxine : CTX pour conotoxine, TRTX pour toxine ICK.

-La dernière partie concerne l'organisme dans lequel la toxine a été isolée : cMila et MilVa pour *Conus miliaris*, Por1a pour *Poecilotheria ornata*. Le c minuscule correspond à 'cyclique'.

Ces toxines correspondent aux peptides (**Tableau 3**) :

-P014565: A-CTX-cMila : CHFVVCP

-P010343: A-CTX-MilVa : LQTHWNKRCCPRRPVCCFP

-P017577: A-TRTX-Por1a : CRRFWGGCSRSDCCKHLSCKRKWPNICL

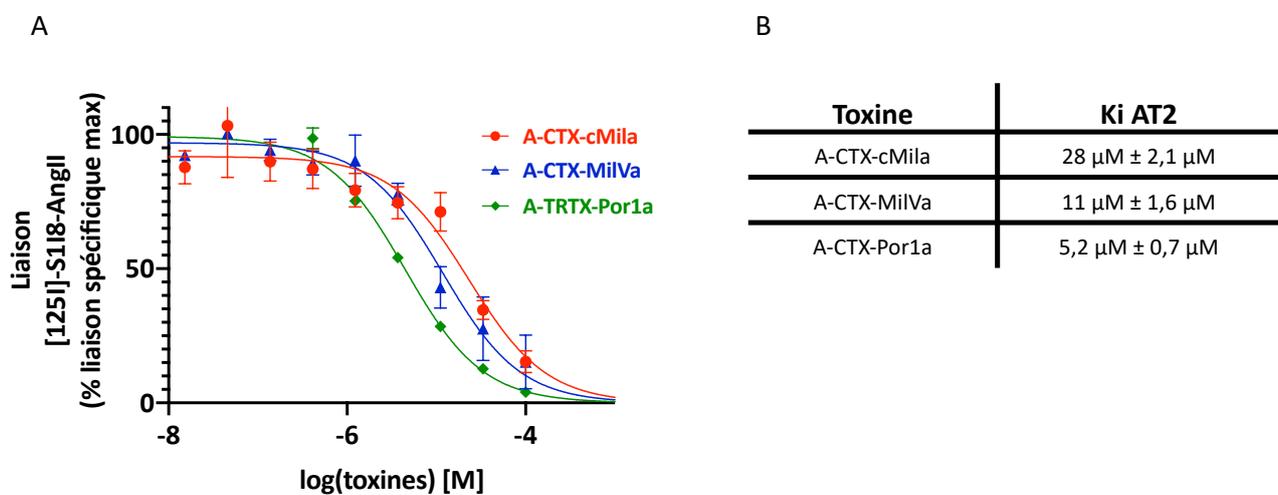
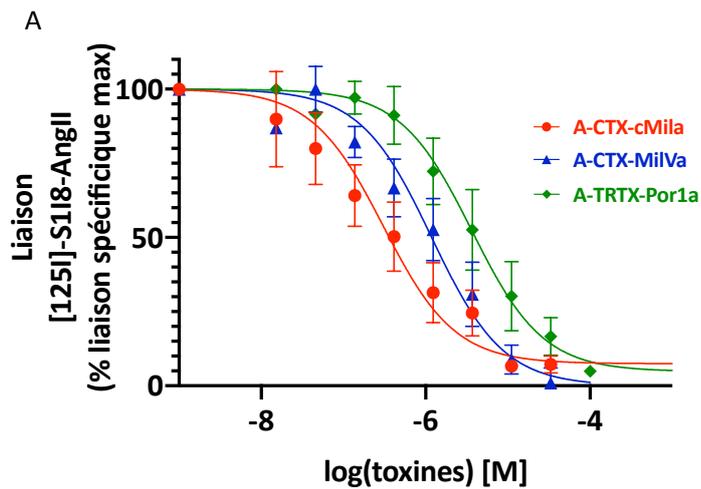


Figure 48: Caractérisation de la liaison des toxines sur le récepteur AT2. (A) Courbes de liaison par compétition de 125 I-Sar1, Ile8-AngII sur des membranes contenant les récepteurs AT2 en présence de A-CTX-cMila, A-CTX-MilVa, A-TRTX-Por1a. Les données sont exprimées en % de liaison spécifique de 125 I-Sar1, Ile8-AngII en l'absence de toxine. Les valeurs sont des moyennes (%) \pm SEM (n = 3 à 5). (B) Tableau récapitulatif des Ki pour les 3 toxines testées sur le récepteur AT2. Les valeurs sont des moyennes (%) \pm SEM (n = 3 à 5).

Afin d'étudier leur sélectivité de cible, ces toxines ont aussi été testées sur le récepteur AT1, qui présente plus de 30% d'homologie de séquence avec le récepteur AT2 et partage le même ligand endogène. Comme le montrent les courbes de compétition, A-CTX-MilVa et A-TRTX-Por1a se lient aussi au récepteur AT1 avec des affinités micromolaires comparables à celles mesurées sur le récepteur AT2 (**Figure 49**).

Cependant, de manière intéressante, A-CTX-cMila montre une affinité 100 fois plus importante pour le récepteur AT1 que AT2, avec un Ki d'environ 300 nM pour le récepteur AT1.



B

Toxine	Ki AT1
A-CTX-cMila	0,32 μ M \pm 0,14 μ M
A-CTX-MilVa	1,4 μ M \pm 0,2 μ M
A-CTX-Por1a	6,0 μ M \pm 2,8 μ M

Figure 49: Caractérisation de la liaison des toxines sur le récepteur AT1. (A) Courbes de liaison par compétition de 125 I-Sar1, Ile8-AngII sur des membranes contenant les récepteurs AT1 en présence de A-CTX-cMila, A-CTX-MilVa, A-TRTX-Por1a. Les données sont exprimées en % de liaison spécifique de 125 I-Sar1, Ile8-AngII en l'absence de toxine. Les valeurs sont des moyennes (%) \pm SEM (n = 3 à 5). (B) Tableau récapitulatif des Ki pour les 3 toxines testées sur le récepteur AT1. Les valeurs sont des moyennes (%) \pm SEM (n = 3 à 5).

2.4 CONCLUSION – DISCUSSION

2.4.1 MISE EN PLACE DE TESTS DE LIAISON SUR LES RECEPTEURS MAS ET MRGD

Le but initial était de cribler la banque de toxines Venomics afin d'identifier des ligands des récepteurs Mas et MrgD. Pour cela nous avons choisi d'utiliser un test qui repose sur le principe de compétition entre un ligand marqué et les compétiteurs testés pour la liaison au récepteur cible : si les compétiteurs se fixent sur le récepteur, nous devons observer une diminution de la liaison du ligand marqué. Pour que cette approche soit applicable, il faut disposer d'un ligand marqué et de cellules exprimant le récepteur d'intérêt. Nous avons synthétisé de nombreux ligands des récepteurs Mas et MrgD (radiomarqués ou fluorescents) et exprimé les récepteurs dans des cellules HEK293T. Malheureusement, aucun des tests de liaison que nous avons réalisés n'a permis de détecter une liaison spécifique des ligands synthétisés sur les récepteurs Mas et MrgD.

Nous avons axé nos efforts sur la mise en place de tests de liaison avec des ligands radioactifs ou fluorescents, en tentant d'optimiser les conditions, de trouver le meilleur ligand, de s'assurer de la bonne fonctionnalité du récepteur. Comme de nombreuses équipes, nous avons aussi été confrontés à ce problème : dans notre modèle d'étude nous n'avons pas observé de liaison de l'Ang1-7 (ni d'autres peptides angiotensines) sur le récepteur Mas, ni de liaison de l'alamandine (ni d'autres peptides angiotensines) sur le récepteur MrgD. Nous sommes parvenus à cette conclusion à la fois grâce à l'utilisation de ligands radioactifs (^{125}I -Ang1-7 et ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII) et de ligands fluorescents.

Quelles hypothèses ?

Il est fort possible que l'Ang1-7 ne soit tout simplement pas le ligand préférentiel du récepteur Mas et que les effets observés *in vivo* soient expliqués par :

L'Ang1-7 ne serait effectivement pas un ligand de Mas

L'idée que l'Ang1-7 est le ligand préférentiel du récepteur Mas a été proposée à la suite d'études sur des modèles *ex vivo* et *in vivo*. En effet, la plupart des effets observés chez l'animal après administration d'Ang1-7 sont absents chez le modèle KO Mas, argument le plus convaincant en faveur de l'Ang1-7 comme ligand du récepteur Mas (Wiemer et al., 2002).

Une seule équipe, Santos et al., a mis en évidence la liaison de l'Ang1-7 à Mas *in vitro*. Ils ont montré que la ^{125}I -Ang1-7 se liait à Mas avec une haute affinité ($K_d = 0,83 \text{ nM}$) dans des cellules CHO

transfectées surexprimant Mas. De plus, la liaison du radioligand était inhibée par l'Ang1-7 et l'antagoniste de Mas A-779 avec une affinité de l'ordre du nM. Cependant, l'inhibition de la liaison de ¹²⁵I-Ang1-7 n'est pas totale, on observe un maximum d'inhibition de 60% à partir de 1 μM d'Ang1-7 indiquant que la liaison spécifique de la ¹²⁵I-Ang1-7 n'est que de 40% de la liaison totale. Par ailleurs, les auteurs observent une très faible liaison totale d'environ 60 fmol/mg (Santos et al., 2003). Ces conditions expérimentales ne sont de toute façon pas favorables à la mise en place d'un test de criblage.

L'interaction directe entre Ang1-7 et le récepteur Mas est très controversée et n'a pas été définitivement démontrée. De nombreuses équipes ont tenté de caractériser la liaison de l'Ang1-7 sur Mas, en vain. Par ailleurs, des travaux suggèrent que l'Ang1-7 ne serait pas le ligand préférentiel du récepteur Mas (Gaidarov et al., 2018; Stoyell-Conti et al., 2021; Tirupula et al., 2014). Gaidarov et al. vont même jusqu'à intituler leur étude "Angiotensin (1-7) does not interact directly with MAS1, but can potentially antagonize signaling from the AT1 receptor".

Une liaison de l'Ang1-7 au récepteur AT1 ?

Gaidarov et al. ont aussi montré que l'Ang1-7 avait plutôt un effet antagoniste sur le récepteur AT1 sans aucun effet sur le récepteur Mas (Gaidarov et al., 2018). Teixeira et al. ont aussi montré que l'Ang1-7 est un ligand du récepteur AT1, déplaçant la liaison de l'³H-AngII avec un Ki de plus de 200 nM. Ils ont même montré un effet agoniste biaisé β-arrestine sur le récepteur AT1 sans aucun effet sur la voie Gq de AT1 (Teixeira et al., 2017).

Une hétérodimérisation avec un autre récepteur/partenaire ?

Il est possible que ces récepteurs Mas aient besoin d'un partenaire pour médier leurs actions et que les effets *in vivo* observés soient expliqués par une hétérodimérisation avec un autre récepteur. Il a été suggéré en effet que Mas pouvait former des hétérodimères notamment avec les récepteurs AT1 et AT2 (Lyngsø et al., 2009; Patel and Hussain, 2018). Cela pourrait expliquer les effets contrebalançant ceux dus à l'activation de AT1, par action synergique avec le récepteur AT2 et/ou par un mécanisme agoniste biaisé β-arrestine sur le récepteur AT1 évoqué ci-dessus.

Une liaison due à un autre métabolite des peptides angiotensines ?

Les peptides angiotensines dérivés de l'AngII sont multiples. Il est aussi possible que les effets des récepteurs Mas et MrgD soient plutôt médiés par un peptide métabolite autre que l'Ang1-7 et l'alamandine respectivement. En effet, comme montré dans l'introduction, de part leur nature

peptidique ces angiotensines peuvent être clivées par des protéases. *In vivo*, il est donc possible que ces peptides agissent différemment/indirectement car ils seraient métabolisés en d'autres peptides angiotensines. Ainsi, les effets montrés *in vivo* sur des souris KO Mas ou MrgD ne seraient pas visibles *in vitro*. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il a été montré que l'Ang1-7 se fixe sur des métalloprotéases (Stoyell-Conti et al., 2021) et pourrait donc être substrat de ces enzymes.

Pour le récepteur MrgD, personne n'a véritablement montré la liaison de l'alamandine sur le récepteur. Néanmoins, comme pour Mas, les effets physiologiques de l'alamandine et de MrgD ont été observés chez le modèle murin, sans pouvoir mettre en évidence de liaison effective de l'alamandine sur MrgD *in vitro* (Qaradakhli et al., 2016).

2.4.2 CRIBLAGE DE TOXINES SUR LE RECEPTEUR AT2

Nous n'avons pas pu mettre en place le criblage de toxines sur le récepteur Mas, ni par l'utilisation de ligand fluorescent ni de radioligand. En revanche, nous avons pu cribler la banque Venomics de 900 toxines sur le récepteur AT2 par test de compétition avec la ¹²⁵I-Sar1, Ile8-AngII.

Ce criblage a permis de mettre en évidence 3 toxines aux affinités micromolaires pour le récepteur AT2. Ces trois toxines se lient également au récepteur AT1, 2 d'entre elles ont une affinité micromolaire pour ce récepteur et la troisième possède une affinité submicromolaire.

Ces toxines sont :

- **A-TRTX-Por1a** : Elle est issue de l'araignée *Poecilotheria ornata* et a un K_i de 5,2 μ M pour AT2 et de 6,0 μ M pour AT1. Sa séquence CRRFWGGCSRDSDCCKHLSCKRKWPNICL de 29 acides aminés contient 6 résidus Cys permettant la formation de 3 ponts disulfure. La disposition des cystéines est classiquement la signature d'une toxine de type ICK (Inhibitory cysteine knot), très répandues et caractérisées par la présence du motif -C-C-CC-C-C- (ponts I-IV ; II-V ; III-VI). Les toxines ICK sont généralement composées de 23-35 acides aminés, se trouvent chez de nombreux animaux venimeux, araignées, scorpions, cônes et anémones de mer, et sont principalement associées à l'inhibition des canaux ioniques voltage-dépendants. La toxine N-TRTX-Preg1a, déjà caractérisée au laboratoire, possède aussi une structure de type ICK et cible les sous-types du récepteur à la mélanocortine MC1R, MC3R, MC4R et MC5R (Reynaud et al., 2020). A notre connaissance, A-TRTX-Por1a et N-TRTX-Preg1a sont les seules toxines ICK décrites qui ciblent des RCPG.

- **A-CTX-MilVa** : Elle est issue du cône marin *Conus miliaris* et a un Ki de 11 μM pour AT2 et de 1,4 μM pour AT1. Elle contient 19 acides aminés dont 4 résidus Cys. Sa séquence LQTHWNKRCCPRRPVCCFP montre 2 paires de cystéines vicinales pouvant former 2 ponts disulfure, motif structural peu fréquent. C'est le motif CC-C-C qui est le plus courant dans cette classe de conotoxines. Néanmoins le motif CC-CC contient des membres appartenant à la superfamille T, comme la $\tau\text{-CnVa}$ (ECCHRQLLCCLRFV) interagissant avec les récepteurs de la somatostatine mais qui n'a pas d'homologie de séquence avec A-CTX-MilVa (Petrel et al., 2013).

- **A-CTX-cMila** : Elle est aussi issue du cône *Conus miliaris*. Son Ki pour AT2 est de 28 μM et pour AT1 de 300 nM. Elle est donc environ 100 fois plus affine pour le récepteur AT1, présentant ainsi une légère sélectivité envers AT1. C'est une conotoxine cyclique de seulement 7 acides aminés dont 2 Cys, ce qui en fait une toxine cyclique (CHFWVCP). La nature cyclique de A-CTX-cMila n'est pas commune dans la famille des conotoxines et se trouve seulement dans les familles des contryphans qui ciblent des canaux ioniques et les conopressines qui ciblent la famille des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine.

- ⇒ Nous avons donc découvert les 3 premières toxines ciblant les récepteurs de l'AngII, AT1 et AT2. Ces toxines n'ont pas d'homologie de séquence avec d'autres peptides connus et leur séquence n'est renseignée dans aucune base de données publique.
- ⇒ Après avoir caractérisé en liaison ces toxines, il est nécessaire de déterminer leur mode d'action sur les récepteurs cibles, mais pour cela, une production à plus grande échelle est nécessaire.

3 Résultats : Production des toxines

3.1 PRODUCTION DE PEPTIDE LINEAIRE PAR SPPS

Principe général :

La synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) a été développée en 1963 par Merrifield lui offrant le prix Nobel de chimie en 1984 (Merrifield, 1963). La synthèse des peptides s'effectue en ajoutant un à un chaque acide aminé (AA) et l'élongation de la chaîne peptidique se fait par création d'une liaison amide entre l'acide carboxylique d'un AA à greffer et la fonction amine de l'AA greffé, c'est-à-dire de l'extrémité C-ter vers l'extrémité N-ter du peptide final. Elle s'effectue sur support solide : le carboxylate du premier acide aminé est greffé sur une résine. Nous utilisons la stratégie Fmoc (9-fluorénylméthoxycarbonyle). Dans ce cas, la fonction NH_2 de l'acide aminé à greffer est protégée par un groupement Fmoc, n'autorisant ainsi que la réaction entre l'amine terminale de l'acide aminé greffé au peptide au cycle précédent et l'acide carboxylique terminal activé de l'acide aminé à greffer. Les fonctions réactives des chaînes latérales sont aussi protégées pendant toute la synthèse. Cette synthèse par stratégie Fmoc repose sur l'orthogonalité entre ce groupement Fmoc, labile en conditions basiques, et les groupements protecteurs des chaînes latérales, labiles en conditions acides. La synthèse va donc s'effectuer par alternance d'étapes de déprotection du Fmoc de l'AA greffé, activation de l'acide carboxylique de l'AA à greffer, couplage de l'AA sur la chaîne déjà existante, suivies d'un clivage du dernier groupement Fmoc. A l'étape finale, les groupements protecteurs des chaînes latérales ainsi que le lien à la résine seront déprotégés libérant ainsi le peptide synthétisé (**Figure 50**). Les détails des étapes de la SPPS sont donnés en annexe.

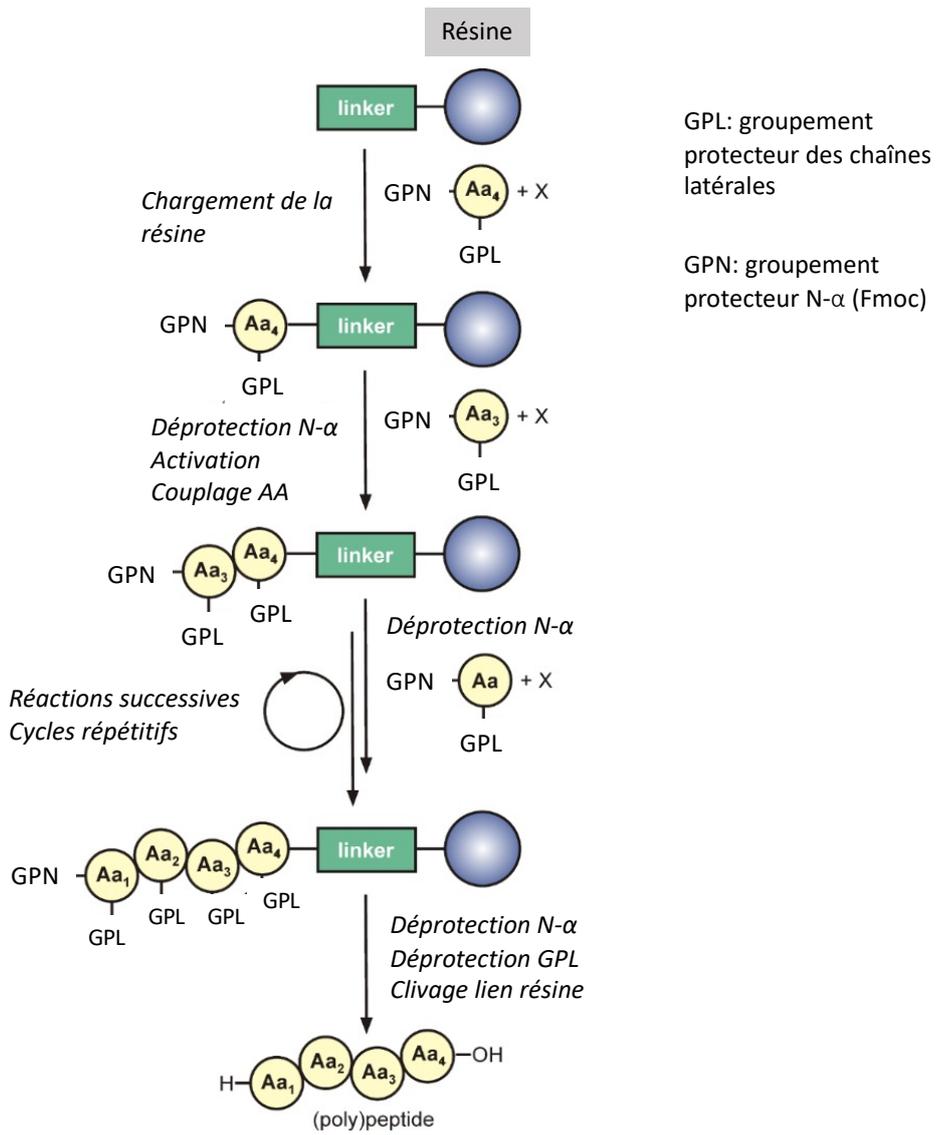


Figure 50: Synthèse peptidique sur phase solide.

Résultats :

Les 20 peptides issus du criblage ont été synthétisés au laboratoire en vue de l'analyse de leurs caractéristiques pharmacologiques. Nous détaillons ici la production des 3 toxines sélectionnées à l'issue de cette analyse, la production des 17 autres peptides initialement choisis ayant été conduite de la même façon.

Nous avons pour objectif de caractériser pharmacologiquement ces 3 toxines. Pour cela, il est nécessaire de les synthétiser en quantité importante pour effectuer des tests pharmacologiques. Le **Tableau 4** récapitule les séquences peptidiques des 3 toxines issues du criblage sur le récepteur AT2 que nous avons produites chimiquement.

Toxine	Séquence	Nombre de ponts disulfure	Espèce
A-CTX-cMila	CHFWVCP	1	<i>Conus miliaris</i>
A-CTX-MilVa	LQTHWNKRCCPRRPVCCFP	2	<i>Conus miliaris</i>
A-TRTX-Por1a	CRRFWGGCSRDSDCCKHLSCKRKWPNICL	3	<i>Poecilotheria ornata</i>

Tableau 4 : Caractéristiques des 3 toxines produites.

Nous avons réalisé la synthèse des toxines sur phase solide sur un synthétiseur de peptides automatisé « Prelude » (Gyros) à une échelle de 25 µmoles par réacteur de synthèse, avec une résine Wang pré-greffée avec le premier AA de la séquence, en répétant chaque étape de couplage d'AA 2 fois (2x10 min ; 10 éq AA et 10 éq HCTU). Pour chaque toxine, le peptide brut de synthèse obtenu est analysé par LC-MS afin d'identifier le pic correspondant au peptide d'intérêt. Ce peptide est ensuite purifié par HPLC (en phase inverse) et son identité et sa pureté contrôlées par HPLC analytique (en phase inverse) et par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les chromatogrammes de purification, ainsi que les analyses LC-MS du produit brut de synthèse sont répertoriés en annexe. Tous les chromatogrammes et spectres sont représentatifs de tous les lots produits.

La toxine A-CTX-cMila est un peptide de 7 AA. La synthèse de la forme linéaire s'est déroulée sans difficulté (*cf* annexe 4). A partir d'une quantité initiale de résine de 25 µmoles, nous obtenons en moyenne 9 mg (10 µmoles) de peptide linéaire purifié soit 40% de rendement. La forme linéaire du peptide élue à 33% d'ACN (**Figure 51A**). L'analyse du produit final par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF montre une masse unique expérimentale $[M+H]^+$: 891,2507 (**Figure 51B**) correspondant au peptide linéaire (M théorique = 890,346 Da).

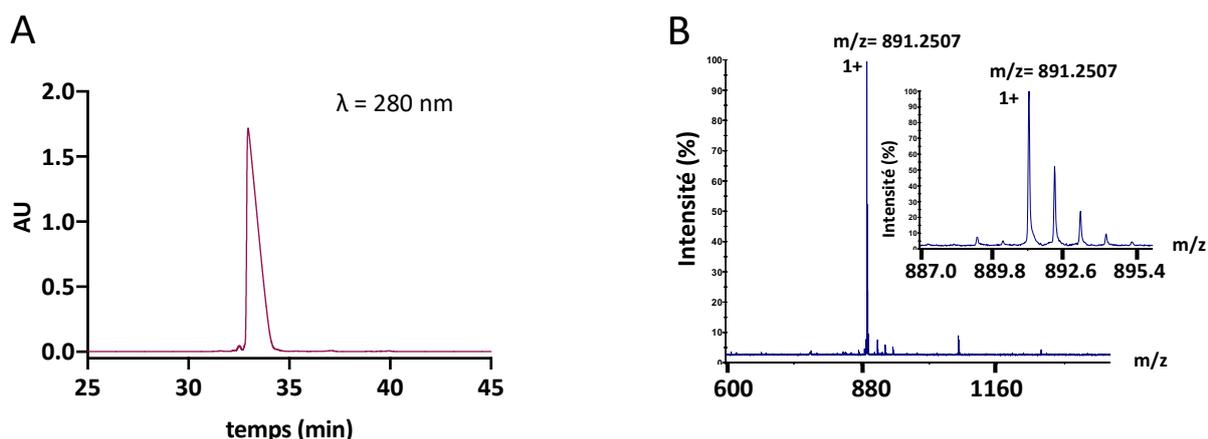


Figure 51 : Contrôle qualité de la forme linéaire de A-CTX-cMila. (A) HPLC analytique du produit linéaire purifié. Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 µm 4,6 x 150 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min. (B) Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du produit linéaire purifié. La masse notée correspond à la masse monoisotopique. L'encart est un zoom sur le massif isotopique correspondant à la masse majoritaire. AU : absorbance unit.

La toxine A-CTX-MilVa est un peptide de 19 AA. L'analyse LC-MS du produit brut de synthèse montre la présence très majoritaire du produit linéaire (*cf* annexe 5). Après purification, nous obtenons en moyenne 21 mg (9 µmoles) de peptide linéaire purifié soit 36% de rendement, à partir d'une quantité initiale de résine de 25 µmoles. La forme linéaire du peptide élue à 31,5% d'ACN (**Figure 52A**). L'analyse du produit final par MALDI-TOF montre une masse unique expérimentale $[M+H]^+$: 2344,0674 (**Figure 52B**) correspondant au peptide linéaire (M théorique = 2343,101 Da).

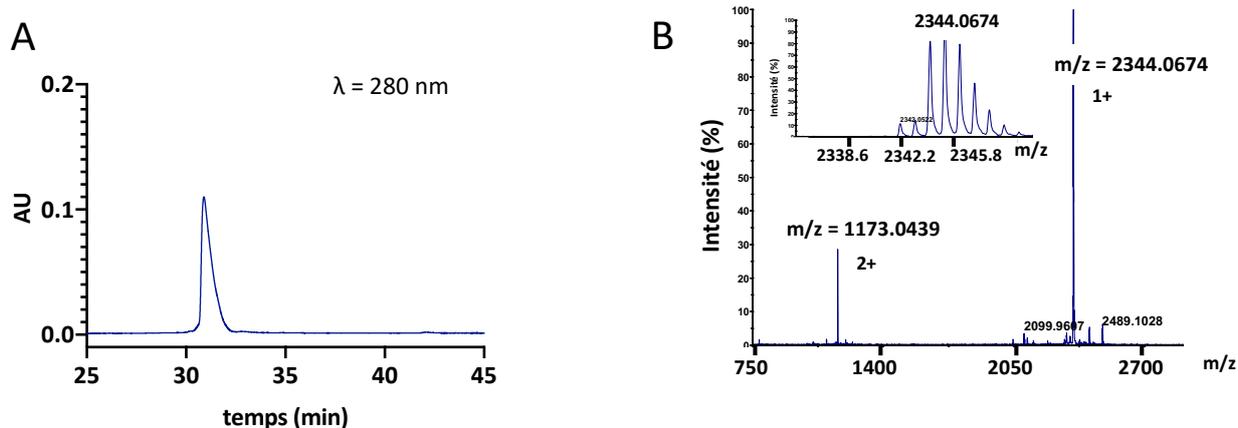


Figure 52: Contrôle qualité de la forme linéaire de A-CTX-MilVa. (A) HPLC analytique du produit linéaire purifié. Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 µm 4,6 x 150 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min. (B) Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du produit linéaire

purifié. La masse notée correspond à la masse monoisotopique. L'encard est un zoom sur le massif isotopique correspondant à la masse majoritaire. AU : absorbance unit.

La toxine A-TRTX-Por1a est un peptide de 29 AA. L'analyse LC-MS du produit brut de synthèse montre la présence majoritaire du produit linéaire avec néanmoins la présence d'impuretés de synthèse (cf annexe 6). Après purification, nous obtenons en moyenne 40 mg (12 μ moles) de peptide linéaire purifié soit 47% de rendement, à partir d'une quantité initiale de résine de 25 μ moles. La forme linéaire du peptide élue à 33,5% d'ACN (**Figure 53A**). L'analyse du produit final par MALDI-TOF montre une masse unique expérimentale $[M+H]^+$: 3458,1423 (**Figure 53B**) correspondant au peptide linéaire (M théorique = 3456,571 Da).

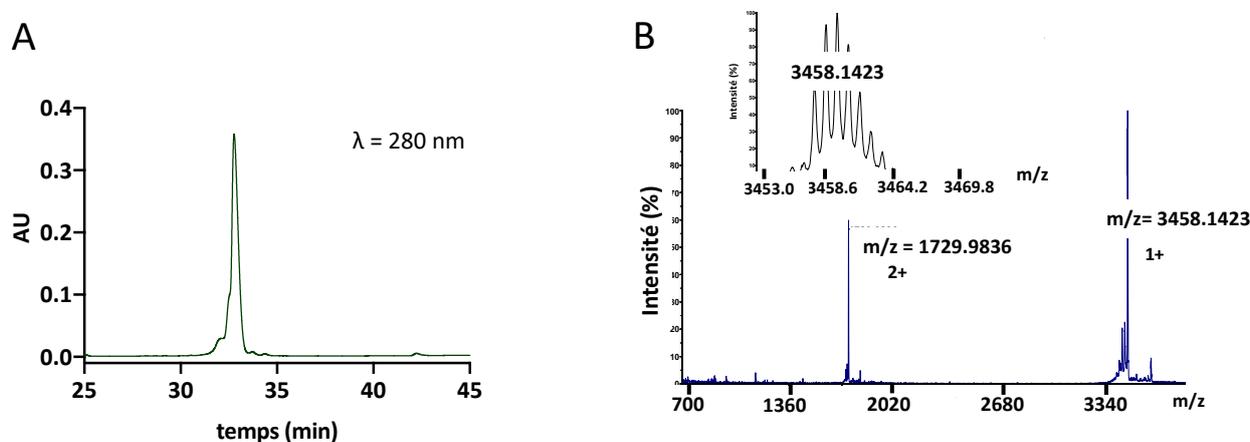


Figure 53: Contrôle qualité de la forme linéaire de A-TRTX-Por1a. (A) HPLC analytique du produit linéaire purifié. Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 μ m 4,6 x 150 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min. (B) Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du produit linéaire purifié. La masse notée correspond à la masse monoisotopique. L'encard est un zoom sur le massif isotopique correspondant à la masse majoritaire. AU : absorbance unit.

Les rendements et la pureté satisfaisants des formes linéaires des toxines A-CTX-cMila, A-CTX-MilVa et A-TRTX-Por1a permettent la poursuite de la production des 3 toxines et de passer à l'étape d'oxydation de ces formes linéaires purifiées (**Tableau 5**).

Toxine	Masse exacte monoisotopique (Da)	ϵ à 280 nm (L/mol/cm)	Rendement de la forme linéaire purifiée (%)
A-CTX-cMila	890,346	5500	40
A-CTX-MilVa	2343,101	5500	36
A-TRTX-Por1a	3456,571	11000	47

Tableau 5: Caractéristiques des peptides linéaires.

3.2 PRODUCTION DE PEPTIDE OXYDE

Principe général :

La présence de cystéines dans la séquence primaire du peptide permet la formation de ponts disulfure par oxydation de leurs fonctions thiol libres. Ces ponts engendrent une structuration tridimensionnelle finale permettant la fonctionnalité du peptide. Les 3 toxines synthétisées possèdent 1, 2 ou 3 ponts disulfure. Nous avons mis au point un protocole d'oxydation dite thermodynamique. Dans ce cas, les ponts disulfure se forment selon un appariement spontané car tous les thiols sont déprotégés en même temps : à la fin de la synthèse du peptide linéaire, les groupements trityl protecteurs des thiol des cystéines sont éliminés par la solution de déprotection à base de TFA (acide trifluoroacétique). Le tampon d'oxydation est composé de HEPES 100 mM pH 7,5 EDTA 1 mM, cystéine 1 mM, cystine 0,1 mM, ACN 20%. Le peptide linéaire préalablement purifié est ajouté (20 μ M) dans le tampon d'oxydation. La réaction d'oxydation a lieu à température ambiante pendant 48 heures.

Le couple redox cystéine-cystine présent dans le tampon permet la formation des ponts disulfure par oxydation. Pour un peptide avec 2 cystéines, nous ne pouvons former qu'un pont. Pour un peptide avec 4 cystéines nous pouvons former 2 ponts conduisant à 3 formes possibles (*cf* 1.2.2.1). Enfin, un peptide contenant 6 cystéines se réticule avec 3 ponts et peut se replier de 15 façons différentes. Avec cette technique d'oxydation nous ne contrôlons pas la/les forme(s) obtenue(s). En revanche, cette technique permet d'obtenir une forme la plus thermodynamiquement stable. Il est possible que ce soit cette forme qui se retrouve en majorité dans les conditions naturelles dans le venin de l'animal.

Résultats :

A-CTX-cMila possède 2 Cys, elle ne peut former qu'un pont disulfure et par conséquent une seule forme de la toxine peut être obtenue. L'oxydation de la toxine s'est déroulée sans difficulté. A partir d'une quantité initiale de résine de 25 μ moles, nous obtenons en moyenne 3 mg (3,3 μ moles) de peptide oxydé purifié soit 15% de rendement final. La forme oxydée est plus hydrophobe que la forme linéaire, avec un décalage de 3% d'ACN (**Figure 54A**). L'analyse du produit final par LC-MS montre une masse unique expérimentale $[M+H]^+$: 889,3 (**Figure 54B**) correspondant au peptide oxydé (M théorique = 888,346 Da).

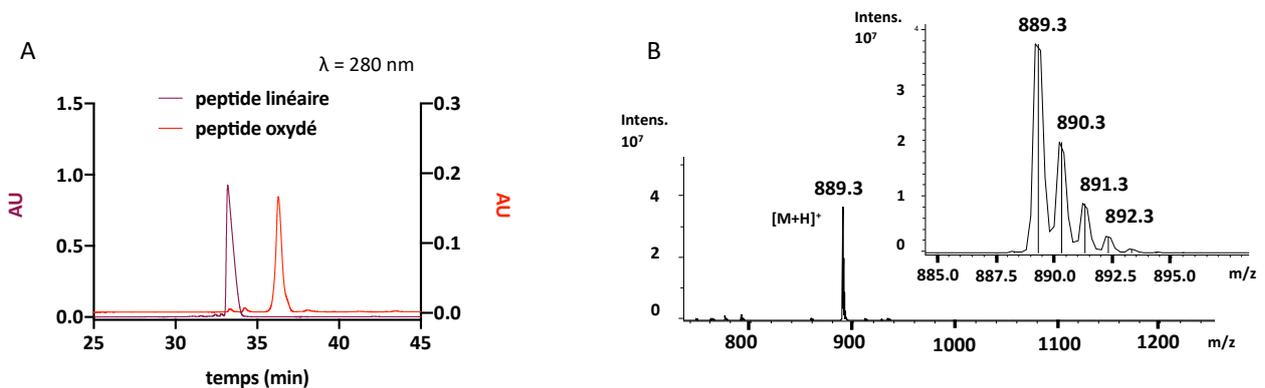


Figure 54: Contrôle qualité de la forme oxydée de A-CTX-cMila. (A) HPLC analytique du produit oxydé purifié. Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 μ m 4,6 x 150 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min. (B) Spectre de masse ESI-MS (ESI +) extrait de l'analyse LC-MS du produit oxydé purifié. AU : absorbance unit.

A-CTX-MilVa possède 2 paires de cystéines vicinales, elle se replie grâce à la formation de 2 ponts disulfure. Le profil d'oxydation de cette toxine **Figure 55A** montre que l'oxydation n'est pas totale. Le pic majoritaire (en bleu, **Figure 55A**) a été purifié malgré la présence de nombreuses impuretés de synthèse mais aussi d'autres formes de la toxine car la même masse est retrouvée (les spectres de masse sont montrés en annexe 7). A partir d'une quantité initiale de résine de 25 μ moles, nous obtenons en moyenne 4 mg (1,7 μ moles) de peptide oxydé purifié soit 6% de rendement final. La forme oxydée est plus hydrophobe que la forme linéaire, avec un décalage de 4% d'ACN (**Figure 55B**). L'analyse du produit final par LC-MS montre une masse unique expérimentale $[M+3H]^{3+}$: 781,1 (donc $[M+H]^+$: 2340,3) (**Figure 55C**) correspondant au peptide oxydé (M théorique = 2339,101 Da).

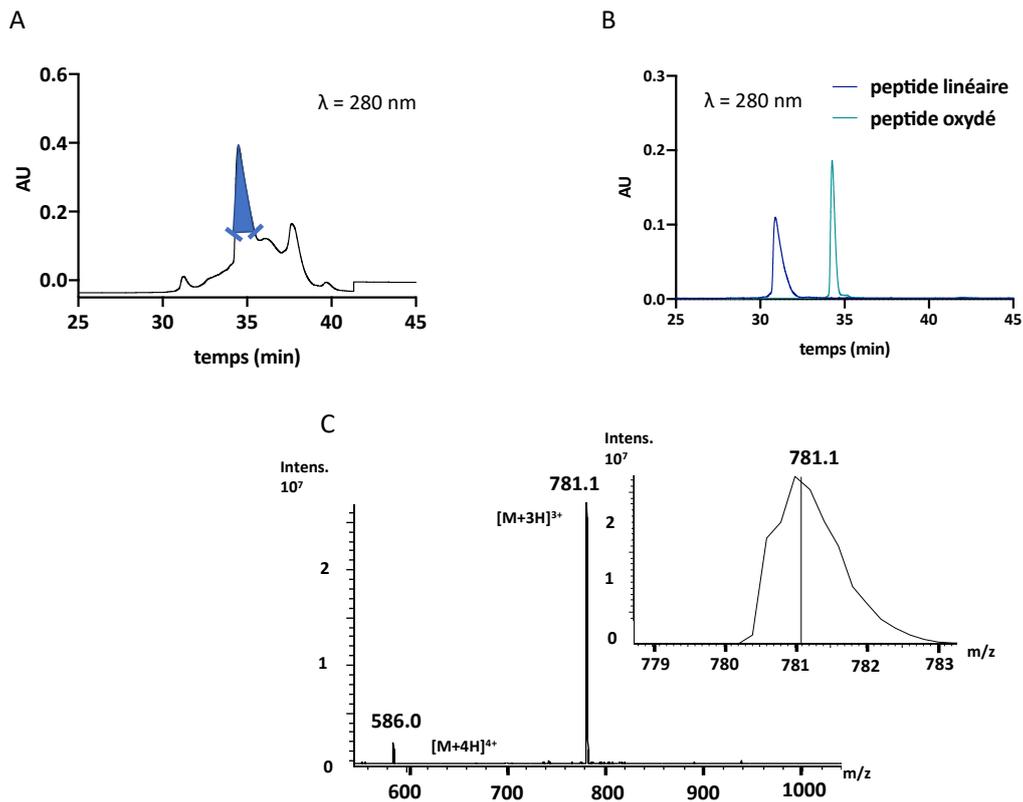


Figure 55: Contrôle qualité de la forme oxydée de A-CTX-MilVa. (A) Profil du chromatogramme de purification du produit oxydé. En bleu, pic récolté correspondant au produit final. Colonne Vydac C18 300Å 10 µm 10 x 250 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 4 mL/min. (B) HPLC analytique du produit oxydé purifié. Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 µm 4,6 x 150 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min. (C) Spectre de masse ESI-MS (ESI +) extrait de l'analyse LC-MS du produit oxydé purifié. AU : absorbance unit.

A-TRTX-Por1a possède 6 cystéines, elle se replie grâce à la formation de 3 ponts disulfure. Le profil d'oxydation de cette toxine **Figure 56A** montre que l'oxydation n'a pas été totale. Le pic majoritaire (en bleu) est conservé, mais nous observons un épaulement à l'avant de ce pic. L'analyse par MALDI-TOF de cet épaulement montre la présence d'une forme de la toxine. De même, l'analyse par MALDI-TOF des pics récoltés orange et vert montre aussi la présence d'autres formes de la toxine car la même masse est retrouvée (les détails des analyses de masse de ces pics sont donnés annexe 8). La forme oxydée est plus hydrophile que la forme linéaire, avec un décalage de 6% d'ACN mais ce pic observé en HPLC analytique est aussi moins résolu, confirmant la présence d'autres produits (**Figure 56B**). En effet, l'analyse du produit final par LC-MS montre 2 pics difficiles à séparer avec respectivement une masse unique expérimentale $[M+3H]^{3+}$: 1151,8 et 1151,9 (donc $[M+H]^+$: 3452,4 et 3452,7 respectivement) (**Figure 56C, D**) correspondant à 2 formes du peptide oxydé (M théorique = 3450,571 Da). Ainsi, l'oxydation par la méthode thermodynamique de A-TRTX-Por1a provoque la

formation non contrôlée de plusieurs formes. La pureté de la forme finale oxydée correspondant au pic majoritaire n'est pas totale et le rendement est mauvais : à partir d'une quantité initiale de résine de 25 μ moles, nous obtenons en moyenne 1 mg (0,3 μ mole) de peptide oxydé purifié soit 1% de rendement final.

Nous avons testé plusieurs conditions d'oxydation pour améliorer le rendement de synthèse et la pureté (cf annexe 9), malheureusement, aucune n'a apporté d'amélioration. De plus, nous avons collaboré avec Smartox Biotechnology, une entreprise spécialisée dans la production de toxines, notamment celles comportant plusieurs ponts, pour la synthèse de cette toxine. Ils ont aussi testé de nombreuses conditions d'oxydation (cf annexe 10), aucune n'a apporté d'amélioration majeure pour la production de la forme finale pure oxydée.

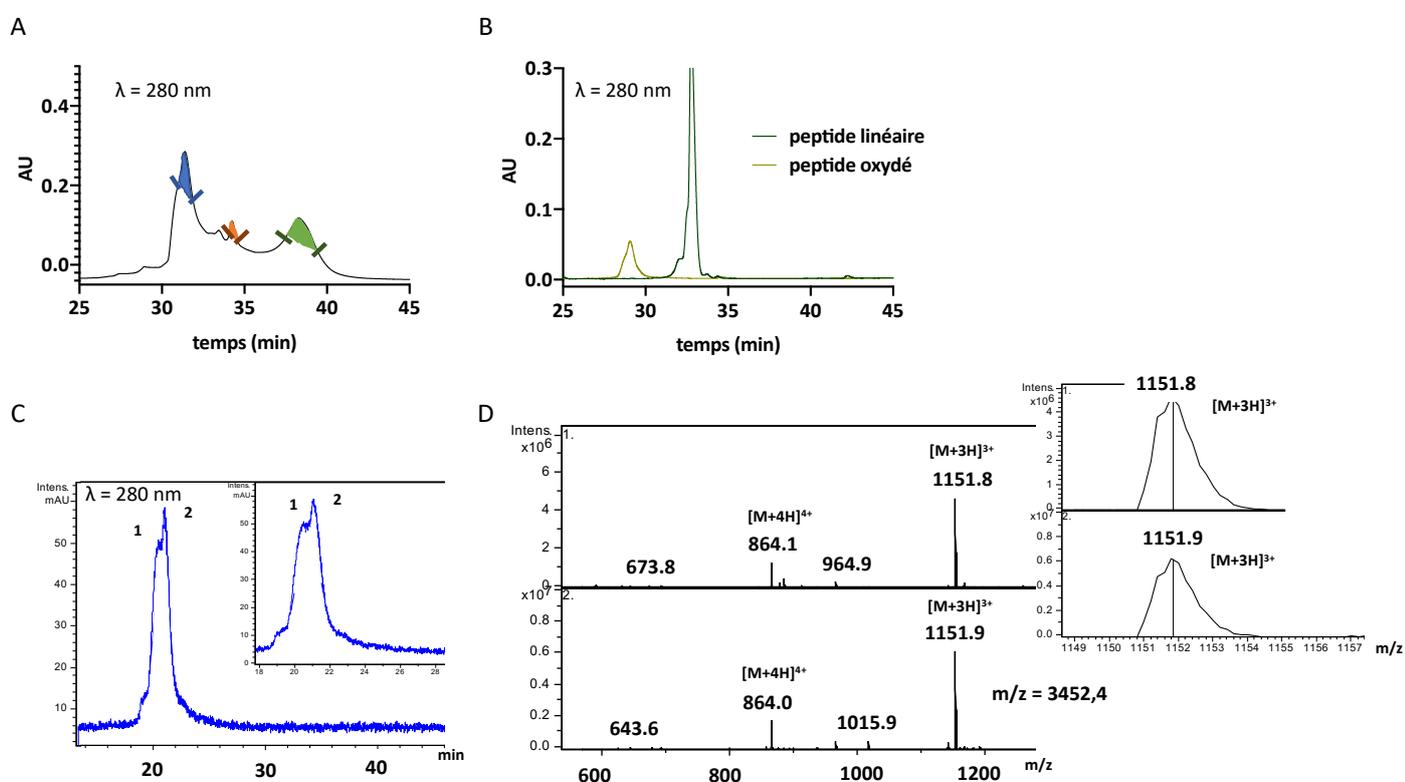


Figure 56: Contrôle qualité de la forme oxydée de A-TRTX-Por1a. (A) Profil du chromatogramme de purification du produit oxydé. En bleu, pic récolté correspondant au produit final. En orange et vert, pics correspondants à des formes minoritaires. Colonne Vydac C18 300Å 10 μ m 10 x 250 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 4 mL/min. (B) HPLC analytique du produit oxydé purifié. Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 μ m 4,6 x 150 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min. (C-D) Analyse par LC-MS du produit oxydé purifié et spectre de masse ESI-MS (ESI +) extrait de l'analyse LC-MS du produit oxydé purifié. AU : absorbance unit.

Toxine	Masse exacte monoisotopique (Da)	ϵ à 280 nm (L/mol/cm)	Rendement final (%)
A-CTX-cMila	888,346	5875	15
A-CTX-MilVa	2339,101	5875	6
A-TRTX-Por1a	3450,571	11375	1

Tableau 6: Caractéristiques des peptides oxydés.

3.3 PRODUCTION DE A-CTX-MILVA PAR PONTAGE DIRIGE

La production des toxines par oxydation spontanée permet de former *a priori* la forme thermodynamiquement la plus stable. En revanche, comme nous l'avons montré avec les toxines A-CTX-MilVa et A-TRTX-Por1a, malgré la présence d'une forme majoritaire, plusieurs formes ont été produites par cette méthode.

Tout d'abord, nous avons alors souhaité savoir qu'elle est la forme de A-CTX-MilVa produite par oxydation thermodynamique correspondant au produit majoritaire.

La toxine A-CTX-MilVa est une conotoxine contenant 2 paires de cystéines vicinales. Elle peut donc se replier de 3 façons différentes :

Une forme dite 'beads' avec des ponts entre les cystéines I-II et III-IV :



Une forme dite 'globular' avec des ponts entre les cystéines I-III et II-IV.



Une forme dite 'ribbon' avec des ponts entre les cystéines I-IV et II-III.



Pour cela, il est possible de produire cette toxine en utilisant une stratégie par pontage dirigé. C'est-à-dire que nous pouvons sélectivement imposer l'appariement des cystéines pour la formation des ponts disulfure. Produire ces 3 formes séparément permettrait d'augmenter à la fois le rendement et la pureté de synthèse, mais aussi de discriminer de possibles divergences de profils pharmacologiques entre les formes.

En pratique, nous utilisons classiquement des groupements protecteurs des cystéines trityl (trt), sensibles aux conditions acides. Si les 4 cystéines sont protégées par un trityl, la déprotection de ces groupements en présence de TFA libère les 4 thiols qui seront oxydés spontanément : nous ne maîtrisons alors pas l'appariement.

En revanche, il est possible d'utiliser d'autres groupements protecteurs des cystéines, qui pourront être clivés dans des conditions différentes que pour les groupements trityl. Nous avons utilisé 2 cystéines protégées avec le groupement acétamidométhyl (Acm) qui ne réagissent pas en présence de TFA, ainsi que 2 cystéines protégées avec le groupement trityl (**Figure 57**). L'utilisation de ces 2 types de groupements orthogonaux est un pré-requis pour la mise en place du pontage dirigé.

Nous avons produit par SPPS les 3 peptides suivants :

LQTHWNKRC(trt)C(trt)PRRPVC(Acm)C(Acm)FP

LQTHWNKRC(trt)C(Acm)PRRPVC(trt)C(Acm)FP

LQTHWNKRC(Acm)C(trt)PRRPVC(trt)C(Acm)FP

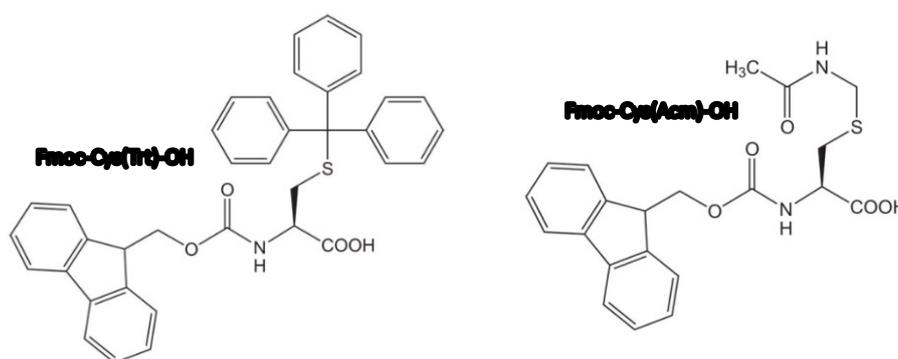


Figure 57: Représentation de cystéines protégées avec le groupement trityl ou le groupement Acm.

Le brut de synthèse est clivé de la résine en présence de TFA. Ces conditions libèrent aussi les 2 groupements trityl de 2 cystéines, sans cliver les groupements Acm. En conditions oxydantes, les 2 premiers thiols libres sont oxydés pour former le 1^{er} pont disulfure.

Ensuite, les 2 groupements Acm sont clivés et les 2 derniers thiols libérés sont oxydés en présence d'iode. Cette technique nous permet de former sélectivement un pont puis l'autre. Par cette méthode, nous avons produit les 3 formes possibles. Les chromatogrammes des étapes intermédiaires de purification sont donnés en annexe.

Après purification par HPLC, nous avons analysé en HPLC les 3 formes 'beads', 'globular', 'ribbon' et celle obtenue par oxydation spontanée. Nous observons que la forme 'beads' est la forme la plus

hydrophile, avec un décalage de 1% d'ACN avec la forme 'ribbon'. Finalement, la forme obtenue par oxydation spontanée co-élue avec la forme 'globular'. Il s'agit de la forme la plus hydrophobe, environ décalées de 4% d'ACN par rapport aux formes 'ribbon' et 'globular' (Figure 58).

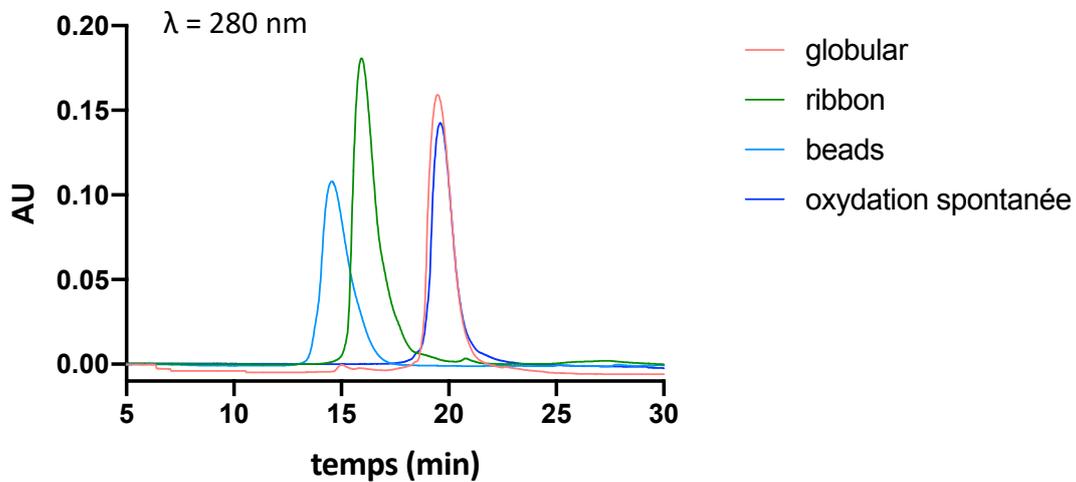


Figure 58: HPLC analytique des formes de A-CTX-MilVa produites par pontage dirigé. En rose est représentée la forme 'globular', en vert la forme 'ribbon', en cyan la forme 'beads' et en bleu marine la forme oxydée thermodynamiquement. Colonne Vydac C4 214MS5415 300Å 5 µm 4,6 x 150 mm ; 10-40 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min. AU : absorbance unit.

3.4 CONCLUSION – DISCUSSION

Pour conclure, la production de A-CTX-cMila est satisfaisante avec un rendement final de la toxine repliée de 15%. En revanche la production de A-TRTX-Por1a est difficile, comme pour de nombreuses toxines ICK. Malgré de nombreux tests d'oxydation, nous ne sommes pas capables d'isoler un produit final purifié avec un bon rendement. Enfin, la production de A-CTX-MilVa permet d'obtenir un produit final avec une pureté satisfaisante mais le rendement de synthèse est moyen (**Tableau 6**).

La A-TRTX-Por1a est une toxine ICK, donc avec 3 ponts disulfure. La structuration classique des ICK forme des ponts entre les cystéines I-IV ; II-V et III-VI. Nous ne pouvons pas présumer qu'il s'agisse de cette forme que nous obtenons lors de l'oxydation thermodynamique. Pour cela, il faudrait que nous produisions cette toxine par pontage dirigé, avec cette fois-ci l'utilisation d'un troisième groupement orthogonal. Cette technique paraît séduisante (Laps et al., 2021), mais difficile à mettre en oeuvre. Nous avons donc commencé par la mise au point de ces pontages dirigés avec la A-CTX-MilVa qui ne possède que 2 ponts disulfure.

En effet, la A-CTX-MilVa possède 2 ponts disulfure et pour discriminer quelle forme était produite lors de l'oxydation thermodynamique nous avons voulu mettre au point un protocole de pontage dirigé pour produire les différentes formes possibles de A-CTX-MilVa. Cette mise au point de la technique de production de la toxine par pontage dirigé a été délicate à mettre en place. En effet, nous avons au préalable tenté de produire les différentes formes par l'utilisation de chlorure de palladium et de dithiocarbamate (PdCl_2/DTC) pour la déprotection des groupements Acm. Selon Laps et *al.*, cette méthode permettrait d'obtenir la forme voulue avec un rendement satisfaisant, sans purification intermédiaire du produit (Laps et al., 2021). Après plusieurs essais d'optimisation, nous n'avons pas été en mesure de produire la forme 'beads' par cette méthode. De plus, les formes 'globular' et 'ribbon' étaient obtenues avec des rendements trop faibles pour nous permettre de poursuivre leur étude.

En revanche, l'utilisation d'iode pour cliver les groupements Acm permet d'obtenir les 3 formes purifiées. D'après nos résultats, nous pouvons conclure que la production de la toxine A-CTX-MilVa par oxydation spontanée permet de former la forme 'globular', repliement assez classique de nombreuses conotoxines à 2 ponts. Cette forme 'globular' est la plus hydrophobe, signe que cette structuration expose plus les acides aminés plus hydrophobes à sa surface. Nous ne pouvons pas présumer avec certitude que cette structuration est celle présente dans le venin de l'animal. Pour cela, il faudrait isoler la toxine à partir du venin brut pour la comparer aux formes produites au laboratoire. Enfin, y a-t-il une différence d'affinité selon la forme de la toxine ? La structuration a-t-elle un impact sur le mode d'action de la toxine ? A ce stade, il faudrait produire une quantité plus importante de chaque forme pour les caractériser par tests de liaison et de fonction.

4 Résultats : Caractérisation *in vitro* de A-CTX-cMila sur le récepteur AT1

4.1 PREAMBULE

Le criblage de la banque Venomics a permis de mettre en évidence 3 toxines qui se lient au récepteur AT2 avec des affinités micromolaires. Cependant, la caractérisation *in vitro* a été menée principalement sur la toxine, A-CTX-cMila et le récepteur AT1, et ceci pour plusieurs raisons :

- (a) L'affinité de A-CTX-cMila est nettement meilleure pour le récepteur AT1 que pour le récepteur AT2 ($K_i = 0,32 \mu\text{M}$ vs. $28 \mu\text{M}$ respectivement, *cf* 2.3.4).
- (b) Même si ces 3 toxines ont été produites par SPPS puis oxydées pour former la forme finale fonctionnelle, la production de A-TRTX-Por1a et de A-CTX-MilVa a été particulièrement difficile (*cf* chapitre 3) et nous n'avons pas été en mesure d'aboutir à une caractérisation complète de ces toxines. *A contrario*, nous avons pu produire suffisamment de A-CTX-cMila pour effectuer des tests pharmacologiques.
- (c) La mise en place de tests pharmacologiques pour l'étude de AT2 n'a pas été concluante. Nous avons tenté, sur des systèmes cellulaires hétérologues, plusieurs expériences pour mettre en évidence certaines voies de signalisation intracellulaires sans obtenir de résultats probants. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 5.

La caractérisation pharmacologique de A-CTX-cMila sur le récepteur AT1 a fait l'objet d'une publication dans International Journal of Molecular Sciences.

Van Baelen, A.-C.; Iturrioz, X.; Chaigneau, M.; Kessler, P.; Llorens-Cortes, C.; Servent, D.; Gilles, N.; Robin, P. Characterization of the First Animal Toxin Acting as an Antagonist on AT1 Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2330. <https://doi.org/10.3390/ijms24032330>

Cette publication constitue le cœur de ce chapitre.

4.2 PRINCIPE DES METHODES

Dosage de seconds messagers par HTRF

Dosage d'IP1

Le test de dosage développé par Cisbio permet de détecter l'IP1 qui est un métabolite stable de l'IP3, lui-même non détectable, issu de la voie de la $G\alpha q$ /PLC. Le test implique les réactifs suivants : un anticorps anti-IP1 marqué au cryptate de Tb^{2+} (donneur d'énergie) et de l'IP1 couplé à d2 (accepteur d'énergie). Ce principe repose sur la méthode de l'HTRF (cf 2.2.1). Le rapprochement spatial entre l'IP1 marqué et l'anticorps anti-IP1 marqué entraîne un transfert d'énergie qui sera détecté. Si le récepteur activé est couplé $G\alpha q$, l'IP1 produit par la cellule est en compétition avec l'IP1 marqué au d2 pour la liaison à l'anticorps anti-IP1 marqué au cryptate. Il y aura alors baisse du signal de FRET.

Dosage d'AMPC

L'activation d'un RCPG couplé $G\alpha s$ par un agoniste conduit théoriquement à l'activation de l'adénylate cyclase et par voie de conséquence à l'augmentation du niveau d'AMPC dans les cellules. Si le récepteur étudié est couplé $G\alpha s$, l'ajout d'un ligand agoniste va augmenter les taux d'AMPC. La quantification de l'AMPC est réalisée grâce à un kit de dosage par HTRF de la même façon que pour le dosage d'IP1.

Dosage de pERK

Le test Phospho-ERK (Thr202/Tyr204) développé par Cisbio permet de mesurer ERK lorsqu'il est phosphorylé aux positions Thr202/Tyr204. Le test utilise 2 anticorps marqués : l'un avec un fluorophore donneur, l'autre avec un accepteur. Le premier anticorps est sélectionné pour sa liaison spécifique au motif phosphorylé sur la protéine, le second pour sa capacité à reconnaître la protéine sur un autre épitope indépendamment de son état de phosphorylation. La phosphorylation de ERK provoque la formation d'un complexe immun avec les 2 anticorps fixés sur la protéine phosphorylée rapprochant ainsi le fluorophore donneur à proximité de l'accepteur, générant ainsi un signal de FRET. Son intensité est directement proportionnelle à la concentration de protéine phosphorylée présente dans l'échantillon.

Phosphorylation d'ERK1/2 par western-blot

L'analyse par western-blot permet de détecter la protéine ERK phosphorylée et non phosphorylée grâce à des anticorps anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204) et anti-ERK1/2 total. Les anticorps secondaires utilisés sont conjugués à des fluorophores émettant à 680 nm (ERK total) et 800 nm

(phosphoERK) permettant leur détection simultanée avec un imageur de type Odyssey. Les images sont ensuite quantifiées pour déterminer le niveau d'activation des ERK.

Utilisation de BRET : recrutement de β -arrestine 2, activation de protéines G

Principe du BRET

Le BRET (bioluminescence resonance energy transfer) est une méthode d'analyse utilisée pour la détection d'interaction protéine-protéine, basée comme le FRET sur le principe de transfert d'énergie, cette fois-ci par bioluminescence. Pour étudier l'interaction de deux protéines, l'une des protéines est fusionnée à un donneur d'énergie bioluminescent (comme la luciférase) et l'autre protéine à un accepteur d'énergie (comme la GFP). A la différence du FRET, l'émission de lumière par le donneur résulte d'une réaction enzymatique. Pour cette réaction enzymatique, le substrat utilisé est la coelentérazine-H ou la furimazine selon la nature de l'enzyme utilisée. Le substrat est oxydé par la luciférase permettant l'émission de photons entre 400 et 600 nm, avec un pic d'émission à 485 nm. L'énergie libérée sera transmise à l'accepteur par résonance si celui-ci se trouve à moins de 10 nm, il en résultera une émission de photons à la longueur d'onde d'émission de l'accepteur. La mesure de BRET est déterminée en mesurant l'intensité lumineuse émise à 2 longueurs d'ondes : 485 nm (longueur d'onde d'émission du donneur) et 530 nm (longueur d'onde d'émission de l'accepteur).

Recrutement de β -arrestine 2

Une fois les protéines G activées, le récepteur AT1 subit une phase de désensibilisation et se lie aux β -arrestines, les deux sous-types 1 et 2, recrutées du cytosol à la face intra cellulaire de la membrane. Pour mesurer le recrutement de la β -arrestine 2 nous utilisons la technique du BRET. Les cellules HEK293T sont cotransfectées avec les plasmides Rluc-8- β arrestine 2 et AT1-YFP. La YFP (yellow fluorescent protein) est le groupe accepteur d'énergie et Rluc8 (Renilla luciferase 8), groupe donneur d'énergie. Une augmentation du signal BRET est la preuve d'un rapprochement spatial entre la YFP liée au récepteur AT1 et la Rluc8 liée à la β -arrestine 2. Cette augmentation est un signe de recrutement de β -arrestine 2 lors de l'activation d'AT1.

Utilisation de biosenseurs de BRET

Cette méthode permet de mettre en évidence le couplage de protéines G après activation d'un récepteur en s'affranchissant du dosage de seconds messagers. Pour cela nous utilisons un système tripartite exprimé dans des cellules HEK293T composé du récepteur d'intérêt, de la protéine $G\alpha_i$ ou $G\alpha_o$ fusionnée à la YFP (yellow fluorescent protein) et de la Nanoluciférase (Nanoluc) fusionnée à un

peptide (mas-KB-1753) capable de se lier spécifiquement à la protéine $G\alpha$ dans sa forme activée (chargée en GTP) (Alhosaini et al., 2021). La liaison du peptide à la protéine $G\alpha$ conduit au rapprochement de la Nanoluc et de la YFP et va entraîner un transfert d'énergie et une émission de lumière par la YFP. Une augmentation du signal de BRET est alors observée proportionnellement au degré d'activation de la protéine $G\alpha$.

4.3 RESUME DES RESULTATS

Caractéristiques de liaison aux récepteurs aux angiotensines

A-CTX-cMila a d'abord été caractérisée par des études de liaisons aux récepteurs aux angiotensines. Par mesure de l'inhibition de la liaison du radioligand ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII, la toxine montre une affinité 100 fois supérieure pour le récepteur AT1 ($K_i = 0,32 \mu M$) que pour le récepteur AT2. Par cytométrie de flux sur cellules entières exprimant le récepteur AT1 ou le récepteur AT2, la toxine est capable d'inhiber la liaison de Cy5-AngII de 74% et de 75% respectivement. Enfin, les images de microscopie montrent que la toxine est aussi capable de bloquer la liaison de Cy3-AngII sur cellules CHO exprimant le récepteur AT1 ou le récepteur AT2.

Effets de la toxine sur les voies de signalisation du récepteur AT1 dépendantes des protéines G

Pour mesurer l'impact de la toxine sur la voie AT1- $G\alpha_q$ /PLC, nous avons dosé par HTRF la production d'IP1 par des cellules exprimant le récepteur AT1. Le ligand endogène AngII active cette voie (EC_{50} de 6,6 nM). La toxine au contraire bloque la production d'IP1 par l'AngII (IC_{50} de 24 μM) avec un mode d'action compétitif. L'activation des protéines $G\alpha_i3$ et $G\alpha_oA$ est mesurée grâce à l'utilisation de biosenseurs par mesure de signal de BRET en utilisant l'AngII comme agoniste (EC_{50} de 4,9 nM et 13 nM respectivement) pour ces voies de signalisation. La toxine est aussi un antagoniste compétitif sur ces 2 voies.

Effets de la toxine sur les voies de signalisation du récepteur AT1 indépendantes des protéines G

Par mesure du signal de BRET, nous avons analysé l'impact de la toxine sur le recrutement de β -arrestine 2 par le récepteur AT1. La toxine est capable de bloquer ce recrutement induit par l'agoniste AngII (EC_{50} de 1,0 nM) et montre un mécanisme d'action antagoniste compétitif (IC_{50} de 16 μM).

Effets de la toxine sur l'activation de ERK1/2

Enfin, nous avons corroboré ces résultats par mesure de l'activation de ERK1/2. En présence d'AngII, A-CTX-cMila bloque la phosphorylation de ERK1/2 et donc son activation (montré par western-blot). De plus, la cinétique d'activation de ERK1/2 par l'AngII monte un pic d'activation vers 3 min, signal se stabilisant en plateau. Ce profil cinétique est caractéristique d'une activation de ERK1/2 à la fois protéines G dépendante et β -arrestine dépendante. La toxine bloque cette activation pendant toute la durée de l'expérience, confirmant qu'elle est bien antagoniste des voies protéines G dépendantes et β -arrestine dépendante.

Dans tous les tests effectués, les résultats sont similaires entre les différents lots de synthèse de la toxine. La toxine seule ne montre pas d'effet agoniste sur aucune des voies testées.

Int. J. Mol. Sci. **2023**, *24*, 2330. <https://doi.org/10.3390/ijms24032330>

Characterization of the first animal toxin acting as an antagonist on AT1 receptor

A-C. Van Baelen, X. Iturrioz, M. Chaigneau, P. Kessler, C. Llorens-Cortes, D. Servent, N. Gilles ^{*,†} and P. Robin ^{*,†}

Université Paris-Saclay, CEA, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SIMoS, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.

* Correspondence: N.G. nicolas.gilles@cea.fr; P.R. philippe.robin@cea.fr,

† The authors are joint last authors.

Abstract: The renin angiotensin system (RAS) is one of the main regulatory systems of cardiovascular homeostasis. It is composed mainly by angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensin II receptors AT1 and AT2. ACE and AT1 are targets of choice for the treatment of hypertension whereas AT2 receptor is still not exploited due to the lack of knowledge of its physiological properties. Peptide toxins from venoms display multiple biological functions associated with varied chemical and structural properties. If Brazilian viper toxins have been described to inhibit ACE, no animal toxin is known to act on AT1/AT2 receptors. We screened a library of toxins on angiotensin II receptors with radioligand competition binding assay. Functional characterization of the selected toxin was conducted by measuring second messenger production, G-protein activation and β -arrestin 2 recruitment using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based biosensors. We identified one original toxin, A-CTX-cMila, which is a 7-residues cyclic peptide from *Conus miliaris* with no homology sequence with known angiotensin peptides nor identified toxins, displaying a 100-fold selectivity for AT1 over AT2. This toxin shows a competitive antagonism mode of action on AT1, blocking $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i3}$, $G_{\alpha oA}$, β -arrestin 2 pathways and ERK1/2 activation. These results describe the first animal toxin active on angiotensin II receptors.

Keywords: conotoxin; angiotensin; AT1; GPCR; *Conus miliaris*

1. Introduction

Venoms constitute a vast library of biochemically stable peptide toxins with particular pharmacological properties, which have evolved to provide their host with capture or defense

capabilities. It is estimated that the 200,000 species of venomous animals existing on earth could produce around 40 million toxins, whose properties are still largely unexploited [1]. Toxins are peptides often containing cysteines, giving them different cross-linking patterns and conferring various three-dimensional functional structures. They are also peptides with high selectivity and specificity for their target. In addition, the biological effects and molecular targets of many toxins present in venoms are still unknown, which explains why venom screening to identify new ligand-receptor pairs has gained momentum. Toxins have already proven their interest with the development of therapeutics [2]. For instance, one peptide derived from *Conus magus* (Ziconotide) has received FDA approval as an analgesic targeting CaV2.2 [3]. So far, only 7,000 toxins have been fully characterized, mostly on ionic channels but very few of them act on GPCR which are nevertheless the therapeutic targets of 30% of drugs currently used. GPCR-interacting toxins can be classified into 2 groups: agonist-mimicking peptides, sharing sequence and structural similarities with endogenous ligands and primarily activating receptors; and others that are structurally different from the endogenous ligands, and exhibit antagonist, allosteric or agonist mode of action [4].

The RAS is involved in the regulation of numerous biological functions, and in particular in the regulation of blood pressure [5-6]. The main axis is composed of angiotensinogen, which is converted by renin into angiotensin I and then into angiotensin II (AngII) by the angiotensin converting enzyme (ACE) [7-8]. AngII, and its downstream metabolite AngIII, are the main effectors of the system and target the GPCRs angiotensin type 1 receptor (AT1) and angiotensin type 2 receptor (AT2) [9-10]. Once activated, AT1 receptor induces several physiological effects such as vasoconstriction, increase in blood pressure, hypertrophy of cardiomyocytes and cardiac remodeling [11-12]. In addition to its actions at the cardiovascular level, AT1 activation is associated with profibrotic [13], pro-inflammatory [14] and pro-apoptotic [15] effects. Activated AT1 receptor is known to couple with G-proteins of the G α q and G α i/o families [16]. Upon activation, this receptor is also phosphorylated by GPCR kinases (GRK), enabling β -arrestin to bind to the receptor, terminating G protein-mediated signaling and leading to the receptor internalization. This β -arrestin recruitment activates specific pathways in a G-protein independent manner such as ERK1/2 activation [17-18].

The AngII/AT2 axis has general opposite effects to the AngII/AT1 axis and is described to have hypotensive and vasodilator actions [19-20]. AT2 receptor has also antifibrotic, anti-inflammatory,

neuroprotective, anti-apoptotic effects and increases natriuresis [21-22]. Recently, its anti-inflammatory action has been highlighted showing an interest in the treatment of other pathologies such as gout or arthritis in the mouse model [23-24]. AT2 receptor activation may promote eNOS activation [25]. However, even if AT2 receptor is classified as a GPCR and possesses all the GPCR common features, its effective coupling to classical G-protein dependent pathways is still a matter of debate. If some studies show its coupling to G α i protein [26-27] others show the opposite [28]. The AT2 receptor also does not interact with β -arrestins and is not internalized after stimulation by AngII [29]. These unconventional properties of the AT2 receptor could be due to its structure itself and in particular to the behavior of its C-terminal helix VIII positioned in such a way that it blocks G-protein/ β -arrestin binding sites [30]. Its functional study is still not fully explored due to the difficulty to highlight any signaling pathway.

The RAS is already the target of one toxin-derived anti-hypertensive drug, the captopril. This toxin, extracted from the venom of *Bothrops jararaca*, is an inhibitor of ACE leading to a decrease in AngII production [31]. The RAS is also the target of small organic molecules, the AT1 blockers 'sartans'. However, 30% of patients under anti-hypertensive drugs treatment are non-responders, either due to poor observance due to side effects, or due to ineffectiveness of the treatment [32]. Indeed, even today, the signaling pathways involving AT1 and AT2 receptors are not yet fully described, in particular because of the lack of pharmacological tools allowing their study. The aim of the present study is therefore to find new tools allowing the functional study of these receptors. As mentioned before, toxins might fulfill this role. Today there is very little identified toxin-GPCR couples despite the huge implication of GPCRs in the therapeutic field. Despite the existence of toxin-derived peptide inhibiting ACE, there is still no toxin identified targeting angiotensin receptors and only very few ligands selective for AT2 receptor are available [4]. Here we describe the identification and the pharmacological characterization of the first toxin acting on AngII receptors.

2. Results

2.1. Screening on angiotensin II receptors

In the aim to identify toxins targeting the AT2 receptor, part of the Venomics toxin library was screened on human AT2 receptor by competition binding assays with ¹²⁵I-Sar1-Ile8-AngII radioligand [1]. Among obtained hits, one toxin exhibited no sequence homology neither with other known toxins nor with angiotensin peptides. This toxin, named A-CTX-cMila, with A standing for 'activity on angiotensin II receptors' [33], is a 7-residues cyclic peptide (CHFWVCP) whose sequence was obtained by omics analysis of *Conus miliaris*. A-CTX-cMila is a small conotoxin containing only one disulfide bridge between Cys1 and Cys6. This cysteine pattern is one of the lesser represented for conotoxins, which often contain more than two cysteine residues and more than one disulfide bridge [34].

2.2. Chemical production of the toxin

To perform the complete functional characterization of A-CTX-cMila, the toxin was produced by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using Fmoc-based strategy [35] on a peptide synthesiser. The reduced peptide was purified by preparative HPLC prior to oxidation with an optimized protocol to form the disulfide bridge and to obtain the final functional peptide. A last step of preparative HPLC purification of the oxidized A-CTX-cMila is necessary to obtain the final product. From an initial quantity of loaded resin of 25 μ moles, 3.3 mg of final toxin is obtained, *i.e* 15% yield compared to the expected quantity of loaded resin. The final form of the peptide is surprisingly more hydrophobic with a shift of acetonitrile of 3% higher than the reduced form (Figure 1A). The analysis of the final product by LC-ESI-MS shows a unique mass at m/z 889.3 (Figure 1B) consistent with its calculated theoretical m/z of 889.3489 for oxidized A-CTX-cMila.

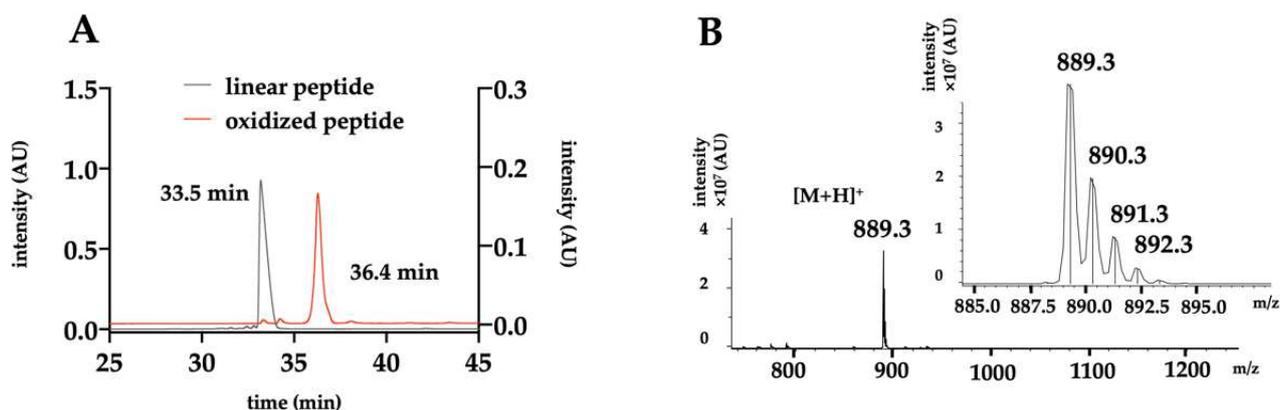


Figure 1. HPLC and mass analysis of the toxin. (A) Analytical HPLC of the linear and oxidized forms of A-CTX-cMila, with a linear gradient of acetonitrile at 1%/min. The results show superimposed UV chromatograms at 280 nm of the purified linear peptide in black (left y axis) and the purified oxidized peptide in red (right y axis). (B) ESI-MS spectrum of the purified A-CTX-cMila in positive ESI mode of ionization. The inset shows the isotopic distribution. All chromatograms and spectra are representative of all the batches produced.

2.3. Binding properties of A-CTX-cMila on angiotensin II receptors

The binding properties of A-CTX-cMila to human AT₂ receptor were determined by radioligand competition binding assay. The binding curve of ¹²⁵I-Sar1-Ile8-AngII (¹²⁵I-S118-AngII) in the presence of increasing concentrations of A-CTX-cMila shows that the toxin inhibits the binding of the radioligand in a dose-dependent manner and binds to AT₂ receptor with a K_i of 27.5 ± 2.1 μM (n = 5) (Figure 2A). AT₁ and AT₂ receptors belonging to the same phylogenetic branch and sharing the same endogenous ligands (AngII and AngIII) the binding of the toxin on AT₁ receptor was investigated. As shown in figure 2A, the toxin is also able to inhibit the binding of ¹²⁵I-Sar1-Ile8-AngII on the AT₁ receptor and exhibits 100-fold higher affinity for this receptor (K_i of 0.32 ± 0.13 μM, n = 5). To determine whether the toxin binds on living cells and on the extracellular side, the effect of A-CTX-cMila on AngII binding was then tested on intact living cells expressing AT₁ or AT₂ receptors. For this purpose, A-CTX-cMila effect on the binding of fluorescent Cy5-AngII to AT₁- or AT₂-expressing CHO cells was evaluated by flow cytometry. The results (Figure 2B) show that the non-specific labelling of cells measured in the presence of 1 μM non-labelled AngII and 20 nM Cy5-AngII is very low (7% ± 2%) compared to the total labelling observed with Cy5-AngII alone, for both receptors. In the presence of 100 μM A-CTX-cMila, the labelling of cells was also strongly reduced (74% ± 7% inhibition of the specific labelling for AT₁ and 75% ± 9% for AT₂) indicating that the toxin is able to inhibit Cy5-AngII binding on AT₁ and AT₂ receptors. To confirm the flow cytometry results, the labelling of Cy3-AngII to CHO cells expressing AT₁ or AT₂ was evaluated qualitatively by

fluorescence microscopy. The results show that after incubation for 30 min at 37 °C, Cy3-AngII staining of AT1-expressing cells appears as small dots distributed throughout the cells with no apparent membrane labelling, suggesting the internalization of Cy3-AngII in endocytosis compartments. This result is fully consistent with the well-established property of AT1 to be rapidly internalized in the cell after AngII binding. The staining of AT2-expressing cells appears diffuse and more concentrated on the cell contour consistent with a cell surface localization of the receptor, which is described not to undergo internalization upon AngII binding. In the same conditions, the addition of the toxin before Cy3-AngII, leads to an almost complete loss of the staining, meaning that the toxin inhibits the binding of Cy3-AngII on both cell types and thus prevents its internalization into the cells. These observations suggest that the toxin binding site is localized on the extracellular side of the AT1 and AT2 receptors (Figure 2C).

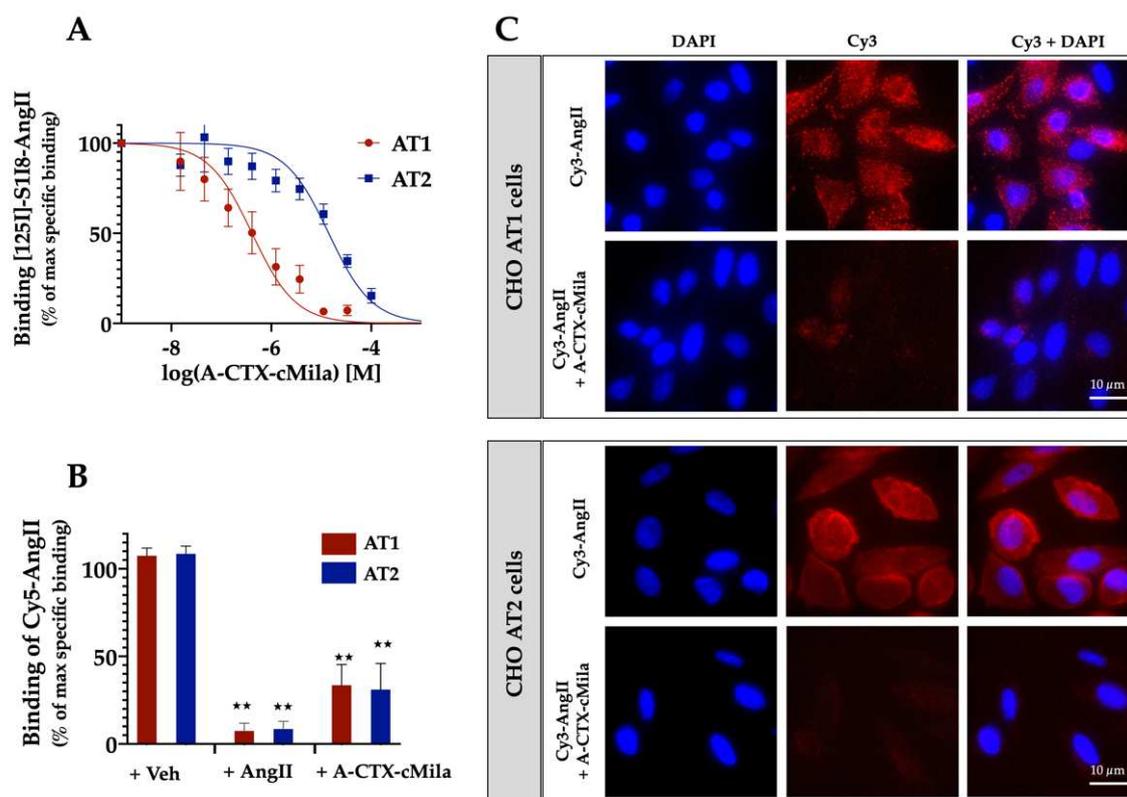


Figure 2. Binding properties of A-CTX-cMila on angiotensin II receptors. (A) Competition binding curves of ^{125}I -Sar1-Ile8-AngII on membranes of HEK293T cells expressing AT1 or AT2 receptors in presence of increasing concentrations of A-CTX-cMila. Data are expressed as % of ^{125}I -Sar1-Ile8-AngII specific binding in the absence of toxin. Values are means (%) \pm SEM (n = 5). (B) Binding of Cy5-AngII (20 nM) on CHO cells expressing AT1 or AT2 receptors in the absence or presence of A-CTX-cMila (100 μM) or AngII (1 μM). Cells were incubated with the toxin for 30 min before addition of Cy5-AngII. Binding of Cy5-AngII was analysed by flow cytometry. Values are expressed as percentage of the specific labelling and given as mean (%) \pm SEM (n = 4). (C) Labelling of CHO cells expressing AT1 or AT2 receptors by Cy3-AngII (10 nM) in the absence or presence of A-CTX-cMila (50 μM). Cells were incubated with the toxin for 30 min before addition of Cy3-AngII. Images are representative of

three independent experiments. Veh: vehicle; ** $p < 0.0001$, significantly different compared to vehicle.

2.4. Pharmacological characterization of A-CTX-cMila on AT1-mediated Gαq/PLC pathway

A-CTX-cMila binds to AT2 receptor with a poor affinity compared to AT1 receptor. Considering both the much better affinity of the toxin for AT1 receptor, and that the functional characterization of AT2 receptor is still laborious on heterologous systems, pharmacological characterization was conducted on AT1 receptor.

AT1 receptor interacts with heterotrimeric G-proteins, and especially Gαq protein, this activation leading to intracellular calcium flux and activation of protein kinases [11]. The impact of A-CTX-cMila on the Gαq/Phospholipase C (PLC) pathway after binding on AT1 receptor was assessed by measuring the production of inositol phosphates. In this aim, inositol monophosphate (IP1), the dephosphorylated product of inositol trisphosphate (IP3) that accumulates in the cell in the presence of the IP1 phosphatase inhibitor LiCl, was quantified. IP1 production is measured by homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay kits.

As expected, AngII induces IP1 production in a dose-dependent manner with an EC50 of 6.6 ± 1.1 nM ($n = 6$) (Figure 3A) and a maximal effect of 16-fold the basal level. Under the same experimental conditions, the toxin does not induce any agonist effect on this pathway (Figure 3A). In presence on 10 nM AngII, the toxin causes an inhibition of IP1 production in a dose-dependent manner, with an IC50 of 23.7 ± 4.6 μM ($n = 3$) (Figure 3B). To better characterize the antagonist mode of action, dose-response curves of AngII were performed in the presence of various concentrations of the toxin ranging from 20 to 300 μM. Results demonstrate that when the doses of toxin increase, the EC50 of AngII raises from 6.6 ± 1.1 nM to 39.0 ± 6.7 nM with 20 μM toxin, to 71.9 ± 8.1 nM with 40 μM toxin, to 154 ± 20 nM with 75 μM toxin, to 272 ± 31 nM with 150 μM toxin, to 359 ± 39 nM with 300 μM toxin ($n = 3$), without any significant change in the maximal response (Figure 3C). The Schild's representation of these values is linear with a slope of -1.2 ± 0.2 and a pA2 of 4.9 ± 0.3 ($n = 3$) (Figure 3D). The associated KB value is 17.1 ± 6.9 μM ($n = 3$). In conclusion, A-CTX-cMila behaves as a competitive antagonist on the Gαq/PLC pathway.

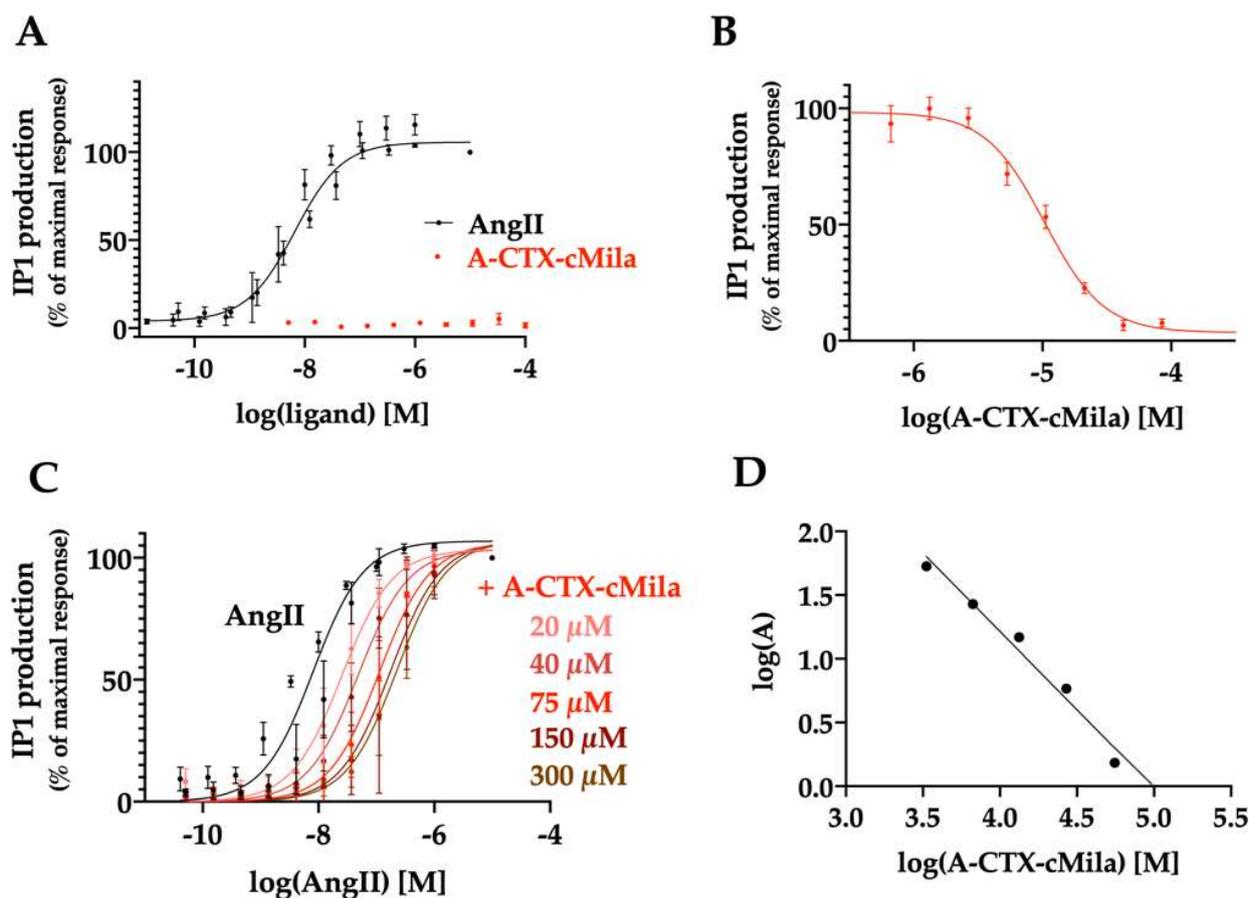


Figure 3. Competitive antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated Gαq/PLC pathway on CHO-AT1a-EGFP cells. (A) Effect of AngII (n = 6) and A-CTX-cMila on IP1 production (n = 3). Cells were incubated with increasing concentrations of AngII or the toxin for 45 min. (B) Effect of the toxin on IP1 production in presence of 10 nM AngII (n = 3). (C) Impact of different doses of toxin on the dose-dependent effect of AngII (n = 3). For (B) and (C), cells were incubated with increasing concentrations of toxin for 30 min before addition of AngII for 45 min. In (A) (B) (C) IP1 production was assessed using HTRF assay kit. Values are expressed as percentage of the maximal AngII response and are mean ± SEM. (D) Schild's regression of EC50 values deduced from the experiment shown in (C). Representation of one typical experiment among three performed.

2.5. Pharmacological characterization of A-CTX-cMila on AT1-mediated Gαi3 and GαoA pathways

AT1 receptor is also known to recruit other G-proteins such as Gαi3 and GαoA, leading to an increase of intracellular calcium release. The impact of the toxin on the activation of these G-proteins was measured using specific BRET biosensors developed by M. Maziarz et al. [36].

The pharmacological profile of A-CTX-cMila was determined on Gαi3 pathway. If the receptor activates the G-protein, the trimer Gαβγ dissociates, and the KB-1753-Nanoluc is able to recognize specifically the GTP-loaded Gα form linked to yellow fluorescent protein (YFP), leading to an increase of the BRET signal. 10 nM AngII increased the BRET signal reflecting the activation of Gαi3 protein by AngII. The kinetic study shows that this activation reaches a peak at one minute after AngII

addition (Figure 4A,B). Neither candesartan, an AT1 receptor antagonist, nor the toxin alone could induce the activation of G α i3 (Figure 4A). The activation is fully inhibited by 100 μ M of A-CTX-cMila as well as 1 μ M of candesartan (Figure 4B). Thus, the toxin has no agonist mode of action but an antagonist mode of action on this pathway. In presence of 50 nM AngII, the toxin inhibits AngII-induced BRET signal in a dose-dependent manner with a micromolar potency ($IC_{50} = 28.5 \pm 12.0$ μ M, $n = 3$) (Figure 4C). AngII induces the G α i3 activation in a dose-dependent manner with an EC_{50} of 4.9 ± 0.9 nM ($n = 3$) (Figure 4D). In presence of 150 μ M A-CTX-cMila, the AngII dose-response curve is shifted to the right, raising the EC_{50} of AngII to 468 ± 219 nM without affecting the maximal effect of AngII ($n = 3$) (Figure 4D), sign of a competitive antagonist mode of action of A-CTX-cMila on G α i3 activation.

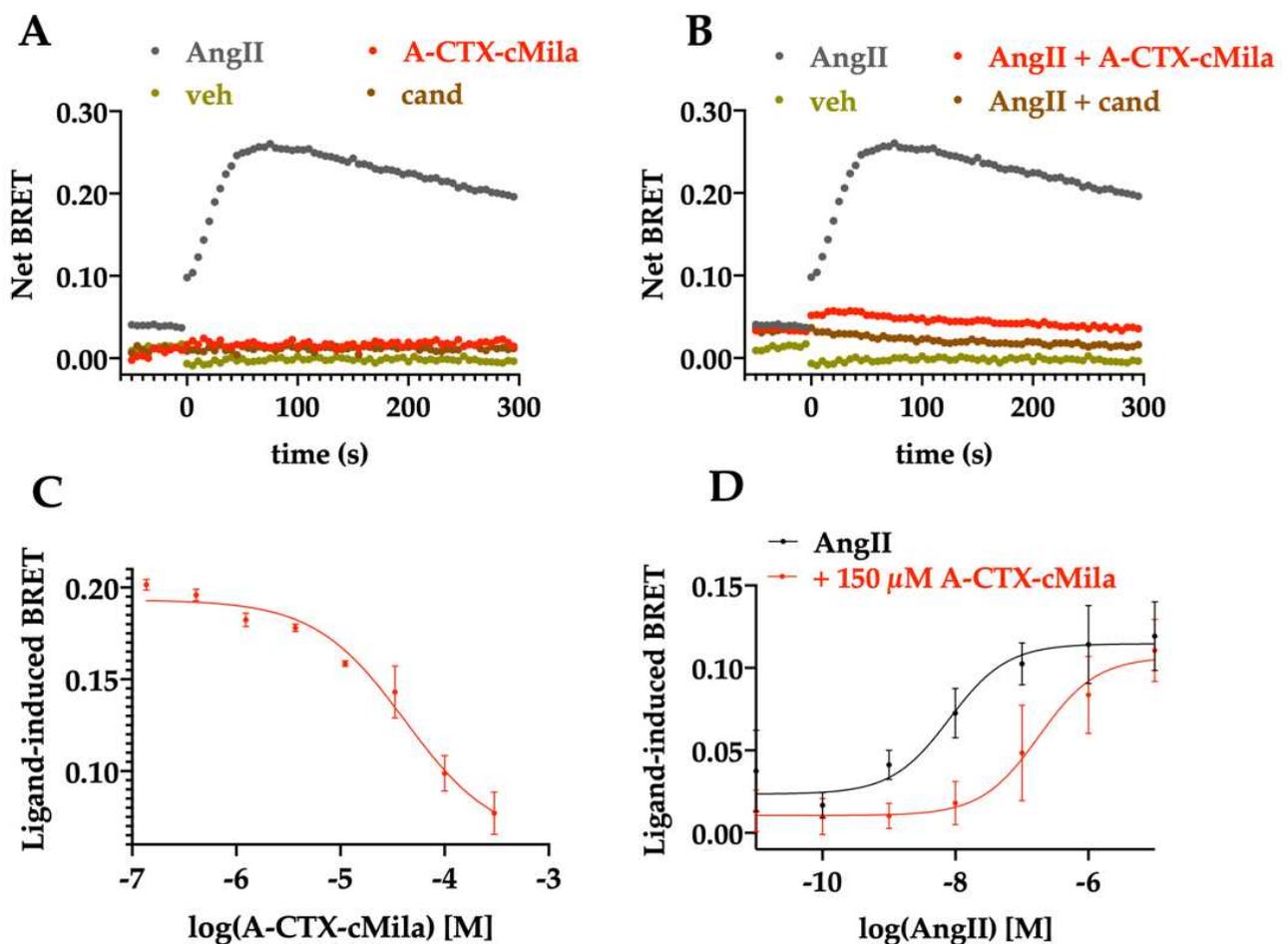


Figure 4. Competitive antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated G α i3 pathway monitored by BRET biosensors assays. HEK293T cells were transfected with plasmids encoding AT1 receptor, KB-1753-Nanoluc and G α i3-YFP proteins and processed for BRET recordings. (A,B) Kinetic curves of G α i3 activation in presence of 10 nM AngII in the absence or presence of 100 μ M A-CTX-cMila or 1 μ M candesartan. Representation of one typical experiment among three independent experiments. (C) Impact of A-CTX-cMila on G α i3 activation in presence of 50 nM AngII. Representation of one typical experiment among three independent experiments. (D) Impact of 150 μ M of A-CTX-cMila on the dose-dependent effect of AngII on G α i3 activation. Values are mean \pm SEM ($n = 3$). For (B), (C) and (D), cells were incubated with increasing concentrations of toxin or

candesartan for 30 min before addition of AngII at $t = 0$. Veh: vehicle; cand: candesartan. Net BRET and ligand-induced BRET were calculated as described in "Material and Methods" section.

The effect of A-CTX-cMila was then tested on the G α O pathway. Treatment with 100 nM AngII increases BRET signal with a peak before one minute, sign of an activation of G α O pathway (Figure 5A,B). Neither the toxin nor the candesartan alone can induce activation of this pathway (Figure 5A). The activation is blocked by 100 μ M of toxin as well as 1 μ M candesartan (Figure 5B). Thus, the toxin seems to display no agonist mode of action but an antagonist mode of action on G α O pathway. AngII induces G α O activation in a dose-dependent manner with an EC₅₀ of 12.5 ± 5.0 nM ($n = 3$) (Figure 5C). In the presence of the toxin at 150 μ M the dose-response curve of AngII is shifted towards higher concentrations and its EC₅₀ goes from 12.5 ± 5.0 nM to 966 nM \pm 470 nM ($n = 3$) (Figure 5C). However, the maximal effect of AngII is not impaired by the toxin, indicating that A-CTX-cMila is also acting as a competitive antagonist on G α O pathway.

To conclude on the effect of A-CTX-cMila on the G-protein dependent pathways, this toxin behaves as a competitive antagonist on G α q/PLC, G α i3 and G α O pathways.

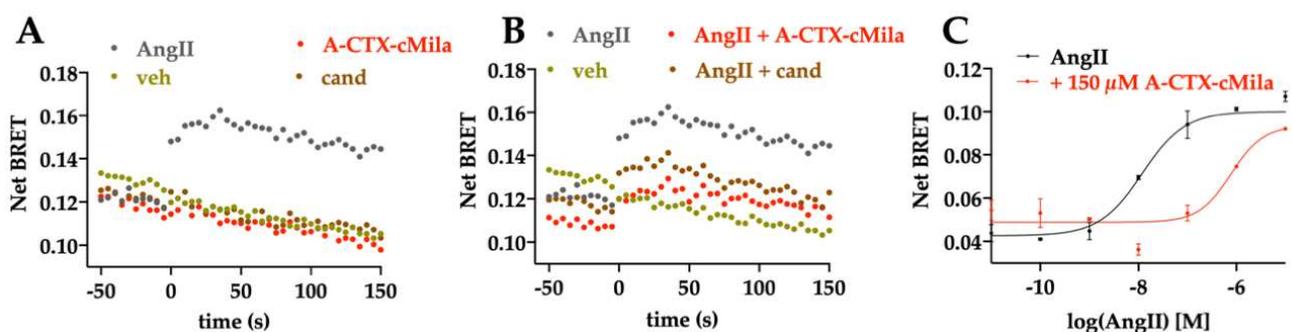


Figure 5. Competitive antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated G α O pathway monitored by BRET biosensors assays. HEK293T cells were transfected with plasmids encoding AT1 receptor, KB-1753-Nanoluc and G α O-YFP and processed for BRET recordings. (A,B) Kinetic curves of G α O activation in presence of 100 nM AngII in the absence or presence of 100 μ M A-CTX-cMila or 1 μ M candesartan. Representation of one typical experiment among three independent experiments. (C) Impact of 150 μ M of A-CTX-cMila on the dose-dependent effect of AngII on G α O activation. Representation of one typical experiment among three independent experiments. For EC₅₀, mean \pm SEM ($n = 3$). For (B) and (C), cells were incubated with increasing concentrations of toxin or candesartan for 30 min before addition of AngII. Veh: vehicle; cand: candesartan. Net BRET and ligand-induced BRET were calculated as described in "Material and Methods" section.

2.6. Pharmacological characterization of A-CTX-cMila on AT1-mediated β -arrestin 2 recruitment

Once G-proteins are activated, AT1 receptor undergoes desensitization through its phosphorylation that triggers the binding to β -arrestins. For the recruitment of β -arrestin by the AT1 receptor in

response to AngII stimulation, HEK293T cells were co-transfected with Rluc- β -arrestin 2 and AT1-YFP expression plasmids [37]. An increase of the BRET signal is a sign of β -arrestin 2 recruitment upon AT1 activation.

The kinetic curve shows that 10 nM AngII induces an increase in BRET signal, the signal reaching a peak at 3 minutes before stabilizing (Figure 6A,B). Neither the candesartan nor the toxin alone could induce an increase in BRET signal (Figure 6A). In presence of AngII, 100 μ M of A-CTX-cMila completely inhibits the BRET signal as well as 1 μ M candesartan (Figure 6B). Thus, the toxin displays no agonist mode of action but an antagonist mode of action on this pathway. AngII induces the β -arrestin 2 recruitment with a dose-dependent effect ($EC_{50} = 0.99 \pm 0.24$ nM, $n = 5$) (Figure 6C). In the presence of 30 nM AngII, the toxin inhibits β -arrestin 2 recruitment by AngII in a dose-dependent manner with a micromolar potency ($IC_{50} = 15.6 \pm 3.0$ μ M, $n = 4$) (Figure 6D). The analysis of the dose-response curves of AngII submitted to different doses of toxin underlines that the EC_{50} of AngII raises from 0.99 ± 0.24 nM to 10.9 ± 5.8 nM with 15 μ M toxin, to 23.3 ± 10.7 nM with 50 μ M toxin, to 54.0 ± 19.0 nM with 150 μ M toxin without affecting the maximal response of AngII by the toxin ($n = 3$) (Figure 6E). The Schild's regression is linear with a slope of -1.0 ± 0.4 and a pA_2 of 5.7 ± 0.3 ($n = 3$). The associated K_B is 4.1 ± 3.1 μ M ($n = 3$) (Figure 6F). A-CTX-cMila is also a competitive antagonist on the recruitment of β -arrestin 2.

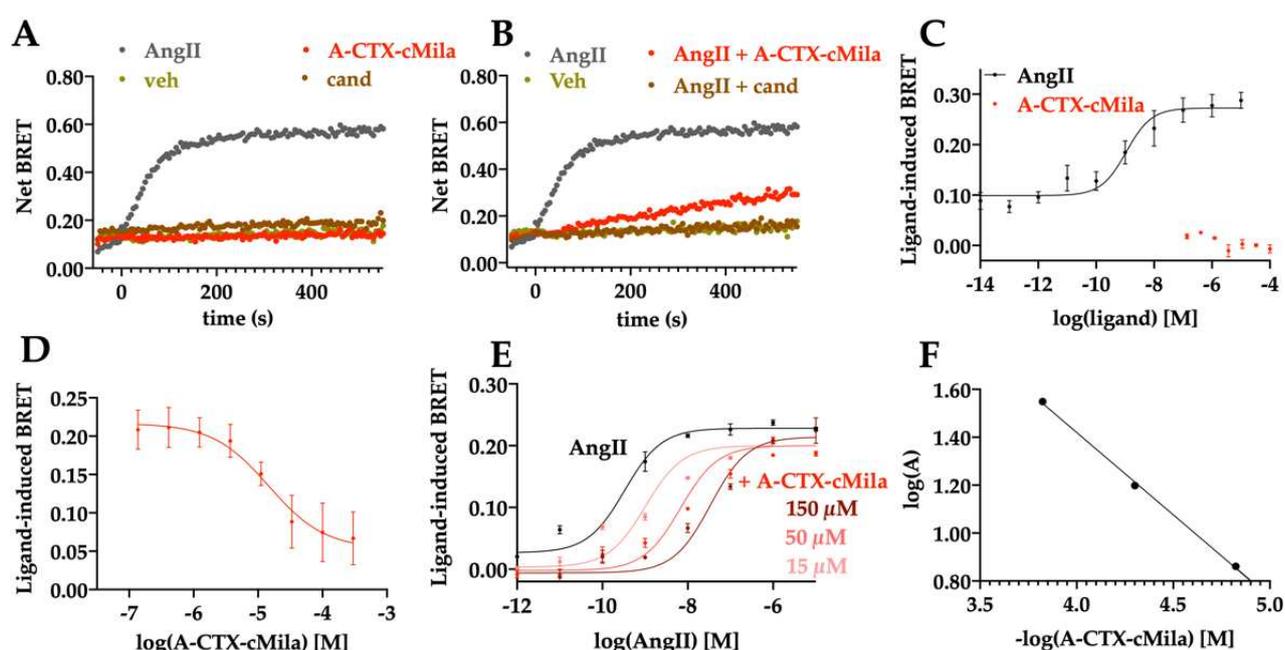


Figure 6. Competitive antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated β -arrestin 2 recruitment. HEK293T cells were transfected with plasmids encoding AT1-YFP receptor and Rluc8- β -arrestin 2 and processed for BRET measurements. (A,B) Kinetic curves of β -arrestin 2 recruitment in presence of 10 nM AngII in the absence or presence of 100 μ M A-CTX-cMila or 1 μ M candesartan. Representation of one typical experiment among three independent experiments. (C) Effect of AngII

and A-CTX-cMila on β -arrestin 2 recruitment. For AngII, mean \pm SEM (n = 5), for A-CTX-cMila, representation of one experiment. (D) Impact of the toxin on β -arrestin 2 recruitment in presence of 30 nM AngII. Values are mean \pm SEM (n = 4). (E) Impact of different doses of A-CTX-cMila on the dose-dependent effect of AngII on β -arrestin 2 recruitment. Representation of one typical experiment among three independent experiments, for EC50, mean \pm SD (n = 3). For (B), (D) and (E), cells were incubated with increasing concentrations of toxin or candesartan for 30 min before addition of AngII. (F) Schild's regression of corresponding activation curves. Representation of one typical experiment among three independent experiments. Veh: vehicle; cand: candesartan. Net BRET and ligand-induced BRET were calculated as described in "Material and Methods" section.

2.7. Pharmacological characterization of A-CTX-cMila on AT1-mediated ERK1/2 activation

AngII activates ERK1/2 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway through both G protein and β -arrestin-dependent processes.

A-CTX-cMila, showing antagonist properties on these pathways, it should inhibit downstream pathways and thus ERK1/2 activation by AngII. The activation level of ERK1/2 was determined with an HTRF assay based on the use of an antibody recognizing the phosphorylated/activated form of these kinases proteins. The kinetic study shows a rapid increase in ERK1/2 phosphorylation in presence of 30 nM of AngII, this phosphorylation peaking around 3 minutes and then stabilizing to an intermediate level until 15 minutes. In presence of 150 μ M A-CTX-cMila, ERK1/2 phosphorylation is strongly inhibited, demonstrating that A-CTX-cMila is an antagonist on ERK1/2 activation (Figure 7A).

To confirm the results obtained by HTRF method, the effect of AngII and the toxin were determined by western blot approach (Figure 7B,C). The results are in agreement with those obtained with the HTRF assay and show that AngII (10 nM) induces the phosphorylation of both ERK1 and ERK2 proteins, and that A-CTX-cMila (150 μ M) strongly reduces this effect (89% \pm 2% inhibition).

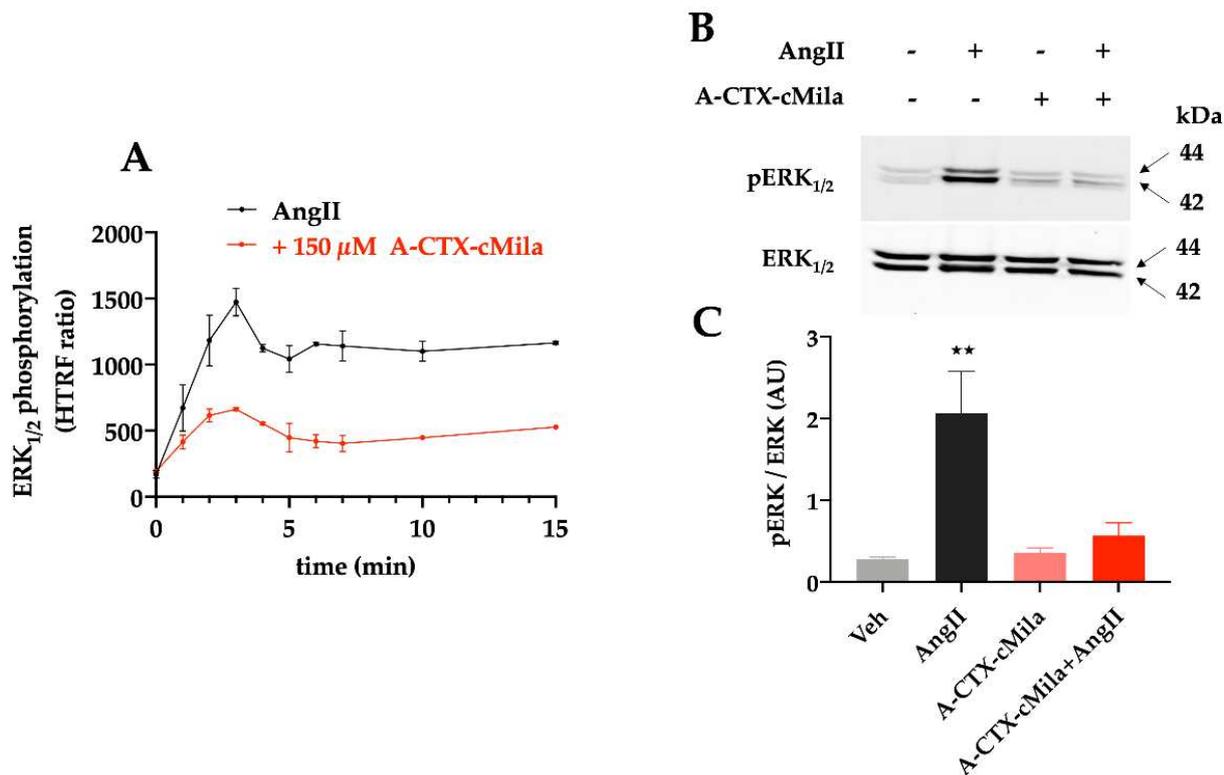


Figure 7. Antagonist mode of action of A-CTX-cMila on AT1-mediated ERK1/2 activation in CHO-AT1a-EGFP cells. (A) Time course of AT1-induced ERK1/2 phosphorylation by 30 nM AngII in the absence or presence of 150 μM A-CTX-cMila. ERK1/2 phosphorylation level was measured with HTRF kit. Representation of one typical experiment among three independent experiments, values are mean ± SD. (B) Western blot analysis of ERK1/2 phosphorylation. Cells were pre-incubated in the presence or absence of 150 μM A-CTX-cMila and then stimulated with 30 nM AngII for 5 min. Representation of typical results among three independent experiments. pERK1/2: phosphorylated ERK. (C) Quantification of western blots corresponding to (B). Values are expressed as the ratio of band intensities of phosphorylated ERK over total ERK and are mean ± SD (n = 4). ** p < 0.0001, significantly different compared to all other conditions tested.

2.8. Selectivity profile of A-CTX-cMila

The selectivity of A-CTX-cMila was evaluated on other peptide-activated GPCRs involved in cardiovascular functions: endothelin type A (ETA), endothelin type B (ETB), apelin (APJ), vasopressin type 1a (V1a) and vasopressin type 2 (V2) receptors.

Activation of these receptors were tested on HEK293T cells transiently transfected with each receptor. For Gαq/PLC coupled receptors (ETA, ETB, V1a), IP1 production was quantified. For V2 receptor, coupled to Gαs/adenylate cyclase pathway, cAMP production was analyzed. For the apelin receptor APJ, which is coupled to Gαi protein, HEK293T cells were co-transfected with the APJ receptor together with Gαq9 chimeric protein, which allows the coupling of Gαi-coupled receptors to PLC [38]. For this receptor, IP1 production was thus also quantified. On transfected HEK293T cells,

IP1 or cAMP production is measured by HTRF assay kits in presence of the cognate endogenous agonists and/or the toxin. 100 μ M of A-CTX-cMila has no impact on IP1 production both in presence and absence of ET-1, AVP or apelin. The toxin thus exhibits no agonist neither antagonist effect on ETA, ETB, APJ and V1a receptors. Furthermore, 100 μ M of A-CTX-cMila has no impact on cAMP production both in presence and absence of AVP: the toxin exhibits no effect on V2 receptor (Figure 8).

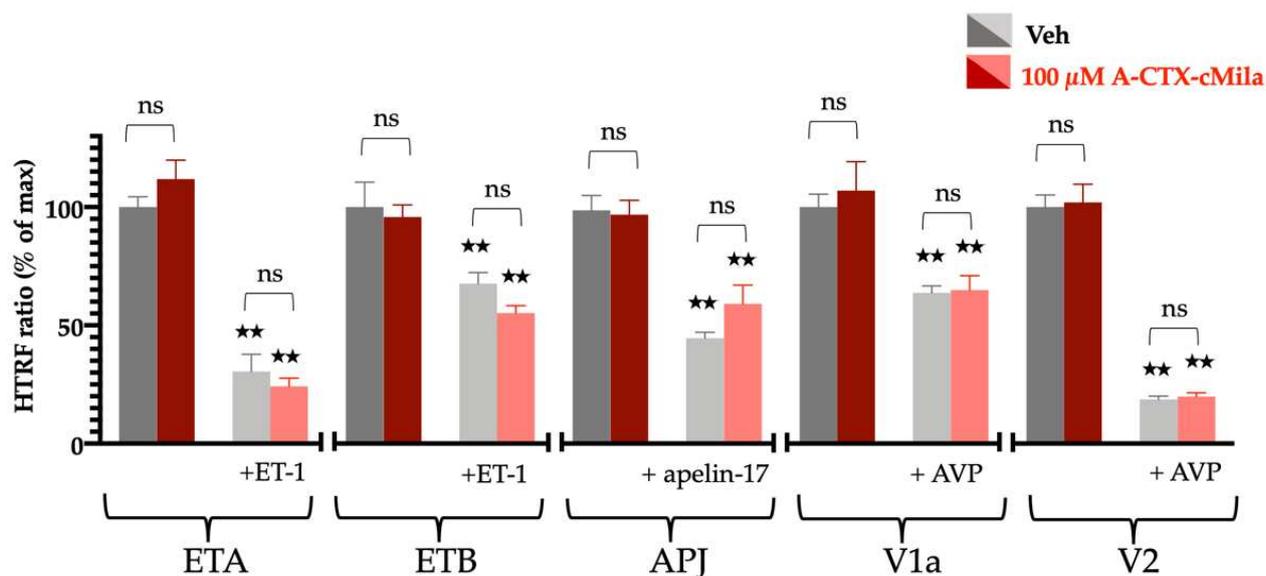


Figure 8. Selectivity profile of A-CTX-cMila for others GPCRs on HEK293T cells transfected with various receptors. Effect of 100 μ M A-CTX-cMila on ETA, ETB, APJ and V1a-dependent production of IP1 or V2-dependent production of cAMP, in presence or absence of ET-1 30 nM or apelin-17 100 nM or AVP 30 nM. For APJ receptors, cells were co-transfected with G α q9 expression plasmid. Values are expressed in HTRF ratio, mean \pm SEM (n = 3). A decrease in the HTRF ratio is the sign of second messenger (IP1 or cAMP) concentration increase. Veh: vehicle; ns: non significantly different; ** p < 0.0001, significantly different compared to the corresponding veh.

3. Discussion

Targeting the cardiovascular system is one of the strategies selected during the evolution of venomous animals to subdue their prey or defend themselves against predators. A significant number of toxins with cardiovascular effects have been identified and characterized. Among them, toxins targeting selective subtypes of sodium, potassium or calcium channels can directly affect cardiovascular functions. For example, toxins from scorpions, sea anemones or spiders may disrupt the Nav1.5 or hERG functions, leading to heartbeat rate variation or delay in cardiomyocytes repolarization, respectively [39]. Other snake toxins displaying phospholipases A2 activity, can induce a decrease in blood pressure through the production of arachidonic acid [40]. Among the

GPCRs-interacting toxins, Atractaspis snakes sarafotoxins activate endothelin receptors, inducing a strong general vasoconstriction leading to heart failure and cardiac arrest [41]. Finally, the M2 muscarinic toxin MT9 from the black mamba increases the mesenteric arteries contraction [42]. Despite the existence of many toxins with cardiovascular effects, there is only one family of toxins known to target the RAS: these are the bradykinin-potentiating peptides isolated from Brazilian pit viper which led to the development of the antihypertensive blockbuster captopril targeting ACE [43]. Nevertheless, there is no identified toxin targeting GPCRs involved in the RAS.

The aim of the present study was to find GPCRs-interacting toxins targeting the RAS. To this end, we have screened the Venomics library and identified A-CTX-cMila from the venom of *Conus miliaris* as the first toxin active on the AT1 and AT2 receptors. It interacts at high nanomolar range affinity on AT1 receptor and displays an antagonist mode of action on all the signaling pathways studied. Indeed, the toxin was found to be a competitive antagonist on G-protein dependent and independent pathways coupled to AT1 receptor: it inhibits G α q, G α i3, G α oA activation, β -arrestin 2 recruitment and blocks ERK1/2 activation. A-CTX-cMila was also found to bind to AT2 receptor but with an about 100-fold lower affinity than for AT1 receptor. It also inhibits the binding of fluorescent forms of AngII (Cy3 and Cy5 conjugates) to intact cells. Considering the low affinity of A-CTX-cMila for AT2 receptor, and the difficulties to characterize AT2-dependent signaling pathways [44] the functional study of the toxin was only performed on AT1 receptor.

A-CTX-cMila sequence (CHFVWVCP) is very different from that of AngII (DRVYIHPF). The most important residues for AngII activity on AT1 receptor are Tyr4, His6 and Phe8. Tyr4 interacts with Asn111, also determining the switch for full-agonist activity [45]. His6 interacts with Phe259, Thr260 and Asp263 thus providing the docking site [46]. Phe8 interacts with Lys199 and His256, critical for G α q signaling [47]. Thus, considering the absence of sequence homology with AngII, and the cyclic structure of the toxin, it is unlikely that they share a similar interaction mode, in accordance with its antagonism mode of action. This is confirmed by the implication of other residues of AT1 in the binding with an AT1 receptor antagonist, olmesartan, which are Tyr35, Trp84, Arg167 [30]. In order to assess the specificity of this interaction, the effect of A-CTX-cMila was also tested on other receptors involved in cardiovascular homeostasis and having endogenous peptide ligands. The apelin receptor (APJ) is one of the closest receptors to AT1 in the phylogenetic tree of GPCRs [48] with about 30% homology in human [49]. It is an important regulator of body fluid homeostasis and cardiovascular functions [50]. This receptor has two unrelated families of endogenous peptide

ligands, apelin and elabela [37], which are both linear peptides devoid of Cys residues [51]. ETA and ETB endothelin receptors have been detected predominantly in cardiovascular tissues. Endothelins are 21 amino acids peptides with four Cys residues forming two disulfide bridges [52]. ETA receptor is located mostly in vascular smooth muscle cells (VSCM) and promotes vasoconstriction but also inflammation and cell proliferation [53]. ETB receptor is mainly expressed on endothelial cells where it promotes vasodilatation through production of nitric oxide. Finally, V1a receptor is a $G\alpha_q$ /PLC coupled receptor expressed in vascular smooth muscle cells (VSMC) increasing vasoconstriction when activated by arginine-vasopressin (AVP) [54]. V2 receptor is found on the basolateral surface of the cells of the collecting ducts. It is a $G\alpha_s$ -coupled GPCR involved in diuresis regulation whose activation by its endogenous agonist ligand, AVP, leads to a homeostatic regulation of water and sodium recapture from the urine to the bloodstream and an anti-diuretic effect [55]. The results obtained show that A-CTX-cMila, has neither agonistic nor antagonistic effect on these receptors, indicating that the toxin action is restricted to angiotensin II receptors.

Conotoxins represent highly specific biological probes that provide tools for pharmacological studies. So far, less than 1% of the conotoxin peptide library has been catalogued [34]. The cyclic nature of A-CTX-cMila is not common in conotoxins family and found only in contryphans and in conopressins families. Contryphans target calcium channels [56], have no sequence homology with A-CTX-cMila and possess a loop of 5 residues [57]. Conopressins are related to vasopressin and oxytocin, endogenous peptides that bind vasopressin and oxytocin receptors respectively, and act on these same receptors. Like the A-CTX-cMila, conopressins have a 4-residues loop such as conopressin-T (CYIQNCLRV) from *Conus tulipa*, conopressin-S (CIIRNCPRG) from *Conus striatus* [58] and conopressins M1 (CFPGNCPDS) and M2 (CFLGNCPDS) from *Conus miliaris* [59]. However, they display no sequence homology with A-CTX-cMila and no similarity in their pharmacological profiles. Indeed, A-CTX-cMila had no effect on vasopressin receptors. These results demonstrate that A-CTX-cMila is the first member of a novel group of cyclic conotoxin associated with a new function.

It is interesting to note that our study was performed on mammalian receptors while *Conus miliaris* is a worm hunter. If this experimental bias may account for the moderate affinities of the A-CTX-cMila on AT1 and AT2, it may reveal a biological role of the toxin for predation and/or protection. Indeed, GPCR function in worms are highly developed. Over the past decade, more and more RAS effectors have been discovered in invertebrates such as angiotensinogen-like peptides, renin-like and ACE-like enzymes. In clam worms, an ACE-like form was discovered, displaying similar properties

as mammalian ACE [60]. Physiological roles of the mammalian RAS may also be encountered in invertebrates and more specifically in worms. For instance, it has been demonstrated that AngII and AngIII had an impact on body fluid volume in the clam worm [61]. We may consider that the toxin we isolated from *Conus miliaris* may act through the worm's RAS system to apprehend it. This work identified a possible new strategy of predation and/or protection used by marine cone snails that deserved to be deeply studied.

A-CTX-cMila is part of the Venomics databank contains 20,206 sequences including 606 cyclic toxins [62]. The biological function of this class of toxins is poorly studied, despite a fairly easy production, and therefore represent high potential study tools. A-CTX-cMila can be seen as the spearhead of a new axis of study of cyclic conotoxin with high pharmacological potential.

4. Materials and Methods

4.1. Cell culture and transfection

For the establishment of CHO-AT1a-EGFP and CHO-AT2-EGFP stable cell lines, the sequence of the rat AT1a (gift from Dr. K. Bernstein [63]) and AT2 [64] receptor cDNAs were amplified by PCR using oligonucleotide primers allowing the deletion of the stop codon and the in frame cloning in pEFGP-N1 plasmid (Clontech) in HindIII and BamHI restriction sites. The constructs were checked by sequencing. CHO-K1 cells (from ATCC) were transfected with 1 µg of the plasmids and selected in the presence of 750 µg/ml G418 (GIBCO, ThermoFischer Scientific). For final selection, GFP-positive cells were sorted by FACS analysis on an Epics EST flow cytometer equipped with an Autoclone cell sorter (Beckman Coulter).

CHO-AT1a-EGFP, CHO-AT2-EGFP and HEK293T (from ATCC) cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in DMEM/F-12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (50 U/mL), streptomycin (50 µg/mL) and glutaMAX-CTS (0.5 mM). HEK293T cells were transfected with Lipofectamine™ 2000 reagent according to the manufacturer's specifications. All reactants were supplied from Gibco, ThermoFischer Scientific. KB-1753-Nanoluc, Gαi3-YFP and GαoA-YFP were obtained from M. Maziarz (Department of Biochemistry, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118, USA).

4.2. Membrane preparation

Transfected cells (15×10^6 cells) were washed with 10 mL of phosphate-buffered saline (PBS) and 0.5 mM EDTA, pH 7.4 and harvested using 10 mL of this solution. Cells were collected by centrifugation at 2000xg for 3 min at 4 °C. Cells were homogenized in 5 mL of 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) at 4 °C containing 70 μ L anti protease cocktail (AEBSF at 104 mM, aprotinin at 80 μ M, bestatin at 4 mM, E-64 at 1.4 mM, leupeptin at 2 mM and pepstatin A at 1.5 mM, Sigma Aldrich), using a Potter's grinder and then centrifuged at 1000xg for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was then centrifuged at 50000xg for 1 hour at 4 °C. The crude membrane pellet was washed and resuspended in 1 mL of 10 mM HEPES (pH 7.4).

4.3. Radioligand binding assays

Sar1-Ile8-AngII (30 μ g in TRIS pH 7.5; 100 mM) was introduced in a tube coated with iodogen (ThermoFischer Scientific) with 0.4 mCi of Na¹²⁵I (Perkin Elmer, specific activity 17 Ci/mg, 0.1 M NaOH) for 20 min. After purification by HPLC and mass control with MALDI-TOF, the monoiodinated peptide was diluted in 10 mM HEPES supplemented with 1% bovine serum albumine (BSA).

Binding experiments were performed at room temperature using a mix of 100 μ L of radioligand at 0,5 nM in 50 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 0.1 g/L BSA, 0.3 μ L of membranes of cells expressing receptors, and the competitor at different concentrations. Non-specific binding was determined in presence of 2 μ M AngII. Filter plate (Unifilter-96 GF/C, Perkin Elmer) was saturated with polyethylenimine (PEI, 0.5%, Sigma Aldrich). After 16 hours of incubation at room temperature, samples were filtered and 25 μ L of microscintillant (MicroScint-O, Perkin Elmer) were added to each dry filter before recording the radioactivity on the Packard TopCount counter (Perkin Elmer).

The toxins library was produced by the Venomics consortium [1]. The screening conditions (quantity of membranes, quantity of radioligand) were optimized beforehand to obtain a Z factor greater than 0.5, with $Z = 1 - ((3 \times \text{MAD}_{\text{max}} + 3 \times \text{MAD}_{\text{min}}) / (\text{median}_{\text{max}} - \text{median}_{\text{min}}))$, where MAD = Median absolute deviation. Eleven 96-well plates containing one toxin by well were screened. On each 96-well plate, eight wells were dedicated to total binding of the radioligand, and eight other dedicated to non-specific binding. After counting the radioactivity bound in each well, peptides with an associated binding value less than Median – 3×MAD were classified as hits.

4.4. Production of A-CTX-cMila

The protected amino acids (AA) came from Novabiochem and Activotec; Fmoc-Pro-Novasyn TGT resin, dichloromethane, acetic anhydride (Ac₂O) from Merck Millipore; N-methylmorpholine (NMM), thioanisole, anisole, triisopropylsilane (TIPS), HCTU, piperidine, acetonitrile (CH₃CN), HEPES, cysteine, cystine from Sigma Aldrich; acetic acid, N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP), methanol from VWR; diethyl ether, dimethylformamide (DMF) from Carlo Erba; trifluoroacetic acid (TFA) from Fisher Scientific.

SPPS was performed on a synthesizer (Prelude Protein Technologies Inc, Prelude User software) using Fmoc-strategy. Resin was swollen with 2×3 mL of DCM for 30 sec then with 1×3 mL of NMP for 5 min. The Fmoc group was deprotected with 2×2 mL of 20% piperidine in NMP for 2 min, followed by 3×3 mL of NMP for 30 sec. Coupling steps were done twice 10 min with 1.3 mL of AA (200 mM in NMP, cysteine in DMF) was added to 1 mL of HCTU (250 mM in NMP) and 0.5 mL of NMM (1 M in NMP), followed by 2×3 mL of NMP for 30 sec. Capping was done with 2 mL 250 mM Ac₂O in NMP for 5 min. A final washing of the medium with NMP (3×3 mL for 30 sec) was carried out.

The peptide was cleaved from its solid support and the side chains were deprotected with a solution of TFA 82.5%/Thioanisole 5%/Anisole 5%/H₂O 5%/TIPS 2.5% (10 mL; 2 hours at room temperature; 300 rpm stirring). The peptide in solution was then precipitated in 3×40 mL of cold diethyl ether (3000 rpm for 4 min), dissolved in 15 mL of 10% acetic acid and freeze-dried.

4.5. HPLC purification and analysis

The mobile phases that were used for the HPLC analysis are A: H₂O + 0.1% TFA and B: CH₃CN + 0.1% TFA. The crude peptide is purified by a preparative method on a Waters device (pump module: 2535 Quaternary Gradient module; UV detector: Waters 2998 Photodiode Array), with an XBridge BEH 300A Prep C18 column OBD 5 μm 19×250 mm, at a flow rate of 13 mL/min. Analytical HPLC is performed on a Waters device (pump module: e2695 separation module; UV detector: Waters 2998 Photodiode Array) with an XBridge BEH 300Å C18 column (5 μm, 4.6 mm × 250 mm, Waters). The indicated retention times are given in minutes. Gradient used was 0-50% B in 50 min with a wash phase at 80% B for 10 min and a column equilibration phase at 100% A for 10 min.

4.6. Mass spectrometry analysis

Samples were analyzed by HPLC coupled with mass spectrometry (HPLC-MS): the electrospray ionization mass spectrometry technique of the ESI-IT ion trap type (ElectroSpray Ionization-Ion Trap) on an Esquire HCT device (high capacity trap, Bruker Daltonics) was coupled with reversed-phase chromatographic analysis (Agilent 1100 series HPLC), with an Agilent Eclipse XDB C18 80A column, 5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm. The gradient used was 5 to 100% B in 60 min at 1 mL/min, with a wash phase at 80% B for 10 min and a column equilibration phase at 95% A for 10 min. The data were analyzed with DataAnalysis software (Bruker Daltonics). The indicated retention times were given in minutes. Samples were also analyzed by mass spectrometry MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization – Time of flight), using a 4800 MALDI TOF-TOF Analyzer (Applied biosystems), in reflectron mode. The sample was co-crystallized on a plate with a solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), solution prepared at 10 mg/mL in 50/50 CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA. The reported m/z values correspond to the monoisotopic peak.

4.7. Thermodynamic oxidation

Oxidation buffer composed of HEPES (pH 7.5; 0.1 M in H₂O), EDTA (pH 8; 0.001 M in H₂O), cysteine (0.001 M in H₂O), cystine (0.0001 M in H₂O), CH₃CN (20%) and purified linear peptide (20 μ M in H₂O), was mixed at room temperature for 48 hours.

4.8. Labeling of AngII with Cy3 and Cy5

The Cy3 fluorophore (4 eq; 4 μ mol in NMP, ThermoFischer Scientific) was mixed with HCTU (4 eq; 4 μ mol) and NMM (10 eq; 10 μ mol) in NMP. 1 μ mol of peptide on resin was added (300 rpm stirring; 2 hours; room temperature). 3 \times 5 mL washes with NMP then 3 \times 5 mL washes with DCM were carried out. The peptide on resin was dried under vacuum, cleaved from the resin and deprotected.

0.3 μ mol of peptide cleaved from the resin, deprotected, purified and freeze-dried was taken up in DMF. N,N-diisopropylethylamine (DIPEA, Sigma Aldrich, 10 eq.) was added, then the Cy5 fluorophore (Lumiprobe, 5 eq.), with stirring at 250 rpm for 1.5 hour at 37 °C. TRIS (pH 7.8; 50 mM) was added (250 rpm stirring; 20 min).

Both Cy3-AngII and Cy5-AngII were purified by HPLC and analyzed by mass spectrometry. After lyophilization, peptides were resolubilized in H₂O.

4.9. Fluorescent-AngII binding assays

CHO-AT1a-EGFP and CHO-AT2-EGFP were seeded at 40,000 cells/well in 96-well microplate. After 24 hours, cells were preincubated or not with 50 μ M toxin for 30 min and then incubated with 10 nM Cy3-AngII for 15 min at 37 °C. Cells were then washed with Ham's F-12 and fixed with 4% PFA (Sigma Aldrich) for 5 min. Vectashield-DAPI was added (Sigma Aldrich) to each well before observation. Microscopic observation was made under a Nikon Eclipse Ti microscope equipped with a 60x magnification objective.

For flow cytometry analysis, CHO-AT1a-EGFP or CHO-AT2-EGFP cells (200,000 cells) were incubated in suspension in PBS containing 0.1% BSA in the presence or absence of 150 μ M toxin for 30 min before addition of 20 nM Cy5-AngII for 30 min at room temperature in a total volume of 100 μ L. Samples were diluted ten-fold in PBS-BSA immediately before analysis on an ACCURI C6 + flow cytometer (BD Bioscience) equipped with 488 and 540 lasers.

4.10. Second messengers assays

Experiments were performed on CHO cells stably expressing receptors of interest, or on HEK293T cells transiently transfected. In this case, HEK293T cells were seeded in 6-well plates (10^6 /well) and transfected 24 hours later with Lipofectamine™2000. 24 hours after transfection, cells were collected and resuspended in appropriated buffer (see below).

4.10.1. IP1 assay

IP1 production was quantified with the IP-one-Gq assay kit (Cisbio Perkin Elmer) based on homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) according to the kit protocole. Cells expressing the receptor of interest were added to the 384-well microplate (22,500 cells in 5 μ L stimulation buffer) and stimulated for 45 min at 37 °C in the presence of agonist or toxin or by a mix of agonist and toxin prepared in stimulation buffer. In this latter case the toxin was pre incubated with cells for 30 min at 37 °C. Detection reagents (2 \times 5 μ L) were then added to each well and the plate incubated for 30 min at room temperature before reading on a CLARIOstar plate reader (BMG Labtech).

4.10.2. cAMP assay

Cyclic AMP production was quantified with the cAMP Gs dynamic kit (Cisbio Perkin Elmer) based on HTRF. Cells expressing V2 receptor were added to the 384-well microplate (1,500 cells/well in 5 μ L Ham's F-12 medium containing 1 mM IBMX) and stimulated for 45 min at 37 °C by 30 nM vasopressin or 100 μ M toxin or by a mix of vasopressin and toxin. Detection reagents (2 \times 5 μ L) were then added to each well and the plate incubated for 30 min at room temperature before reading on a CLARIOstar plate reader (BMG Labtech).

4.11. β -arrestin 2 recruitment and biosensors assays

For the β -arrestin 2 recruitment assay, HEK293T cells seeded in 6-well plates (10^6 /well) were transfected with Lipofectamine™ 2000 with 2.5 μ g of DNA mix containing 80% of Rluc8- β -arrestin 2 plasmid (BRET donor) and 20% AT1-YFP plasmid (BRET acceptor). Control cells with no BRET acceptor were made by transfecting cells with Rluc8- β -arrestin 2 plasmid and non-fluorescent AT1 plasmid. 24 hours after transfection, cells were collected and resuspended in reaction buffer (HEPES 25 mM pH 7.5; CaCl₂ 1mM; MgCl₂ 0.5mM; NaCl 150 mM; glucose 1 g/L) and 20 μ L of cell suspension (40,000 cells) were placed in a 96-well plate (Perkin Elmer; OptiPlate-96, White Opaque 96-well Microplate). Coelantherrazine H (Nanolight technology, Pinetop) (20 μ L of a 5 μ M solution prepared in reaction buffer) was added to each well before addition of agonist ligands (10 μ L in reaction buffer). Antagonist molecules and toxin were pre-incubated with the cells for 30 min at 37 °C before adding the substrate and the agonist ligand. Luminescence signals were measured with an Envision microplate reader (Perkin Elmer, 2104 multi label reader) set at 37 °C with 485-nm and 530-nm emission filters. The BRET signal was calculated as the 530 nm/485 nm signal ratio. The net BRET signal was determined by subtracting the BRET signal obtained in the absence of acceptor. Ligand-induced BRET is calculated by subtracting the net BRET before stimulation to the net BRET after stimulation. For kinetic BRET measurements, signals were measured every 1 s for the duration of the experiment.

For G α i3 and G α oA activation assays, HEK293T cells were transfected as described above but with DNA mix containing 0.016% of KB-1753-Nanoluc plasmid (BRET donor) 40% of G α i3-YFP or G α oA-YFP plasmid (BRET acceptor) and 60% non-fluorescent AT1 plasmid. 24 hours after transfection, cells were collected and resuspended in OptiMEM medium (ThermoFischer Scientific). Stimulation of cells and luminescence recordings were made as for β -arrestin 2 recruitment except that cells were

resuspended at 25,000 cells in 20 μ L and that the substrate solution consisted in 20 μ L of 6.25 μ M furimazine (Promega corporation).

4.12. ERK1/2 activation

ERK1/2 phosphorylation was assessed with the Cisbio Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) cellular kit. CHO-AT1a-EGFP cells were seeded 48 hours before at 40,000 cells/well in a 96-well plate. The medium was changed 24 hours after seeding and replaced with Ham's F-12 medium without FBS. At the time of experiment, culture medium was discarded and replaced by 40 μ L Ham's F-12 medium containing toxin or not, and the plate was incubated for 30 min at 37 °C. Cells were stimulated by 10 μ L of 5X AngII solution (10 μ L/well; 30 nM) in Ham's F-12 medium, at the desired times (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 min). The wells were emptied and then 50 μ L of lysis buffer were added. The plate was incubated for 1 hour at room temperature. 16 μ L of each well were transferred to a 384-well plate. The reagents (4 μ L, 1:1) were added and the plate was incubated for 3 hours at room temperature before reading with the CLARIOstar. For western blot analysis of phosphorylated ERK1/2, CHO-AT1a-EGFP cells were seeded in 12-well plates at a density of 200,000 cells/well. Medium was replaced by F12 medium without FCS 24 h before the experiment. Cells were incubated or not with 20 μ M A-CTX-cMila for 30 min, 10 nM AngII were then added for 5 min and cells were lysed in 100 μ L ice cold lysis buffer (PBS, 1% Triton X-100). Detergent-extracted proteins were analyzed by western blot technique using mouse monoclonal anti-active phosphorylated ERK1/2 (Cell Signaling Technology) and rabbit polyclonal anti-ERK2 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies (1:5,000 each). The membranes were then incubated with anti-rabbit IgG antibody conjugated to IRDye 800CW (LI-COR Biosciences) and anti-mouse IgG antibody conjugated to AlexaFluor 680 (Life technologies) for 1 h at 37 °C. Protein bands were detected and quantified with an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

4.13. Data analysis

All experiments were performed at least three times, as indicated in the figure legends, and, unless otherwise indicated, they are presented as averages \pm SEM. Binding experiments, second messengers assays, BRET assays were all analyzed using Prism v5.000 software (GraphPad). Dose–response curves were generated using nonlinear regression curves with three parameters. Schild's regressions were generated by plotting $\log(A)$, with $A = (EC_{50} \text{ AngII} + \text{toxin} / EC_{50} \text{ AngII}) - 1$

depending of the $-\log(\text{concentration ligand})$ using simple linear regression curves. The K_B value was calculated from the y-intercept of the slope ($K_B = 10^{-y\text{-intercept}}$). For multiple comparison tests, statistical analysis was performed using one- or two-way ANOVA followed by post hoc comparisons with the Tukey's HSD test. Values with $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Author Contributions: Conceptualization, A-C.V-B, P.R, D.S, N.G, X.I, P.K, M.C; investigation, A-C.V-B, P.R, N.G, X.I, P.K, M.C, C.L-C; writing—original draft preparation, A-C.V-B, P.R; writing—review and editing, A-C.V-B, P.R, D.S, N.G, X.I, P.K, M.C; supervision, P.R, D.S, N.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: A Ph.D. grant (A-C.V-B) was supported by the University of Paris-Saclay.

Acknowledgments: We thank M. Marziarz from (Department of Biochemistry, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118, USA) for providing KB-1753-Nanoluc, $\text{G}\alpha\text{i}3\text{-YFP}$ and $\text{G}\alpha\text{oA-YFP}$ plasmids.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] N. Gilles et D. Servent, « The European FP7 Venomics Project », *Future Med Chem*, vol. 6, no 15, p. 1611-1612, oct. 2014, doi: 10.4155/fmc.14.85.
- [2] S. Peigneur et J. Tytgat, « Toxins in Drug Discovery and Pharmacology », *Toxins (Basel)*, vol. 10, no 3, p. E126, mars 2018, doi: 10.3390/toxins10030126.
- [3] J. A. Williams, M. Day, et J. E. Heavner, « Ziconotide: an update and review », *Expert Opin Pharmacother*, vol. 9, no 9, p. 1575-1583, juin 2008, doi: 10.1517/14656566.9.9.1575.
- [4] A.-C. Van Baelen, P. Robin, P. Kessler, A. Maïga, N. Gilles, et D. Servent, « Structural and Functional Diversity of Animal Toxins Interacting With GPCRs », *Front Mol Biosci*, vol. 9, p. 811365, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.811365.
- [5] M. P. Ocaranza et al., « Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease », *Nat Rev Cardiol*, vol. 17, no 2, Art. no 2, févr. 2020, doi: 10.1038/s41569-019-0244-8.
- [6] N. E. Freeman et I. H. Page, « Hypertension produced by constriction of the renal artery in sympathectomized dogs », *American Heart Journal*, vol. 14, no 4, p. 405-414, oct. 1937, doi: 10.1016/S0002-8703(37)90519-2.
- [7] G. Masuyer, C. J. Yates, E. D. Sturrock, et K. R. Acharya, « Angiotensin-I converting enzyme (ACE): structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence », *Biol. Chem.*, vol. 395, no 10, Art. no 10, oct. 2014, doi: 10.1515/hsz-2014-0157.
- [8] I. H. Page et O. M. Helmer, « A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator », *J. Exp. Med.*, vol. 71, no 1, Art. no 1, janv. 1940, doi: 10.1084/jem.71.1.29.

- [9] S. P. Bottari, M. de Gasparo, U. M. Steckelings, et N. R. Levens, « Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications », *Front Neuroendocrinol*, vol. 14, no 2, p. 123-171, avr. 1993, doi: 10.1006/frne.1993.1005.
- [10] M. Mukoyama, M. Nakajima, M. Horiuchi, H. Sasamura, R. E. Pratt, et V. J. Dzau, « Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors », *J Biol Chem*, vol. 268, no 33, p. 24539-24542, nov. 1993.
- [11] L. Hunyady et K. J. Catt, « Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II », *Mol Endocrinol*, vol. 20, no 5, p. 953-970, mai 2006, doi: 10.1210/me.2004-0536.
- [12] P. Paradis, N. Dali-Youcef, F. W. Paradis, G. Thibault, et M. Nemer, « Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no 2, p. 931-936, janv. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.2.931.
- [13] P. J. Lijnen, V. V. Petrov, et R. H. Fagard, « Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1) », *Mol Genet Metab*, vol. 71, no 1-2, p. 418-435, oct. 2000, doi: 10.1006/mgme.2000.3032.
- [14] J. C. Bihl et al., « Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: Role of the NFκB inflammatory pathway », *Vascul Pharmacol*, vol. 73, p. 115-123, oct. 2015, doi: 10.1016/j.vph.2015.08.007.
- [15] A. Nguyen Dinh Cat, A. C. Montezano, D. Burger, et R. M. Touyz, « Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature », *Antioxid Redox Signal*, vol. 19, no 10, p. 1110-1120, oct. 2013, doi: 10.1089/ars.2012.4641.
- [16] T. Shibata, C. Suzuki, J. Ohnishi, K. Murakami, et H. Miyazaki, « Identification of regions in the human angiotensin II receptor type 1 responsible for Gi and Gq coupling by mutagenesis study », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 218, no 1, Art. no 1, janv. 1996, doi: 10.1006/bbrc.1996.0067.
- [17] S. K. Shenoy et R. J. Lefkowitz, « β-arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction », *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 32, no 9, Art. no 9, sept. 2011, doi: 10.1016/j.tips.2011.05.002.
- [18] E. Reiter et al., « β-arrestin signalling and bias in hormone-responsive GPCRs », *Mol Cell Endocrinol*, vol. 449, p. 28-41, juill. 2017, doi: 10.1016/j.mce.2017.01.052.
- [19] R. M. Carey, N. L. Howell, X. H. Jin, et H. M. Siragy, « Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats », *Hypertension*, vol. 38, no 6, p. 1272-1277, déc. 2001, doi: 10.1161/hy1201.096576.
- [20] R. M. Carey et S. H. Padia, « Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure », *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 19, no 3, Art. no 3, avr. 2008, doi: 10.1016/j.tem.2008.01.003.
- [21] P. Namsolleck, C. Recarti, S. Foulquier, U. M. Steckelings, et T. Unger, « AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications », *Curr Hypertens Rep*, vol. 16, no 2, p. 416, févr. 2014, doi: 10.1007/s11906-013-0416-6.
- [22] B. A. Kemp, N. L. Howell, J. J. Gildea, S. R. Keller, S. H. Padia, et R. M. Carey, « AT₂ receptor activation induces natriuresis and lowers blood pressure », *Circ Res*, vol. 115, no 3, p. 388-399, juill. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304110.
- [23] T. N. Vieira et al., « Angiotensin type 2 receptor antagonism as a new target to manage gout », *Inflammopharmacology*, sept. 2022, doi: 10.1007/s10787-022-01076-x.
- [24] B. Sehnert, V. Valero-Esquitino, G. Schett, T. Unger, U. M. Steckelings, et R. E. Voll, « Angiotensin AT2 Receptor Stimulation Alleviates Collagen-Induced Arthritis by Upregulation of Regulatory T Cell Numbers », *Frontiers in Immunology*, vol. 13, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.921488.

- [25] O. Ritter et al., « AT2 receptor activation regulates myocardial eNOS expression via the calcineurin-NF-AT pathway », *FASEB J*, vol. 17, no 2, p. 283-285, févr. 2003, doi: 10.1096/fj.02-0321fje.
- [26] J. Zhang et R. E. Pratt, « The AT2 receptor selectively associates with G α 2 and G α 3 in the rat fetus », *J Biol Chem*, vol. 271, no 25, p. 15026-15033, juin 1996.
- [27] J. L. Hansen, G. Servant, T. J. Baranski, T. Fujita, T. Iiri, et S. P. Sheikh, « Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation », *Circ Res*, vol. 87, no 9, p. 753-759, oct. 2000, doi: 10.1161/01.res.87.9.753.
- [28] A. Connolly, B. J. Holleran, É. Simard, J.-P. Baillargeon, P. Lavigne, et R. Leduc, « Interplay between intracellular loop 1 and helix VIII of the angiotensin II type 2 receptor controls its activation », *Biochem Pharmacol*, vol. 168, p. 330-338, oct. 2019, doi: 10.1016/j.bcp.2019.07.018.
- [29] L. Hein, L. Meinel, R. E. Pratt, V. J. Dzau, et B. K. Kobilka, « Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand », *Mol Endocrinol*, vol. 11, no 9, p. 1266-1277, août 1997, doi: 10.1210/mend.11.9.9975.
- [30] H. Zhang et al., « Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors », *Nature*, vol. 544, no 7650, Art. no 7650, avr. 2017, doi: 10.1038/nature22035.
- [31] S. R. Tipnis, N. M. Hooper, R. Hyde, E. Karran, G. Christie, et A. J. Turner, « A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no 43, p. 33238-33243, oct. 2000, doi: 10.1074/jbc.M002615200.
- [32] World Health Organization, *Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults*. Geneva: World Health Organization, 2021. Consulté le: 6 octobre 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/344424>
- [33] G. F. King, M. C. Gentz, P. Escoubas, et G. M. Nicholson, « A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals », *Toxicon*, vol. 52, no 2, p. 264-276, août 2008, doi: 10.1016/j.toxicon.2008.05.020.
- [34] Q. Kaas, J.-C. Westermann, et D. J. Craik, « Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer », *Toxicon*, vol. 55, no 8, p. 1491-1509, juill. 2010, doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.002.
- [35] R. B. Merrifield, « Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no 14, p. 2149-2154, juill. 1963, doi: 10.1021/ja00897a025.
- [36] M. Maziarz et al., « Revealing the Activity of Trimeric G-proteins in Live Cells with a Versatile Biosensor Design », *Cell*, vol. 182, no 3, p. 770-785.e16, août 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.020.
- [37] P. Couvineau, C. Llorens-Cortes, et X. Iturriz, « Elabela/Toddler and apelin bind differently to the apelin receptor », *FASEB J*, vol. 34, no 6, p. 7989-8000, juin 2020, doi: 10.1096/fj.201903029R.
- [38] B. R. Conklin, Z. Farfel, K. D. Lustig, D. Julius, et H. R. Bourne, « Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq α to that of Gi α », *Nature*, vol. 363, no 6426, p. 274-276, mai 1993, doi: 10.1038/363274a0.
- [39] D. A. Hanck et M. F. Sheets, « Site-3 toxins and cardiac sodium channels », *Toxicon*, vol. 49, no 2, p. 181-193, févr. 2007, doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.017.
- [40] R. C. A. Cedro et al., « Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from Bothrops jararaca snake venom », *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, vol. 24, p. 33, 2018, doi: 10.1186/s40409-018-0170-y.
- [41] F. Ducancel, « The sarafotoxins », *Toxicon*, vol. 40, no 11, p. 1541-1545, nov. 2002, doi: 10.1016/s0041-0101(02)00159-9.
- [42] J. Ciolek et al., « MT9, a natural peptide from black mamba venom antagonizes the muscarinic type 2 receptor and reverses the M2R-agonist-induced relaxation in rat and human arteries », *Biomed Pharmacother*, vol. 150, p. 113094, juin 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113094.

- [43] W. C. Hodgson et G. K. Isbister, « The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery », *Curr Opin Pharmacol*, vol. 9, no 2, p. 173-176, avr. 2009, doi: 10.1016/j.coph.2008.11.007.
- [44] E. R. Porrello, L. M. D. Delbridge, et W. G. Thomas, « The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor », *Front Biosci (Landmark Ed)*, vol. 14, no 3, p. 958-972, janv. 2009, doi: 10.2741/3289.
- [45] S. Miura et S. S. Karnik, « Angiotensin II type 1 and type 2 receptors bind angiotensin II through different types of epitope recognition », *J. Hypertens.*, vol. 17, no 3, p. 397-404, mars 1999, doi: 10.1097/00004872-199917030-00013.
- [46] Y. Yamano et al., « Mutagenesis and the molecular modeling of the rat angiotensin II receptor (AT1) », *J Biol Chem*, vol. 270, no 23, p. 14024-14030, juin 1995, doi: 10.1074/jbc.270.23.14024.
- [47] K. Noda, Y. Saad, et S. S. Karnik, « Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation », *J Biol Chem*, vol. 270, no 48, p. 28511-28514, déc. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.48.28511.
- [48] I. Kufareva, M. Rueda, V. Katritch, R. C. Stevens, R. Abagyan, et GPCR Dock 2010 participants, « Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment », *Structure*, vol. 19, no 8, p. 1108-1126, août 2011, doi: 10.1016/j.str.2011.05.012.
- [49] B. F. O'Dowd et al., « A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11 », *Gene*, vol. 136, no 1-2, p. 355-360, déc. 1993, doi: 10.1016/0378-1119(93)90495-o.
- [50] E. Marsault et al., « The apelinergic system: a perspective on challenges and opportunities in cardiovascular and metabolic disorders », *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1455, no 1, p. 12-33, nov. 2019, doi: 10.1111/nyas.14123.
- [51] K. Shin, C. Kenward, et J. K. Rainey, « Apelinergic System Structure and Function », *Compr Physiol*, vol. 8, no 1, p. 407-450, déc. 2017, doi: 10.1002/cphy.c170028.
- [52] T. Sakurai, M. Yanagisawa, et T. Masaki, « Molecular characterization of endothelin receptors », *Trends Pharmacol Sci*, vol. 13, no 3, p. 103-108, mars 1992, doi: 10.1016/0165-6147(92)90038-8.
- [53] M. Barton et M. Yanagisawa, « Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy », *Hypertension*, vol. 74, no 6, p. 1232-1265, déc. 2019, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12105.
- [54] J. Urbach et S. R. Goldsmith, « Vasopressin antagonism in heart failure: a review of the hemodynamic studies and major clinical trials », *Ther Adv Cardiovasc Dis*, vol. 15, p. 1753944720977741, déc. 2021, doi: 10.1177/1753944720977741.
- [55] S. Allison, « Cryo-EM structure of AVP-V2 receptor complex », *Nat Rev Nephrol*, vol. 17, no 8, p. 511, août 2021, doi: 10.1038/s41581-021-00456-w.
- [56] V. Sabareesh et al., « Characterization of contryphans from *Conus lorioisii* and *Conus amadis* that target calcium channels », *Peptides*, vol. 27, no 11, p. 2647-2654, nov. 2006, doi: 10.1016/j.peptides.2006.07.009.
- [57] E. K. M. Lebbe et J. Tytgat, « In the picture: disulfide-poor conopeptides, a class of pharmacologically interesting compounds », *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, vol. 22, p. 30, 2016, doi: 10.1186/s40409-016-0083-6.
- [58] S. Dutertre et al., « Conopressin-T from *Conus tulipa* reveals an antagonist switch in vasopressin-like peptides », *J Biol Chem*, vol. 283, no 11, p. 7100-7108, mars 2008, doi: 10.1074/jbc.M706477200.
- [59] J. Giribaldi et al., « Synthesis, Pharmacological and Structural Characterization of Novel Conopressins from *Conus miliaris* », *Mar Drugs*, vol. 18, no 3, p. E150, mars 2020, doi: 10.3390/md18030150.
- [60] T. Kawamura, T. Oda, et T. Muramatsu, « Purification and characterization of a dipeptidyl carboxypeptidase from the polychaete *Neanthes virens* resembling angiotensin I converting enzyme

», *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, vol. 126, no 1, p. 29-37, mai 2000, doi: 10.1016/s0305-0491(00)00177-2.

[61] R. Satou, T. Nakagawa, H. Ido, M. Tomomatsu, F. Suzuki, et Y. Nakamura, « Angiotensin II and III upregulate body fluid volume of the clam worm *Perinereis* sp. via angiotensin II receptors in different manners », *Peptides*, vol. 26, no 12, p. 2452-2457, déc. 2005, doi: 10.1016/j.peptides.2005.05.017.

[62] S. Reynaud et al., « A Venomics Approach Coupled to High-Throughput Toxin Production Strategies Identifies the First Venom-Derived Melanocortin Receptor Agonists », *J Med Chem*, vol. 63, no 15, p. 8250-8264, août 2020, doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00485.

[63] T. J. Murphy, R. W. Alexander, K. K. Griendling, M. S. Runge, et K. E. Bernstein, « Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor », *Nature*, vol. 351, no 6323, p. 233-236, mai 1991, doi: 10.1038/351233a0.

[64] S. Shanmugam, C. Llorens-Cortes, E. Clauser, P. Corvol, et J. M. Gasc, « Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland », *Am J Physiol*, vol. 268, no 5 Pt 2, p. F922-930, mai 1995, doi: 10.1152/ajprenal.1995.268.5.F922.

4.5 CONCLUSION - DISCUSSION

En complément des questionnements émis dans la discussion de l'article, des expériences complémentaires ont été réalisées.

4.5.1 EFFET DE A-CTX-cMILA SUR L'ACTIVITE CONSTITUTIVE DU RECEPTEUR AT1

Le récepteur AT1 est connu pour avoir une activité constitutive en l'absence d'AngII ou d'autres stimulations, activité bloquée notamment par le candésartan, ayant alors un effet agoniste inverse. Nous avons donc émis l'hypothèse que la toxine pouvait potentiellement bloquer l'activité constitutive du récepteur. Le pool constitutivement actif de récepteurs AT1 est estimé à environ 5% du total de récepteurs AT1 dans une cellule (Unal and Karnik, 2014). C'est pourquoi il est difficile de détecter une activité constitutive avec les tests de dosages fonctionnels classiques dans les cellules transfectées exprimant le récepteur AT1. Comment alors quantifier cette activation constitutive ? Il est possible (a) d'augmenter la quantité de cellules drastiquement (pour augmenter le taux basal d'activation) pour voir si la toxine a un effet sur ce taux de base devenu détectable ; il est aussi possible (b) d'utiliser des récepteurs constitutivement actifs. Dans ce dernier cas, de nombreux travaux ont été menés dans l'idée de trouver des mutants du récepteur AT1 constitutivement actifs. Parmi ces mutants, la mutation N111G (l'asparagine en position 111 est remplacée par une glycine) est un outil pour la caractérisation pharmacologique de cette activité (Feng et al., 1998). En effet, comme mentionné dans l'introduction, il y a une interaction stable entre l'Asn111 et l'Asn295 du récepteur quand le récepteur AT1 est dans un état inactif. L'activation du récepteur destabilise cette interaction entraînant le pivotement du TM6. Ainsi, destabiliser cette interaction, par l'introduction d'une mutation au niveau de l'Asn111 en l'occurrence, permet d'induire une activité constitutive du récepteur (Feng et al., 1998).

Nous avons donc voulu savoir si AT1 possédait une activité constitutive de base qui serait bloquée en présence de toxine. Pour cela nous avons transfecté des cellules HEK293T avec le plasmide AT1-N111G-YFP (que nous avons produit au laboratoire) ou le plasmide AT1-YFP. Nous avons comparé l'effet de la toxine et du candésartan sur la production d'IP1 *via* les récepteurs AT1 et AT1-N111G par HTRF (**Figure 59**).

Concernant le récepteur AT1, 1 μ M d'AngII induit logiquement la production d'IP1.

Concernant le récepteur AT1-N111G, 1 μ M d'AngII induit aussi la production d'IP1, à hauteur de celle induite par le récepteur AT1. En revanche, en absence de ligand, nous observons une production d'IP1 à hauteur de la production d'IP1 induite par l'AngII. Nous pouvons donc valider la construction

AT1-N111G-YFP comme récepteur constitutivement actif. En présence de 100 μ M de A-CTX-cMila ou de 1 μ M de candésartan, la production d'IP1 est significativement diminuée de 40% et 38% respectivement, signe que la toxine et le candésartan bloquent effectivement l'activité constitutive de production d'IP1 par le récepteur (Figure 59).

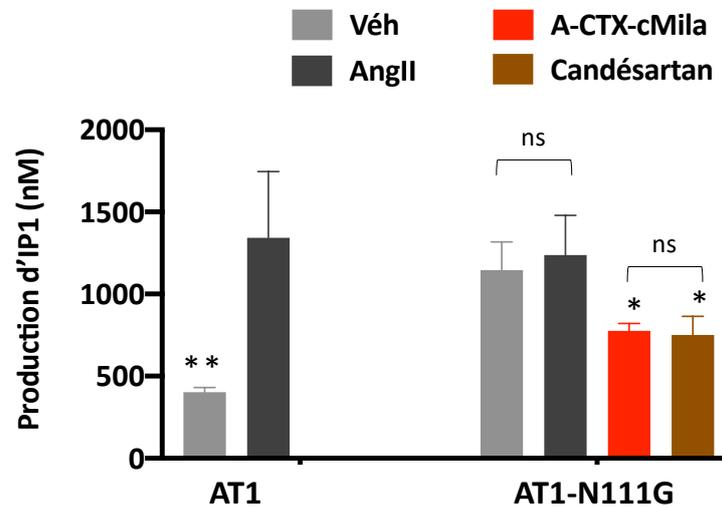


Figure 59: Mise en évidence de l'activité constitutive du récepteur AT1. Les cellules HEK293T sont transfectées avec les plasmides codant pour le récepteur mutant AT1-N111G ou le récepteur AT1. La figure représente la production d'IP1 par les récepteurs AT1 et AT1-N111G respectivement. Les cellules sont stimulées ou non pendant 45 min en présence d'AngII 1 μ M, de A-CTX-cMila 100 μ M ou de candésartan 1 μ M. La production d'IP1 est mesurée grâce au kit de dosage HTRF Cisbio. Les valeurs représentent la moyenne de 3 réplicats d'une expérience, expérience représentative de 3 autres expériences. ns : pas de différence significative ; * : $p < 0,05$ et ** : $p < 0,0001$, significativement différent par rapport à la réponse maximale en présence d'AngII.

4.5.2 ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITE DE A-CTX-CMILA

Dans l'idée de valider la caractérisation *in vitro*, il est nécessaire de vérifier l'absence de cytotoxicité de la toxine afin d'éliminer un biais possible sur les résultats des tests fonctionnels. Pour cela des cellules CHO-AT1a-EGFP ont été marquées à l'iodure de propidium après traitement par la toxine. L'iodure de propidium est un intercalant de l'ADN qui ne peut pas traverser une membrane cytoplasmique intacte. Il pénètre par contre dans les cellules dont la membrane est endommagée et est classiquement utilisé comme marqueur de cellules nécrotiques.

Comme montré **Figure 60A**, les cellules contrôles ne sont que très peu marquées à l'iodure de propidium. En présence de 0,1% de triton-X100 (agent de perméabilisation membranaire), quasiment toutes les cellules sont logiquement marquées à l'iodure de propidium. En revanche, en présence de

100 μM de toxine, les cellules ne sont pas plus marquées que les cellules contrôles, signe que l'iodure de propidium ne peut pas rentrer dans les cellules (**Figure 60A**). De plus, en contraste de phase, la morphologie des cellules n'est pas affectée par la toxine *a contrario* du triton qui leur confère une forme plus arrondie et grumeleuse. La toxine ne semble donc pas altérer l'intégrité de la membrane cellulaire.

Le test de viabilité cellulaire AlamarBlue (variant du test MTT classique) est basé sur le principe de la réduction de la résazurine, réactif bleu perméant non fluorescent, en un composé fluorescent, la résarufine, par les activités réductases mitochondriales des cellules vivantes. L'intensité de fluorescence de la résarufine présente dans le milieu est alors corrélée à la viabilité cellulaire. Comme observé **Figure 60B**, le traitement des cellules avec du triton-X100 0,1%, supposé entrainer la mort de la totalité des cellules, entraine, comme attendu, une diminution quasi totale de la fluorescence. En revanche, l'incubation des cellules en présence de A-CTX-cMila à 100 μM n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire.

Les résultats de ces expériences montrent que la toxine A-CTX-cMila est dépourvue d'effets cytotoxiques sur la période de temps testée.

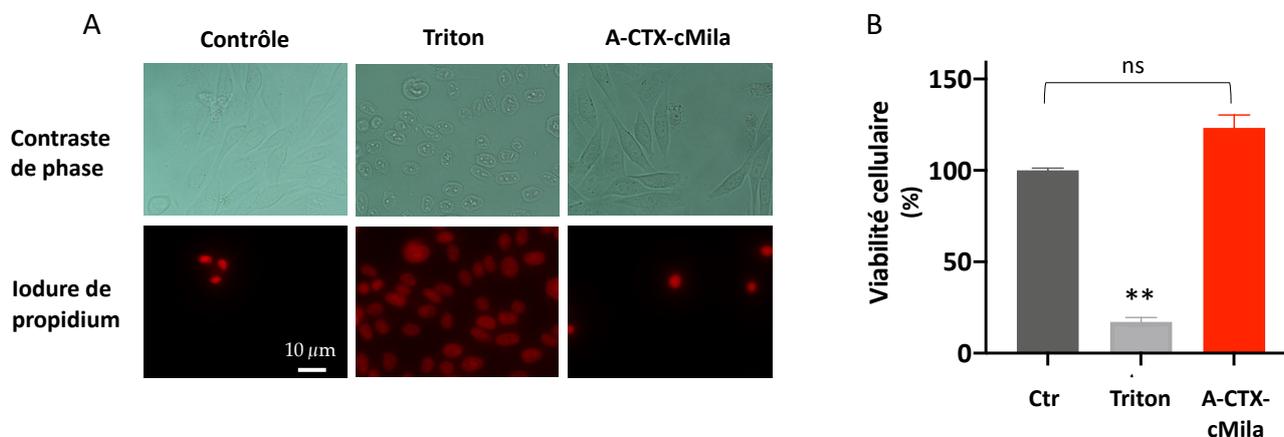


Figure 60: Évaluation de la cytotoxicité de A-CTX-cMila. (A) Images en microscopie de cellules CHO-AT1a-EGFP marquées à l'iodure de propidium en présence de triton-X100 0,1% ou de A-CTX-cMila 100 μM . La toxine est préincubée avec les cellules pendant 30 min avant ajout de l'iodure de propidium. (B) Mesure de la viabilité cellulaire. Les cellules CHO-AT1a-EGFP sont incubées en présence de triton-X100 0,1% ou de A-CTX-cMila 100 μM . La toxine est préincubée avec les cellules pendant 30 min avant ajout d'AlamarBlue pendant 1h avant mesure de la fluorescence (excitation à 545 nm/émission à 600 nm). Les résultats sont représentatifs d'une expérience parmi 3 indépendantes. Ctr : contrôle ; ns : pas de différence significative ; **: $p < 0,0001$, significativement différent par rapport à la réponse maximale.

Bilan :

Comme expliqué dans la publication, A-CTX-cMila est la première toxine caractérisée d'un point de vue fonctionnel agissant sur les récepteurs aux angiotensines. Elle a une affinité submicromolaire pour le récepteur AT1 et micromolaire pour le récepteur AT2. Elle bloque également la liaison de l'AngII fluorescente (Cy3 et Cy5) aux cellules vivantes montrant que le site de liaison de la toxine est localisé sur la partie extracellulaire des récepteurs AT1 et AT2.

Compte tenu de la faible affinité de A-CTX-cMila pour le récepteur AT2, et des difficultés à caractériser les voies de signalisation de AT2 (*cf* Chapitre 5), l'étude fonctionnelle de la toxine a été réalisée uniquement sur le récepteur AT1. Elle possède les caractéristiques d'un antagoniste compétitif du récepteur AT1 sur les voies dépendantes et indépendantes des protéines G : elle bloque l'activation de $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i3}$, $G_{\alpha oA}$, le recrutement de la β -arrestine 2 et bloque l'activation des MAP kinases ERK1/2. Nous suggérons aussi que la toxine aurait une activité agoniste inverse au moins sur la voie $G_{\alpha q}$ puisqu'elle réduit la production d'IP1 induite par le récepteur mutant AT1-N111G constitutivement actif. De plus, aucune toxicité cellulaire n'a été associée à l'utilisation de la toxine à des doses supra maximales pendant la période de temps testée.

A-CTX-cMila appartient à la famille des conotoxines dont, jusqu'à présent, on estime que moins de 1 % a été caractérisé (Kaas et al., 2012). La nature cyclique de A-CTX-cMila n'est pas commune dans la famille des conotoxines et se trouve seulement dans les familles des contryphans et des conopressines. Les contryphans ciblent les canaux calciques, n'ont aucune homologie de séquence avec A-CTX-cMila et possèdent une boucle de 5 résidus (Lebbe and Tytgat, 2016; Sabareesh et al., 2006). Les conopressines sont apparentées à la vasopressine et à l'ocytocine, peptides endogènes qui se lient respectivement aux récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine, et agissent sur ces mêmes récepteurs (Dutertre et al., 2008). Comme A-CTX-cMila, les conopressines ont une boucle de 4 résidus mais en dehors de cette propriété structurale, elle ne présentent aucune homologie de séquence avec A-CTX-cMila et aucune similitude dans leurs profils pharmacologiques. En effet, A-CTX-cMila n'a aucun effet sur les récepteurs de la vasopressine, démontrant que la toxine est le premier membre d'un nouveau groupe de conotoxines cycliques associé à une nouvelle fonction.

Notre étude a été réalisée sur des récepteurs de mammifères alors que *Conus miliaris* est un prédateur de vers marins de la famille des *Eunicid polychaetes* (Duda and Lee, 2009). Si ce biais expérimental peut expliquer les affinités modérées de A-CTX-cMila sur AT1 et AT2, cela pourrait en revanche révéler un rôle biologique de la toxine pour la prédation et/ou la défense. En effet, de plus

en plus d'effecteurs du SRA sont découverts chez les invertébrés, tels que des peptides de type angiotensinogène, des enzymes de type rénine et de type ECA (Kawamura et al., 2000). Nous pouvons considérer que la toxine pourrait agir par le biais du système SRA du ver dans une stratégie de prédation.

Pour poursuivre la caractérisation de A-CTX-cMila, il serait intéressant de réaliser des expériences *in vitro* pour mieux définir son profil de sélectivité, ainsi que sur des récepteurs de vers marins, ainsi que *ex vivo* notamment pour tester son effet sur la contractilité par exemple des artères mésentériques isolées de rat. Il s'agit en effet d'un des modèles de choix pour l'étude des ligands d'AT1, car ce récepteur y est fortement exprimé et impliqué dans le phénomène de vasoconstriction (Dal-Ros et al., 2010).

5 Résultats : Mise au point des tests de fonction sur le récepteur AT2

5.1 PREAMBULE

Le criblage de la banque Venomics de toxines synthétiques sur le récepteur AT2 a permis l'identification des 3 toxines A-CTX-cMila, A-TRTX-Por1a et A-CTX-MilVa. Afin de déterminer quel est leur mécanisme d'action sur le récepteur AT2, une étude des voies de signalisation en aval de ce récepteur a été menée.

Comme mentionné dans l'introduction, les voies de signalisation activées par le récepteur AT2 ne sont pas clairement établies et il y a encore peu de certitudes quant aux réels effecteurs intracellulaires impliqués. Bien qu'AT2 appartienne à la famille des RCPG de part sa séquence et sa structure, sa capacité à activer les protéines G n'a toujours pas été clairement démontrée (Rodrigues-Ferreira and Nahmias, 2010). Néanmoins quelques études suggèrent qu'il serait couplé à G α i dans certains types cellulaires (Zhang and Pratt, 1996). Nous avons donc entrepris de déterminer, dans un système d'expression hétérologue comme ceux que nous utilisons, si nous étions capables d'observer le couplage d'AT2 à la protéine G α i ou d'autres protéines G, par différentes approches expérimentales.

5.2 ACTIVATION DE LA VOIE GAI PAR LE RECEPTEUR AT2

5.2.1 UTILISATION DE BIOSENSEURS DE BRET

Pour investiguer le couplage de AT2 à G α i, nous avons voulu mettre en place un test de mesure d'activation de G α i par l'utilisation de ces biosenseurs. Ce système a également été utilisé pour étudier l'effet de la toxine A-CTX-cMila sur le couplage du récepteur AT1 à la protéine G α i (cf article chapitre 4). Pour cela, nous avons transfecté des cellules HEK293T avec le récepteur AT1 ou AT2, la protéine G α i3-YFP et la protéine mas-KB-1753-Nanoluc. L'effet de l'AngII sur le niveau de BRET a été testé pour les deux récepteurs. La courbe cinétique (**Figure 61**) montre qu'en absence d'AngII le niveau de BRET est faible et stable tout au long de l'expérience. L'ajout d'AngII aux cellules exprimant le récepteur AT1 provoque une augmentation rapide et importante du signal de BRET, atteignant un plateau à un niveau d'environ 7 fois le niveau basal au bout de 50 s. En revanche, pour le récepteur AT2, aucune variation du niveau de BRET n'est observée après administration d'AngII.

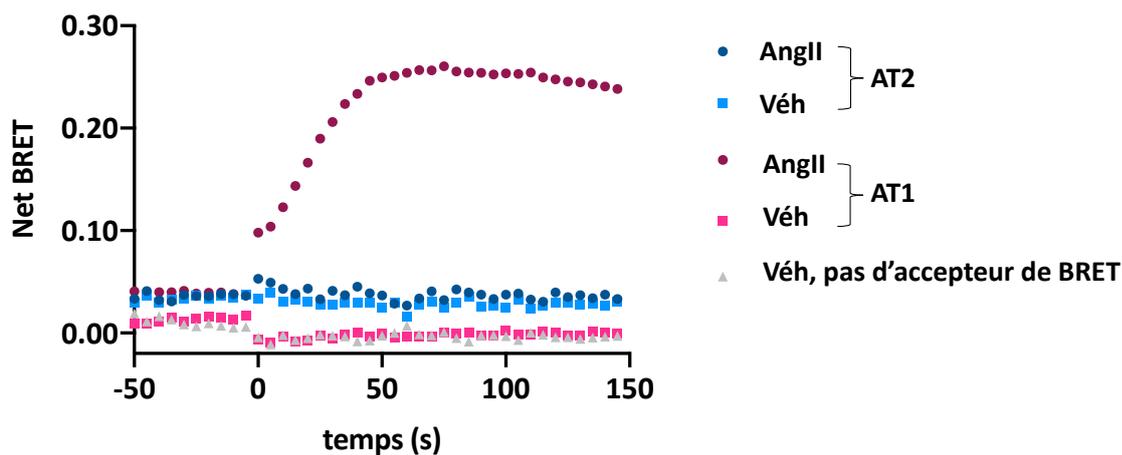


Figure 61: Activation de la voie *Gai3* via les récepteurs AT1 et AT2 par l'utilisation de biosenseurs de BRET. Des cellules HEK293T sont transfectées avec les plasmides codant pour les récepteurs AT1 ou AT2, mas-KB-1753-Nanoluc et *Gai3*-YFP. Les cellules sont stimulées ou non par 10 nM d'AngII. n=2, Véh : véhicule. Le Net BRET est calculé comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes » de l'article.

5.2.2 DOSAGE DE SECONDS MESSAGERS : DOSAGE D'IP1 GRACE A LA PROTEINE CHIMERIQUE G α QI9

Face à l'impossibilité de mettre en évidence un couplage à *Gai* de AT2 par l'utilisation de biosenseurs de BRET, nous avons détourné le couplage vers la voie classiquement activée par la protéine *G α q*. Pour cela, il faut exprimer dans les cellules la protéine chimérique *G α qi9*, protéine *G α q* dont les 9 derniers acides aminés ont été substitués par ceux de la protéine *Gai* (Conklin et al., 1993). Dans ces conditions, si le récepteur AT2 est couplé *Gai*, il activera la protéine *G α qi9* via son interaction avec l'extrémité C-terminale de la protéine G (correspondant à la séquence de *Gai*) qui pourra ensuite activer la phospholipase C et induire une production d'inositol phosphates comme le ferait une protéine *G α q* « normale ». Nous avons donc transfecté des cellules HEK293T avec le récepteur AT2 ou AT1 et la protéine *G α qi9*. L'activité de la phospholipase C est mesurée grâce à un kit de dosage par HTRF de l'IP1, issu de la dégradation de l'IP3, produit primaire de l'activité de la phospholipase C (cf 2.2.1). Les résultats (**Figure 62**) montrent que l'activation du récepteur AT1 par l'AngII provoque une réduction du rapport de FRET, qui traduit une augmentation de la concentration d'IP1 et donc de l'activité de la phospholipase C. En revanche, dans les cellules exprimant le récepteur AT2, aucune variation significative du rapport de FRET n'est observée en présence d'AngII. Il apparaît donc clairement que le récepteur AT2 n'est pas capable d'activer la protéine *G α qi9* dans les conditions expérimentales testées. Dans ces conditions de co-expression du récepteur AT1 avec *G α qi9*, nous ne

pouvons pas exclure qu'une composante Gαq intrinsèque participe à la production d'IP1 observée pour le récepteur AT1.

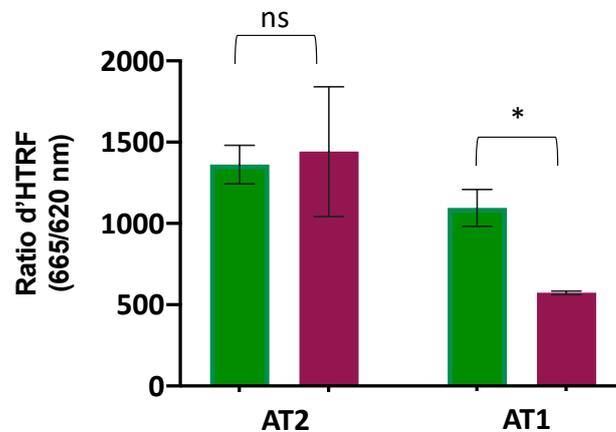


Figure 62: Effet de l'AngII sur la production d'IP1 par des cellules exprimant les récepteurs AT1 ou AT2 *via* la voie Gαi3. Les cellules HEK293T sont transfectées avec les plasmides codant pour les récepteurs d'intérêt et Gαq9. Les cellules sont stimulées ou non par l'AngII (1 μM) pendant 45 min. La production d'IP1 impliquant la voie Gαq/PLC après activation de Gαi est mesurée grâce au kit de dosage HTRF Cisbio. Les résultats sont exprimés en rapport d'HTRF, n=2 (AT2), n=3 (AT1). Véh : véhicule. *<0,05.

Ces données suggèrent que contrairement à certains articles dans la littérature montrant l'implication de la voie Gαi dans la signalisation du récepteur AT2, celui-ci n'est pas couplé directement ou indirectement à la protéine Gαi3 dans notre modèle d'étude.

5.3 ACTIVATION DE LA VOIE GS PAR LE RECEPTEUR AT2

Les résultats précédents ne permettant pas de montrer que le récepteur AT2 active la voie Gαi, nous avons testé la possibilité qu'il soit couplé à la protéine Gαs. Dans ce cas, son activation par l'AngII augmenterait l'activité de l'adénylate cyclase et donc les taux d'AMPc.

Pour tester cette hypothèse nous avons utilisé la lignée cellulaire CHO-AT2-EGFP (*cf* article chapitre 4) et mesuré la production d'AMPc comme décrit ci-dessus à l'aide d'un kit de dosage HTRF. Comme le montrent les résultats (**Figure 63**) l'ajout de FSK, activateur direct de l'adénylate cyclase provoque une forte diminution du rapport HTRF (665/620 nm) signe d'une augmentation des taux d'AMPc. Par contre, en présence d'AngII, la réponse n'est pas significativement différente par rapport au contrôle négatif. Ces résultats suggèrent qu'AT2 n'est pas non plus couplé à la protéine Gαs (**Figure 63**).

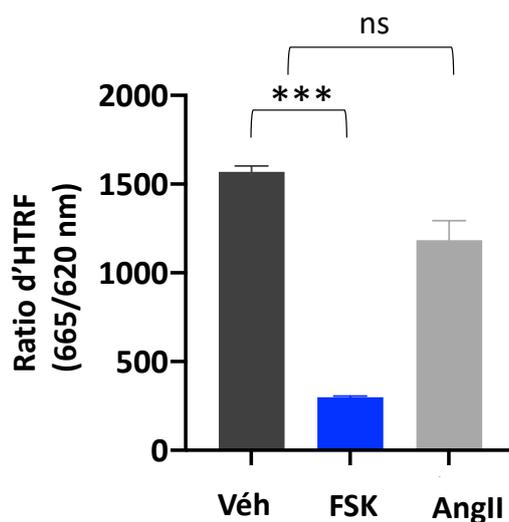


Figure 63: Mesure de la production d'AMPc après stimulation de CHO-AT2-EGFP *via* la voie G α s. Les cellules sont stimulées ou non par l'AngII (1 μ M) ou la FSK (1 μ M) pendant 45 min. La production d'AMPc est mesurée grâce au kit de dosage HTRF Cisbio. Les valeurs sont exprimées en rapport d'HTRF, n=2. Véh : véhicule, FSK : forskoline. ***<0,0001.

5.4 ACTIVATION DE LA VOIE GQ PAR LE RECEPTEUR AT2

Contrairement à AT1, le récepteur AT2 n'est pas décrit comme couplé G α q. Cependant, face aux nombreuses zones d'ombre concernant encore le couplage aux protéines G, nous avons voulu savoir si AT2 pouvait induire la production d'IP1 dans un système d'expression hétérologue. Pour cela les cellules CHO-AT1a-EGFP et CHO-AT2-EGFP ont été stimulées par de l'AngII et la production d'IP1 mesurée grace au kit de dosage HTRF.

Comme observé **Figure 64**, 1 μ M d'AngII entraîne une diminution du rapport d'HTRF (665/620 nm) et donc une augmentation de la production d'IP1 sur les cellules CHO-AT1a-EGFP, ce qui est logique compte tenu du couplage majoritaire du récepteur AT1 à la protéine G α q. En revanche, l'administration de 1 μ M d'AngII ne provoque aucun changement du rapport d'HTRF indiquant que la liaison de l'AngII à AT2 n'entraîne pas d'augmentation de production d'IP1. Le récepteur AT2 ne semble donc pas couplé à la voie G α q dans notre modèle d'étude.

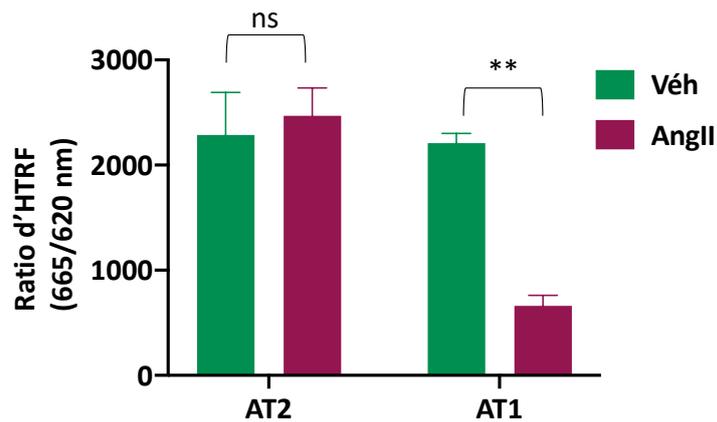


Figure 64: Mesure de la production d'IP1 après stimulation de CHO-AT1a-EGFP et CHO-AT2-EGFP *via* la voie $G\alpha q/PLC$. Les cellules sont stimulées ou non par l'AngII (1 μM) pendant 45 min. La production d'IP1 est mesurée grâce au kit de dosage HTRF Cisbio. Les résultats sont exprimés en rapport d'HTRF, n=2. Véh : véhicule. **<0,001.

5.5 ACTIVATION DE ERK1/2 PAR LE RECEPTEUR AT2

Pour déterminer la capacité de l'AngII à induire la phosphorylation de ERK1/2 par AT2 nous avons utilisé deux méthodes complémentaires. L'une plus quantitative fondée sur un test de type HTRF (phospho-ERK) et l'autre par la méthode classique du western-blot. Dans les deux cas, le principe est de détecter et quantifier la forme phosphorylée des MAP kinases ERK1/2, forme active de ces kinases.

La régulation de l'activité des MAP kinases ERK1/2 par AT2 a été observée dans plusieurs modèles mais les mécanismes ne sont pas clairement établis. Il a été montré que l'activation d'AT2 pouvait à la fois conduire soit à l'activation soit à l'inhibition des ERK1/2. En effet, même si certaines équipes ont montré que *in vivo* l'AngII provoque l'activation de ERK *via* le récepteur AT2 (Hagihara et al., 2014), il a aussi été montré que l'antagoniste sélectif d'AT2 PD123319 ne diminue pas la phosphorylation de ERK (Pinzar et al., 2005). Nous avons voulu évaluer si le récepteur AT2 était capable d'induire la phosphorylation de ERK1/2. Pour cela, les cellules CHO-AT1a-EGFP et CHO-AT2-EGFP ont été stimulées par de l'AngII et la phosphorylation des ERK1/2 évaluée par les deux méthodes décrites précédemment.

Comme montré **Figure 65A**, l'AngII provoque une augmentation du rapport HTRF (665/620 nm) dans les cellules CHO-AT1a-EGFP, résultats concordant avec ceux déjà décrits (*cf* article, chapitre 4). Un résultat équivalent est obtenu avec le PdBu (phorbol dibutyrate), activateur direct des PKC, très classiquement utilisé comme témoin positif. Cependant, dans les cellules CHO-AT2-EGFP, bien que le

PdBu produise une forte activation des ERK1/2, l'AngII ne provoque aucune modification du rapport d'HTRF. Ce résultat est confirmé par l'analyse par western-blot : nous observons une phosphorylation de ERK1/2 par l'AngII aussi intense que le contrôle positif PdBu pour les cellules CHO-AT1a-EGFP. Pour les cellules CHO-AT2-EGFP, l'AngII n'entraîne pas la phosphorylation de ERK1/2 (Figure 65B). Nos résultats montrent que dans notre modèle d'étude de cellules CHO exprimant de façon stable le récepteur AT2-EGFP, l'activation du récepteur AT2 ne provoque pas la phosphorylation de ERK1/2.

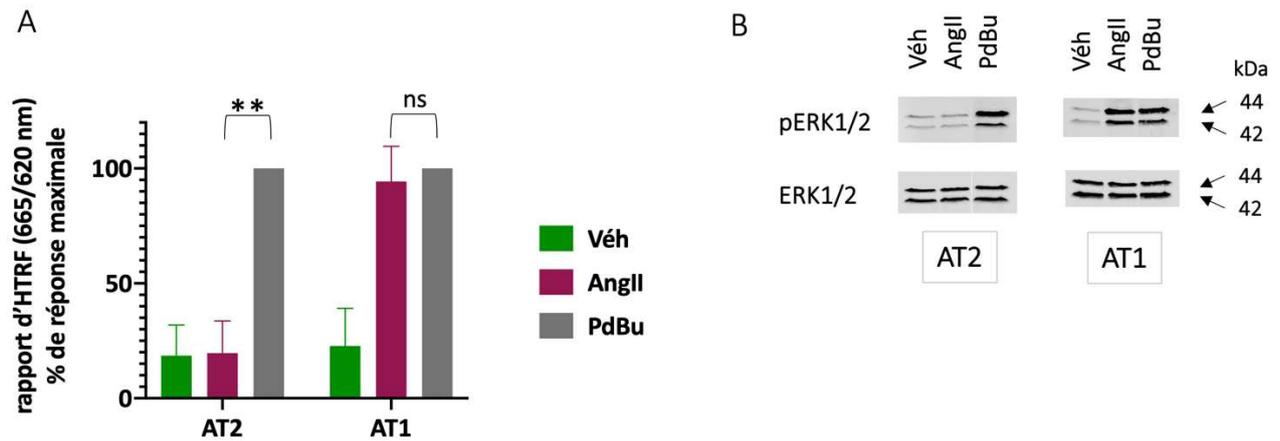


Figure 65: Activation de ERK1/2 médiée par l'AngII sur les cellules CHO-AT1a-EGFP et CHO-AT2-EGFP. (A) Phosphorylation de ERK1/2 en présence de 1 μ M d'AngII ou de 1 μ M de PdBu. Représentation de la moyenne de 2 expériences. Les niveaux de phosphorylation sont mesurés avec le kit HTRF. Les valeurs sont exprimées en % de la réponse maximale en rapport d'HTRF obtenu à 5 min de stimulation par 1 μ M d'AngII ou par 1 μ M de PdBu. (B) Analyse par western blot de la phosphorylation de ERK1/2. Les cellules ont été pré-incubées en présence ou absence de 150 μ M de toxine puis stimulées par 30 nM d'AngII. Résultats représentatifs de 3 expériences (pour AT1), ou de 2 expériences (pour AT2). Véh : véhicule ; PdBu : phorbol12, 13-dibutyrate. **<0,001.

5.6 CONCLUSION - DISCUSSION

Pour ce qui concerne l'étude du récepteur AT2, en plus du test de liaison faisant appel au radioligand ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII, nous avons pu mettre au point un test de caractérisation de la liaison par cytométrie de flux basé sur l'utilisation de la Cy5-AngII. Ce test a permis de montrer une diminution de la liaison de Cy5-AngII en présence de A-CTX-cMila sur les cellules CHO-AT2-EGFP. L'observation au microscope du marquage des cellules CHO-AT2-EGFP par la Cy3-AngII en présence ou en absence de toxine montre que le marquage reste périphérique même après une incubation à 37 °C, signe que le récepteur AT2 n'est pas internalisé après liaison à un agoniste, et que la toxine bloque la liaison de la Cy3-AngII aux cellules (*cf* article, chapitre 4).

En revanche, comme mentionné dans la littérature, les voies de signalisation impliquant le récepteur AT2 ne sont majoritairement pas celles classiquement décrites pour les RCPG en général. Nous avons été confrontés à cette problématique en ne parvenant pas à mettre en évidence de couplages intracellulaires, dans notre modèle cellulaire hétérologue, aux protéines G.

Néanmoins, nous pouvons confirmer que l'activation du récepteur AT2 n'entraîne pas de production d'IP1 ni d'AMPc : le récepteur n'est donc ni couplé à $G_{\alpha q}$ ni à $G_{\alpha s}$. Il n'entraîne pas non plus la phosphorylation de ERK1/2 et donc son activation. Concernant la voie $G_{\alpha i}$, l'utilisation de biosenseurs de BRET ($G_{\alpha i3}$ -YFP/mas-KB-1753-Nanoluc) met clairement en évidence que l'activation du récepteur AT2 n'entraîne pas d'augmentation du signal de BRET. Cela est confirmé par le dosage d'IP1 après co-transfection avec la protéine $G_{\alpha q i9}$ montrant qu'il n'y a pas de différence significative par rapport contrôle négatif après activation du récepteur AT2 par l'AngII.

Le couplage d'AT2 à $G_{\alpha i}$ est un sujet de controverse depuis des années. Si l'ensemble de nos données montrent qu'AT2 est un récepteur atypique et sont en accord avec certains résultats de la littérature qui montrent l'absence de couplage de ce récepteur aux protéines G, d'autres données vont dans le sens contraire. Toutefois, ces données sont généralement obtenues dans des contextes très particuliers, par exemple en utilisant des membranes de fœtus de rat solubilisées en présence de détergent, ou des membranes cellulaires lavées à l'urée et incubées avec des sous-unités de protéine G purifiées (Hansen et al., 2000; Zhang and Pratt, 1996).

A l'inverse, des études récentes réalisées dans des systèmes d'expression hétérologues, proches des nôtres, concluent à une absence de couplage à $G_{\alpha i}$ et d'autres protéines G. C'est le cas, par exemple de l'étude de Connolly et *al.* basée sur l'utilisation de biosenseurs de BRET, qui montre l'absence

de couplage d'AT2 aux protéines G α 2, G α q, G α 12, mais aussi aux β -arrestines 1 et 2 (Connolly et al., 2019).

Ces résultats soulignent le fait que AT2 ne se comporte pas comme la grande majorité des autres RCPG, même s'il présente une séquence et tous les motifs caractéristiques d'un RCPG. La résolution de la structure cristallographique (mentionné dans l'introduction, cf 1.1.1.4) d'AT2 en complexe avec différents ligands étayent le fait qu'il est possible que les disparités de structures avec AT1 notamment, expliquent une signalisation non canonique du récepteur AT2. De plus en plus d'articles discutent de l'appellation 'RCPG' de AT2, le qualifiant même d'« énigmatique » (Porrello et al., 2009).

Au final, il est possible qu'il y ait besoin d'un partenaire en plus entre le récepteur AT2 et G α i pour permettre le couplage, comme par exemple une hétérodimérisation avec un autre récepteur, et que les couplages observés dans certaines études soient un effet indirect qu'il reste clairement à identifier.

Perspectives

D'autres voies de signalisation activées après stimulation du récepteur AT2, indépendantes des protéines G ont été décrites. En effet, il a été montré que, chez le rat, l'AngII augmente les taux de GMPc au niveau aortique par une action médiée par le récepteur AT2, action bloquée par le PD123319 (Gohlke et al., 1998; Hiyoshi et al., 2004). Le GMPc est un second messager majeur synthétisé par une guanylate cyclase (GC) et dégradé par une phosphodiesterase (PDE) qui intervient dans les activités cellulaires en activant divers effecteurs protéiques. Aussi, il a été montré que AT2 peut réguler l'activité de protéines phosphatases. Dans le cas de la SHP-1, l'activation aurait lieu via la protéine ATIP1. Cette protéine interagit de manière constitutive avec le récepteur AT2 et est impliqué dans l'adressage et la signalisation du récepteur (Nouet et al., 2004; Wruck et al., 2005). Les protéines ATIPs appartiennent à la superfamille des GIPs (GPCRs-interacting protein) (Bockaert et al., 2004), identifiées ces dernières années comme des régulateurs majeurs du trafic et de la signalisation intracellulaire des RCPG, indépendamment des protéines G hétérotrimériques (Rodrigues-Ferreira and Nahmias, 2010).

Il serait intéressant de mettre en évidence ces voies dans nos modèles cellulaires afin de mettre en place un test fonctionnel fiable pour AT2 et pouvoir tester l'effet des toxines. Toutefois, l'analyse de ces voies, indépendantes des protéines G, n'est pas simple à mettre en oeuvre et les effets rapportés dans la littérature sont souvent faibles.

6 Conclusion - perspectives

Presque toute la première année de ma thèse a été consacrée à tenter de mener à bien l'idée initiale de mon projet : mettre en place un test de criblage de notre banque de toxines sur les récepteurs Mas et MrgD. Ces débuts ont été entachés par bien sûr la crise liée au SARS-CoV-2 et par l'impossibilité de mettre en place ce criblage. Nous sommes ensuite parvenus à cribler la banque de toxines sur le récepteur AT2, mettant en évidence 3 toxines au profil intéressant. Néanmoins, nous avons été confrontés à la fois à la difficulté de produire de manière chimique ces toxines et à mettre en place un test fonctionnel pour le récepteur AT2. Cependant, malgré ces embuches, nous sommes parvenus à caractériser une conotoxine, la première toxine animale antagoniste du récepteur AT1, bloquant à la fois les voies protéines G-dépendantes et la voie de la β -arrestine activées par ce récepteur, avec une affinité 100 fois meilleure pour le récepteur AT1 que pour AT2. Cette étude a pu être publiée dans la revue International Journal of Molecular Sciences (Van Baelen et al., 2023).

Une étude fonctionnelle des récepteurs Mas et MrgD à poursuivre

Le concept d'axe protecteur du SRA impliquant les récepteurs Mas et MrgD fait l'objet de recherches récentes et prometteuses. Ces récepteurs auraient pour ligands endogènes respectivement l'Ang1-7 et l'alamandine, peptides angiotensines dérivés de l'AngII. L'étude fonctionnelle de ces récepteurs nécessite d'être capable de mesurer la liaison d'un ligand au récepteur en question. Cependant, même si on peut lire dans de nombreuses revues et articles de recherche que l'Ang1-7 est le ligand naturel de Mas, il n'existe pas de preuve définitive que ce soit bien le cas. En effet, l'idée que l'Ang1-7 est le ligand préférentiel de Mas provient surtout d'études réalisées sur des modèles *ex vivo* et *in vivo*. Une seule équipe a réussi à montrer une liaison de la ^{125}I -Ang1-7 *in vitro* (Santos et al., 2003) alors que d'autres équipes quant à elles, prétendent que ce même ligand ne se lie pas à Mas (Gaidarov et al., 2018; Stoyell-Conti et al., 2021). En ce qui concerne le récepteur MrgD, aucune équipe n'a montré la liaison directe de l'alamandine sur ce récepteur.

Nous avons axé nos efforts sur la mise en place de tests de liaison pour l'Ang1-7 et Mas, et l'alamandine et MrgD, en tentant d'optimiser les conditions, de trouver le meilleur ligand, de s'assurer de la bonne fonctionnalité du récepteur. Malheureusement, aucune de nos tentatives n'a permis de détecter une liaison spécifique de l'Ang1-7 ou de l'alamandine sur Mas ou MrgD.

Mas et MrgD représentent des axes annexes du SRA décrits comme contrebalançant les effets physiologiques de l'axe ECA/AngII/AT1. Étant donné le potentiel physiopathologique de ces deux récepteurs, il est primordial d'axer la recherche sur la caractérisation fonctionnelle de ces récepteurs, pour clarifier la nature de leurs ligands naturels et mettre au point de nouveaux outils moléculaires pour mieux comprendre leur mode d'action et leur implication physiologique dans le système cardiovasculaire et dans le SRA. Par exemple, il serait envisageable d'utiliser les molécules de la série « AR » développées par l'équipe de D. Unett, pour mettre en place des tests de liaison et/ou fonction sur le récepteur Mas (Gaidarov et al., 2018).

Les premières toxines se liant aux récepteurs aux angiotensines AT1 et AT2

L'AngII module ses effets chez l'homme par liaison aux récepteurs aux angiotensines, AT1 et AT2. Étant un acteur central dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire et du système SRA, le récepteur AT1 est le mieux caractérisé dans cette famille. Néanmoins, le récepteur AT2 est aussi une cible préférentielle de l'AngII. Même s'il est nettement moins exprimé chez l'adulte que le récepteur AT1, notre intérêt s'est d'autant plus tourné vers ce récepteur qu'il aurait des effets physiologiques opposés à ceux du récepteur AT1. En revanche, au contraire du récepteur AT1, sa caractérisation pharmacologique est rendue difficile du fait qu'il existe encore beaucoup d'incertitudes concernant son mode d'action et sur les voies de transduction qu'il met en jeu.

Face à ces enjeux, nous avons criblé la banque Venomics sur le récepteur AT2 par un test de compétition avec la ¹²⁵I-Sar1, Ile8-AngII qui nous a permis de découvrir les 3 premières toxines animales se liant aux récepteurs AT1 et AT2 : la A-TRTX-Por1a, une ICK de 29 acides aminés issue de *Poecilotheria ornata* ; la A-CTX-MilVa, conotoxine de 19 acides aminés, issue de *Conus miliaris*, toutes 2 avec une affinité micromolaire pour les 2 récepteurs. Enfin, nous avons découvert A-CTX-cMila : une conotoxine cyclique de 7 acides aminés, issue de *Conus miliaris*. Son affinité pour le récepteur AT2 est de 28 µM et de 300 nM pour le récepteur AT1, elle présente donc un facteur de sélectivité d'environ 100 fois pour le récepteur AT1.

Nous avons ensuite cherché à déterminer quel était le mode d'action de ces trois toxines sur les récepteurs aux angiotensines. Pour répondre à cette question, il a fallu les produire chimiquement en grande quantité. Pour les toxines A-TRTX-Por1a et A-CTX-MilVa, cette production a été difficile, avec des rendements et des puretés assez moyens. Nous ne sommes pas parvenus à mettre en place un protocole d'oxydation de la A-TRTX-Por1a nous permettant de produire cette toxine en quantité

et qualité suffisantes. En revanche, nous avons réussi à mettre en place un protocole de pontage dirigé pour former sélectivement chaque forme possible de la A-CTX-MilVa, nous permettant ainsi de déterminer que la forme obtenue par oxydation spontanée correspond à la forme 'globular', avec un appariement des ponts I-III II-IV, appariement le plus commun pour ce type de toxines.

Un essai de caractérisation des toxines sur le récepteur AT2

Les voies de signalisation activées par le récepteur AT2 n'ont pas encore été clairement et complètement définies. En particulier, bien que de par sa séquence et sa structure il appartienne à la famille des RCPG, son couplage effectif aux protéines G reste un sujet controversé. De ce fait, le récepteur AT2 est souvent qualifié de RCPG « atypique », voire d'« énigmatique ». A la différence du récepteur AT1, le récepteur AT2 n'engagerait pas les voies $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12/13}$ et β -arrestine suite à son activation par l'AngII. Quelques études suggèrent son couplage à $G_{\alpha i}$ quand d'autres montrent le contraire. Nous avons été confrontés à cette problématique en ne parvenant pas à mettre en évidence des couplages intracellulaires dans notre modèle cellulaire d'expression hétérologue d'AT2 dans des cellules CHO ou HEK293T. Nos résultats vont dans le sens d'un non-couplage d'AT2 aux voies $G_{\alpha q}$ /PLC, $G_{\alpha i}$ /adénylate cyclase et $G_{\alpha s}$ /adénylate cyclase. D'après nos résultats, il n'induit pas non plus de phosphorylation/activation des MAP kinases ERK1/2. Nos résultats confirment donc le caractère atypique de ce récepteur et ne confirment pas les quelques données de la littérature qui montrent son couplage à $G_{\alpha i}$.

Une toxine, antagoniste compétitif du récepteur AT1

L'axe classique ECA/AngII/AT1 joue un rôle essentiel dans la régulation du système cardiovasculaire et dans la survenue de maladies cardiovasculaires, telles que l'hypertrophie cardiaque, l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque. Le récepteur AT1 est couplé à la protéine $G_{\alpha q}$ qui représente le principal processus de transduction du signal de ce récepteur. L'activation du récepteur AT1 conduit également à des voies de signalisation indépendantes des protéines G comme le recrutement de la β -arrestine 2 qui d'après certaines études serait responsable d'effets cardioprotecteurs (Soergel et al., 2013; Violin et al., 2010).

La toxine A-CTX-cMila présentant une affinité de 300 nM pour le récepteur AT1, offre un profil de sélectivité intéressant pour ce récepteur. Nous avons caractérisé cette toxine sur le récepteur AT1 par l'utilisation de nombreuses techniques. Nous avons montré que la toxine est un antagoniste compétitif de la voie $G_{\alpha q}$ /PLC. Nous avons également montré que la toxine inhibe le recrutement de

β -arrestine 2. De plus, cette toxine est aussi un antagoniste compétitif des voies $G_{\alpha 3}$ et $G_{\alpha oA}$. Enfin A-CTX-cMila bloque aussi l'activation de ERK1/2, à la fois la composante protéines G dépendante et la composante β -arrestine dépendante. Une première analyse du profil de sélectivité met en évidence que A-CTX-cMila n'a pas d'effet sur d'autres récepteurs impliqués dans la régulation du système cardiovasculaire et rénal, comme le récepteur de l'apéline, les récepteurs ETA et ETB des endothélines, les récepteurs V1a et V2 de la vasopressine.

L'ensemble de mes résultats de thèse suggèrent que A-CTX-cMila agit comme un antagoniste compétitif de toutes les voies activées par le récepteur AT1, du moins sur les couplages et voies de signalisation que nous avons étudiées. Afin de compléter la caractérisation pharmacologique *in vitro* de A-CTX-cMila, il serait intéressant de vérifier si la toxine exerce le même effet sur le couplage à d'autres sous-types de protéines G_{α} comme $G_{\alpha 12/13}$.

Enfin, A-CTX-cMila présente un mode d'action similaire à celui des ARAII. Une fois cette caractérisation finalisée nous pourrions évaluer ses effets dans des modèles plus physiologiques, comme par exemple tester sa capacité à réduire la contractilité induite par l'AngII des artères mésentériques de rat *ex vivo* et la comparer aux ARAII.

Le profil de sélectivité pourra être approfondi par l'étude de l'effet de la toxine sur d'autres récepteurs impliqués dans la régulation cardiovasculaire non évalués comme les récepteurs adrénergiques, muscariniques, mais aussi sur d'autres cibles membranaires comme certains canaux ioniques.

Les toxines animales, étant donné leurs sources et leurs structures extrêmement diverses, constituent un réservoir presque infini de molécules présentant un intérêt potentiel comme agents thérapeutiques et/ou diagnostiques, ou comme outils moléculaires. Cette source est encore trop peu exploitée puisque seulement une dizaine de médicaments dérivés de ces toxines ont été approuvés. Le criblage sur des cibles cellulaires bien définies de la banque de toxines synthétiques Venomics dont nous disposons au laboratoire peut alors permettre de découvrir de nouvelles toxines d'intérêt pharmacologique ou thérapeutique. Mon travail, comme ceux précédemment réalisés au laboratoire, montre que les toxines peptidiques animales peuvent représenter des sources originales pour des futurs outils pharmacologiques voire de nouveaux agents thérapeutiques.

MATERIELS & METHODES

7 Matériels & méthodes

Cette partie de matériels et méthodes vient en complément de celui décrit dans l'article (Chapitre 4).

7.1 PRODUCTION DES PEPTIDES

Les méthodes suivantes sont détaillées dans le « matériels et méthodes » de l'article : production des toxines par SPPS puis oxydation thermodynamique, contrôle par HPLC analytique, purification par HPLC, contrôles par spectrométrie de masse (MALDI TOF et HPLC-MS) et enfin marquage de l'AngII à la cyanine 3 ou cyanine 5. Les éventuelles modifications apportées seront signalées dans la partie Résultat correspondante.

7.1.1 INFORMATIONS GENERALES

L'ensemble des réactifs et des solvants ont été utilisés sans étape de purification. Les acides aminés protégés Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Boc-Asp-OtBu proviennent de Novabiochem et la Boc-Ala-OH provient de Sigma Aldrich; les résines Fmoc-AA-Wang, la résine H-rink amide ChemMatrix proviennent de Sigma Aldrich. L'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique), l'EDTA (acide éthylène dinitrilo tétra acétique), la cystéine, la cystine, le chlorure de guanidinium (Gnd HCl), le dithiocarbamate (DTC), le disulfiram (DSF), l'iode, l'acide L-ascorbique proviennent de Sigma Aldrich ; le chlorure de palladium (II) (PdCl₂) de chez Alfa Aesar ; l'hydrazine de chez ThermoFischer Scientific. Les phases mobiles qui ont été utilisées pour les analyses HPLC sont A : H₂O + 0,1% TFA et B : ACN + 0,1% TFA.

7.1.2 PRODUCTION DE TOXINES PAR PONTAGE DIRIGE

Utilisation d'iode

15 µmol de produit linéaire déprotégé purifié sont solubilisés dans 1 mL Gnd HCl (6 M ; pH 7). On ajoute 10 éq. de DSF (170 mM dans ACN) sous agitation à 500 rpm pendant 5 min à 37°C. Puis on ajoute 20 mM d'iode dans et 160 mM d'HCl dans l'acide acétique sous agitation à 500 rpm pendant 2 h à température ambiante. Enfin, on ajoute 1 M d'acide L-ascorbique dans H₂O. L'échantillon est récupéré pour purification par HPLC et effectuer les contrôles analytiques et de masse requis.

Utilisation de Cys(Acm)

0,3 µmol de produit linéaire déprotégé purifié sont solubilisés dans 670 µL de Gnd HCl (6 M ; pH 7). On ajoute 10 éq. de DSF (170 mM dans ACN) sous agitation à 500 rpm pendant 10 sec à 37°C. Le pH est ajusté à 1 (HCl 1 M). Puis on ajoute 15 éq. de PdCl₂ (170 mM dans Gnd HCl 6 M ; pH 7) sous agitation à 500 rpm pendant 5 min à 37°C. Enfin, on ajoute 30 éq. de DTC (1 M dans H₂O) puis 10 éq. de DSF (170 mM dans ACN). Le pH est ajusté à 7 (NaOH 1 M). L'échantillon est centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm. Le surnageant est récupéré pour effectuer les contrôles analytiques et de masse requis.

7.1.3 MARQUAGE DE PEPTIDES

7.1.3.1 A LA 5-CARBOXYFLUORESCÉINE

Marquage avec la 5-carboxyfluorescéine en N-ter

Le marquage du peptide avec un fluorophore s'effectue en greffant à l'extrémité N-ter du peptide la 5-carboxyfluorescéine (Novabiochem). La solution réactionnelle est composée de 4 éq. de 5-carboxyfluorescéine dans une solution de HCTU (250 mM dans NMP) et NMM (1 M dans NMP), on y ajoute 1 éq. de peptide sur résine. La réaction s'effectue à l'abri de la lumière pendant 2 h sous agitation à 300 rpm et à température ambiante. S'en suivent des lavages de 3×5 mL de NMP puis 3×5 mL de DCM, puis un séchage sous vide pendant 30 min. Un test de Kaiser est ensuite réalisé pour vérifier l'absence d'amine libre. La résine est ensuite clivée et le peptide déprotégé puis analysé et purifié selon les protocoles décrits dans l'article.

Marquage avec la 5-carboxyfluorescéine en C-ter sur Lys-IvDde

Les peptides Ang1-7 et alamandine sont synthétisés par SPPS, avec une résine H-Rink amide ChemMatrix et en remplaçant l'AA en C-ter par Fmoc-Lys(ivDde)-OH, et le Fmoc-AA en N-ter par le Boc-AA correspondant. Le peptide sur résine est ensuite traité par une solution d'hydrazine (5% dans NMP, 10×5 min, sous agitation à 300 rpm) puis lavé avec 10×5 mL de NMP, 10×5 mL de DCM et 2×10 mL de NMP. Un test de Kaiser est réalisé pour vérifier la présence d'amines libres. Le peptide est ensuite traité par la même solution de FLUO que précédemment, lavé, clivé de la résine et déprotégé.

7.1.3.2 A L'IODE 125

Méthode chloramine T

L'Ang1-7 (250 µM dans le tampon phosphate pH 7,5 ; 1 M) est incorporée à 0,4 mCi de Na¹²⁵I (activité spécifique 17 Ci/mg, 0,1 M NaOH ; Perkin Elmer) avec la chloramine T (1 mM dans le tampon

phosphate ; Sigma Aldrich). La réaction est arrêtée après 2 min d'incubation par dilution dans H₂O/TFA 0,1% puis le produit est purifié par HPLC.

Méthode iodogène

La Sar1, Ile8-AngII ou l'Ang1-7 (30 µg dans le TRIS pH 7,5 ; 100 mM) est incorporée à 0,4 mCi de Na¹²⁵I (activité spécifique 17 Ci/mg, 0,1 M NaOH ; Perkin Elmer) dans un tube pré-enduit de iodogène (1,3,4,6- tetrachloro-3α, 6α-diphenylglycouril; ThermoFischer Scientific) pendant 20 min avant d'être purifié par HPLC.

Après contrôle de masse au MALDI-TOF, le peptide monoiodé est dilué dans un tampon HEPES 10 mM BSA 1%.

7.2 BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

7.2.1 MUTAGENESE DIRIGEE

La mutation N111G (remplacement du codon AAC par GGC) a été introduite par PCR dans le plasmide pAT1-YFP à l'aide du kit de mutagenèse dirigée Q5® Site Directed Mutagenesis (New England BioLabs). La réaction de PCR est réalisée dans un volume total de 25 µL contenant 0,5 µM de chaque amorce et le Master mix du kit (Hot Start High Fidelity polymerase, dNTP, tampon). Le programme de PCR comprend 5 min de dénaturation à 98 °C puis 25 cycles comportant 2 étapes : 30 s de dénaturation à 98 °C, 3 min d'hybridation/élongation à 72 °C. Une étape finale d'élongation de 2 min à 72 °C termine la réaction. Le produit de PCR est ensuite utilisé pour la réaction de ligation (KLD enzyme mix) permettant la recircularisation du plasmide linéarisé issu de la PCR. Après incubation, 5 min à température ambiante, le mélange de ligation est utilisé pour transformer des bactéries compétentes (comme décrit 7.2.2) qui sont ensuite étalées sur milieu sélectif (LB-agar, kanamycine 30 µg/mL). L'introduction de la mutation dans la séquence d'AT1 a été vérifiée par séquençage à partir de quelques colonies résistantes.

7.2.2 PREPARATION DE PLASMIDES

Tous les plasmides sont amplifiés dans des bactéries E. coli XL1 Blue comme suit. Les bactéries compétentes sont transformées par choc thermique avec chaque plasmide et sont ensuite mises en culture à 37 °C sur des boîtes de LB-agar contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) ou de la kanamycine (30 µg/mL). Après 24h, pour chaque plasmide, une colonie est mise en culture à 37 °C sous agitation (200 rpm) dans 2 mL de milieu LB contenant l'antibiotique correspondant. Après 4 h, 1 mL de cette

préculture est utilisé pour ensemercer 100 mL de milieu Terrific Broth supplémenté en antibiotique. Après 24 h de culture à 37 °C sous agitation, la culture est centrifugée à 4 000 rpm pendant 30 min à 4 °C. Après élimination du surnageant, le plasmide est purifié selon le protocole « Midi Prep High copy » du kit NucleoBond®Xtra Midi (Macherey Nagel) et repris dans du tampon TRIS 5 mM pH 8,5. La concentration en plasmide de la solution est déterminée par mesure d'absorbance sur un lecteur CLARIOstar (BMG LABTECH). Le rapport d'absorbance 260/280 est vérifié et doit être proche de 1,8.

7.2.3 TESTS DE CYTOTOXICITE

Test de viabilité cellulaire alamarBlue

Les solutions sont préparées dans le Ham's F12 (Ham's F12 med 1.00 mM L-Glutamine ; Cytiva). Les cellules CHO-AT1a-EGFP sont ensemercées dans une plaque 96 puits (GREINER, cell culture microplate, 96 well, PS, F-bottom), à 40 000 cellules/puits. 24 h après, le milieu est éliminé et la toxine (100 µM dans le Ham's F12) ou le triton X-100 (0,1% dans le Ham's F12 ; Sigma Aldrich) est incubé 30 min à 37 °C. On ajoute l'alamarBlue (5 µL dans 100 µL dans le Ham's F12 ; Invitrogen) pendant 1 h à 37 °C. La lecture se fait par mesure de fluorescence (ex 545, ém 600 nm) sur un lecteur de plaques CLARIOstar (BMG labtech).

Test de perméabilité à l'iodure de propidium

Les cellules CHO-AT1a-EGFP sont ensemercées dans une plaque 96 puits à 40 000 cellules/puits. 24 h après, le milieu est éliminé et la toxine (100 µM dans Ham's F12) ou le triton X-100 (0,1% ; Sigma Aldrich) est incubé 30 min à 37 °C, puis on ajoute l'iodure de propidium (0,01 mg/mL dans le Ham's F12 ; Biolegend). Les cellules sont observées au microscope (Nikon Eclipse Ti, grossissement x60, logiciel de traitement NIS-Elements).

7.3 PHARMACOLOGIE

Les méthodes suivantes sont détaillées dans le « matériels et méthodes » de l'article : test de déplacement compétition avec le radioligand, test d'inhibition de la liaison de l'AngII fluorescente (microscopie et cytométrie en flux), dosage de seconds messagers par HTRF (IP1, AMPc), étude du recrutement de la β -arrestine par BRET, étude de l'activation de protéines G par l'utilisation de biosenseurs de BRET (Gai3, GaoA), étude de l'activation de ERK1/2 par HTRF et western-blot. Les éventuelles modifications apportées seront signalées dans la partie Résultat correspondante.

Tests de liaison par HTRF

Les cellules HEK293T sont transfectées à la lipofectamine en plaque 6 puits (10^6 cellules/puits) avec le récepteur SNAP-tag d'intérêt. Après 48 h le milieu est aspiré et remplacé par 500 μ L tampon Tag-lite (Cisbio) contenant 100 nM de SNAP-Lumi4-Tb (Cisbio). Après 1h d'incubation à 37 °C les cellules sont récupérées et lavées 3 fois dans 1 mL de tampon Tag-lite. Le bon marquage des cellules est vérifié par mesure de la fluorescence du cryptate de Tb²⁺ à 620 nm. Pour la mesure de la liaison, 10 μ L de cellules à 650 cellules/ μ L et 10 μ L de ligands marqués à la FLUO (100 nM final préparés 2X dans le milieu Tag-lite) sont placés dans les puits d'une plaque 384 puits. Après 1h d'incubation à température ambiante la fluorescence à 520 nm et 620 nm après excitation à 340 nm. Les mesures sont réalisées en mode TR-FRET sur un lecteur de plaque CLARIOstar (BMG Labtech).

Les tests de fonction (dosage de seconds messagers, utilisation de biosenseurs de BRET, activation de ERK1/2) réalisés sur AT2 sont décrits pour AT1 dans le chapitre 4.

8 Bibliographie

AbdAlla, S., Lothar, H., Quitterer, U., 2000. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407, 94–98. <https://doi.org/10.1038/35024095>

Adem, A., Asblom, A., Johansson, G., Mbugua, P.M., Karlsson, E., 1988. Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors. *Biochim Biophys Acta* 968, 340–345. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(88\)90025-0](https://doi.org/10.1016/0167-4889(88)90025-0)

Aguilar, M.B., Luna-Ramírez, K.S., Echeverría, D., Falcón, A., Olivera, B.M., Heimer de la Cotera, E.P., Maillou, M., 2008. Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides* 29, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.022>

Ahn, S., Shenoy, S.K., Wei, H., Lefkowitz, R.J., 2004. Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* 279, 35518–35525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405878200>

Alhosaini, K., Azhar, A., Alonazi, A., Al-Zoghaibi, F., 2021. GPCRs: The most promiscuous druggable receptor of the mankind. *Saudi Pharm J* 29, 539–551. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.04.015>

Asada, H., Horita, S., Hirata, K., Shiroishi, M., Shiimura, Y., Iwanari, H., Hamakubo, T., Shimamura, T., Nomura, N., Kusano-Arai, O., Uemura, T., Suno, C., Kobayashi, T., Iwata, S., 2018. Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog. *Nat Struct Mol Biol* 25, 570–576. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0079-8>

Asada, H., Inoue, A., Ngako Kadji, F.M., Hirata, K., Shiimura, Y., Im, D., Shimamura, T., Nomura, N., Iwanari, H., Hamakubo, T., Kusano-Arai, O., Hisano, H., Uemura, T., Suno, C., Aoki, J., Iwata, S., 2020. The Crystal Structure of Angiotensin II Type 2 Receptor with Endogenous Peptide Hormone. *Structure* 28, 418–425.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.12.003>

Autorisation - Accueil [WWW Document], 2020. URL <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/index.php#result> (accessed 4.16.20).

Avrith, D.B., Fitzsimons, J.T., 1980. Increased sodium appetite in the rat induced by intracranial administration of components of the renin-angiotensin system. *J Physiol* 301, 349–364. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013210>

Bader, M., Santos, R.A., Unger, T., Steckelings, U.M., 2012. New therapeutic pathways in the RAS. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 13, 505–508. <https://doi.org/10.1177/1470320312466519>

Becker, L.K., Etelvino, G.M., Walther, T., Santos, R.A.S., Campagnole-Santos, M.J., 2007. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 293, H1416–H1424. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00141.2007>

Bedecs, K., Elbaz, N., Sutren, M., Masson, M., Susini, C., Strosberg, A.D., Nahmias, C., 1997. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J* 325 (Pt 2), 449–454. <https://doi.org/10.1042/bj3250449>

Bernier, S., Guillemette, G., 1996. L'angiotensine IV : une nouvelle hormone du système rénine-angiotensine. Angiotensin IV, a new hormone of the renin-angiotension system. <https://doi.org/10.4267/10608/790>

Bihl, J.C., Zhang, C., Zhao, Y., Xiao, X., Ma, X., Chen, Yusen, Chen, S., Zhao, B., Chen, Yanfang, 2015. Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: Role of the NFκB inflammatory pathway. *Vascul Pharmacol* 73, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.08.007>

Bockaert, J., 2012. Les récepteurs couplés aux protéines G - Prix Nobel de chimie 2012 Robert

- J. Lefkowitz et Brian Kobilka. *Med Sci (Paris)* 28, 1133–1137. <https://doi.org/10.1051/medsci/20122812026>
- Bockaert, J., Fagni, L., Dumuis, A., Marin, P., 2004. GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* 103, 203–221. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.06.004>
- Bohlen, C.J., Priel, A., Zhou, S., King, D., Siemens, J., Julius, D., 2010. A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. *Cell* 141, 834–845. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.052>
- Bosmans, F., Tytgat, J., 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 49, 142–158. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.023>
- Bosnyak, S., Jones, E.S., Christopoulos, A., Aguilar, M.-I., Thomas, W.G., Widdop, R.E., 2011. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clinical Science* 121, 297–303. <https://doi.org/10.1042/CS20110036>
- Botelho-Santos, G.A., Bader, M., Alenina, N., Santos, R.A.S., 2012. Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 6, 201–211. <https://doi.org/10.1177/1753944712461164>
- Bourinet, E., Zamponi, G.W., 2017. Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins. *Neuropharmacology, Venom-derived Peptides as Pharmacological Tools* 127, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.016>
- Braun-Menendez, E., Fasciolo, J.C., Leloir, L.F., Muñoz, J.M., 1940. The substance causing renal hypertension. *The Journal of Physiology* 98, 283–298. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1940.sp003850>
- Brunner, H.R., Gavras, H., Turini, G.A., Waeber, B., Cappuis, P., McKinstry, D.N., 1978. Long-term treatment of hypertension in man by an orally active angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Clin Sci Mol Med Suppl* 4, 293s–295s. <https://doi.org/10.1042/cs055293s>
- Brust, A., Croker, D.E., Colless, B., Ragnarsson, L., Andersson, Å., Jain, K., Garcia-Caraballo, S., Castro, J., Brierley, S.M., Alewood, P.F., Lewis, R.J., 2016. Conopeptide-Derived κ -Opioid Agonists (Conorphins): Potent, Selective, and Metabolic Stable Dynorphin A Mimetics with Antinociceptive Properties. *J Med Chem* 59, 2381–2395. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00911>
- Buisson, B., Laflamme, L., Bottari, S.P., de Gasparo, M., Gallo-Payet, N., Payet, M.D., 1995. A G protein is involved in the angiotensin AT2 receptor inhibition of the T-type calcium current in non-differentiated NG108-15 cells. *J Biol Chem* 270, 1670–1674. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.4.1670>
- Cao, D., Veiras, L., Ahmed, F., Shibata, T., Bernstein, E.A., Okwan-Duodu, D., Giani, J.F., Khan, Z., Bernstein, K.E., 2022. The non-cardiovascular actions of ACE. *Peptides* 152, 170769. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170769>
- Cao, Z., Shahbazzadeh, D., Kovacic, H., McNutt, P.M., Wang, J.-L., Wulff, H., Utkin, Y., Sabatier, J.-M., 2022. Editorial: Venoms, animal and microbial toxins, volume II. *Front Pharmacol* 13, 973628. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.973628>
- Carey, R.M., Moran, A.E., Whelton, P.K., 2022a. Treatment of Hypertension: A Review. *JAMA* 328, 1849–1861. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.19590>
- Carey, R.M., Padia, S.H., 2008. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.01.003>
- Carey, R.M., Siragy, H.M., Gildea, J.J., Keller, S.R., 2022b. Angiotensin Type-2 Receptors: Transducers of Natriuresis in the Renal Proximal Tubule. *Int J Mol Sci* 23, 2317. <https://doi.org/10.3390/ijms23042317>
- Carraway, R., Leeman, S.E., 1973. The Isolation of a New Hypotensive Peptide, Neurotensin, from Bovine Hypothalami. *Journal of Biological Chemistry* 248, 6854–6861. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43429-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43429-7)
- Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., Fry, B.G., 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol Evol* 28, 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.020>

- Changeux, J.-P., Kasai, M., Lee, C.-Y., 1970. Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67, 1241–1247.
- Chappell, M.C., Pirro, N.T., Sykes, A., Ferrario, C.M., 1998. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 31, 362–367. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.31.1.362>
- Checler, F., Amar, S., Kitabgi, P., Vincent, J.-P., 1986. Catabolism of neurotensin by neural (neuroblastoma clone N1E115) and extraneural (HT29) cell lines. *Peptides* 7, 1071–1077. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(86\)90136-1](https://doi.org/10.1016/0196-9781(86)90136-1)
- Chen, T.-S., Chung, F.-Y., Tjong, S.-C., Goh, K.-S., Huang, W.-N., Chien, K.-Y., Wu, P.-L., Lin, H.-C., Chen, C.-J., Wu, W.-G., 2005. Structural difference between group I and group II cobra cardiotoxins: X-ray, NMR, and CD analysis of the effect of cis-proline conformation on three-fingered toxins. *Biochemistry* 44, 7414–7426. <https://doi.org/10.1021/bi050172e>
- Cheng, Y., Prusoff, W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099–3108. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2)
- Choi, S.S., Lahn, B.T., 2003. Adaptive Evolution of MRG, a Neuron-Specific Gene Family Implicated in Nociception. *Genome Res.* 13, 2252–2259. <https://doi.org/10.1101/gr.1431603>
- Ciolek, J., Reinfrank, H., Quinton, L., Viengchareun, S., Stura, E.A., Vera, L., Sigismeau, S., Mouillac, B., Orcel, H., Peigneur, S., Tytgat, J., Droctové, L., Beau, F., Nevoux, J., Lombès, M., Mourier, G., De Pauw, E., Servent, D., Mendre, C., Witzgall, R., Gilles, N., 2017. Green mamba peptide targets type-2 vasopressin receptor against polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 7154–7159. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620454114>
- Ciolek, J., Zoukimian, C., Dhot, J., Burban, M., Triquigneaux, M., Lauzier, B., Guimbert, C., Boturyn, D., Ferron, M., Ciccone, L., Tepshi, L., Stura, E., Legrand, P., Robin, P., Mourier, G., Schaack, B., Fellah, I., Blanchet, G., Gauthier-Erfanian, C., Beroud, R., Servent, D., De Waard, M., Gilles, N., 2022. MT9, a natural peptide from black mamba venom antagonizes the muscarinic type 2 receptor and reverses the M2R-agonist-induced relaxation in rat and human arteries. *Biomed Pharmacother* 150, 113094. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113094>
- Cohen, G., Burks, S.R., Frank, J.A., 2018. Chlorotoxin-A Multimodal Imaging Platform for Targeting Glioma Tumors. *Toxins (Basel)* 10, 496. <https://doi.org/10.3390/toxins10120496>
- Collins, S., 2022. CONNECTS Master Protocol for Clinical Trials Targeting Macro-, Micro-immuno-thrombosis, Vascular Hyperinflammation, and Hypercoagulability and Renin-angiotensin-aldosterone System (RAAS) in Hospitalized Patients With COVID-19 (ACTIV-4 Host Tissue) (Clinical trial registration No. NCT04924660). clinicaltrials.gov.
- Conklin, B.R., Farfel, Z., Lustig, K.D., Julius, D., Bourne, H.R., 1993. Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature* 363, 274–276. <https://doi.org/10.1038/363274a0>
- Connolly, A., 2019. Étude des mécanismes de signalisation du récepteur à l'angiotensine II de type 2. <http://hdl.handle.net/11143/16071>
- Connolly, A., Holleran, B.J., Simard, É., Baillargeon, J.-P., Lavigne, P., Leduc, R., 2019. Interplay between intracellular loop 1 and helix VIII of the angiotensin II type 2 receptor controls its activation. *Biochem Pharmacol* 168, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.07.018>
- Cotter, G., Davison, B., 2014. Intravenous therapies in acute heart failure – lack of effect or lack of well powered studies? *European Journal of Heart Failure* 16, 355–357. <https://doi.org/10.1002/ejhf.72>
- Craig, A.G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., Low, W., Dykert, J., Richelson, E., Navarro, V., Mazella, J., Watkins, M., Hillyard, D., Imperial, J., Cruz, L.J., Olivera, B.M., 1999. Contulakin-G, an O-Glycosylated Invertebrate Neurotensin*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13752–13759. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.13752>
- Dal-Ros, S., Oswald-Mammosser, M., Pestrikova, T., Schott, C., Boehm, N., Bronner, C., Chataigneau, T., Gény, B., Schini-Kerth, V.B., 2010. Losartan prevents portal hypertension-induced, redox-mediated endothelial dysfunction in the mesenteric artery in rats. *Gastroenterology* 138, 1574–

1584. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.040>

D'Armiento, J., 2022. Randomized Controlled Trial of Angiotensin 1-7 (TXA127) for the Treatment of Severe COVID-19 (Clinical trial registration No. NCT04401423). clinicaltrials.gov.

Davenport, A.P., Hyndman, K.A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D.E., Pollock, J.S., Pollock, D.M., Webb, D.J., Maguire, J.J., 2016. Endothelin. *Pharmacol Rev* 68, 357–418. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>

de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., Unger, T., 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 415–472.

de Kloet, A.D., Steckelings, U.M., Summers, C., 2017. Protective Angiotensin Type 2 Receptors in the Brain and Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 19, 46. <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0746-x>

de Moura, S.S., Mendes, A.T.P., de Assis Dias Martins-Júnior, F., Totou, N.L., Coelho, D.B., Oliveira, E.C. de, Motta-Santos, D., dos Santos, R.A.S., Becker, L.K., 2021. Angiotensin-(1–7) oral formulation improves physical performance in mountain bike athletes: a double-blinded crossover study. *BMC Sports Sci Med Rehabil* 13, 47. <https://doi.org/10.1186/s13102-021-00274-4>

de Munnik, S.M., Smit, M.J., Leurs, R., Vischer, H.F., 2015. Modulation of cellular signaling by herpesvirus-encoded G protein-coupled receptors. *Front Pharmacol* 6, 40. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00040>

de Weille, J.R., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A., Lazdunski, M., 1991. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2437–2440. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2437>

Delaitre, C., Boisbrun, M., Lecat, S., Dupuis, F., 2021. Targeting the Angiotensin II Type 1 Receptor in Cerebrovascular Diseases: Biased Signaling Raises New Hopes. *Int J Mol Sci* 22, 6738. <https://doi.org/10.3390/ijms22136738>

DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., Shenoy, S.K., 2007. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 483–510. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749>

Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., Lingueglia, E., 2012. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490, 552–555. <https://doi.org/10.1038/nature11494>

Donevan, S.D., McCabe, R.T., 2000. Conantokin G is an NR2B-selective competitive antagonist of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 58, 614–623. <https://doi.org/10.1124/mol.58.3.614>

Dong, X., Han, S., Zylka, M.J., Simon, M.I., Anderson, D.J., 2001. A Diverse Family of GPCRs Expressed in Specific Subsets of Nociceptive Sensory Neurons. *Cell* 106, 619–632. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00483-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00483-4)

Donoghue Mary, Hsieh Frank, Baronas Elizabeth, Godbout Kevin, Gosselin Michael, Stagliano Nancy, Donovan Michael, Woolf Betty, Robison Keith, Jeyaseelan Raju, Breitbart Roger E., Acton Susan, 2000. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circulation Research* 87, e1–e9. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.5.e1>

Downes, G.B., Gautam, N., 1999. The G protein subunit gene families. *Genomics* 62, 544–552. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5992>

Droctové, L., Ciolek, J., Mendre, C., Chorfa, A., Huerta, P., Carvalho, C., Gouin, C., Lancien, M., Stanajic-Petrovic, G., Braco, L., Blanchet, G., Upert, G., De Pauw, G., Barbe, P., Keck, M., Mourier, G., Mouillac, B., Denis, S., Rodríguez de la Vega, R.C., Quinton, L., Gilles, N., 2022. A new Kunitz-type snake toxin family associated with an original mode of interaction with the vasopressin 2 receptor. *Br J Pharmacol* 179, 3470–3481. <https://doi.org/10.1111/bph.15814>

Droctové, L., Lancien, M., Tran, V.L., Susset, M., Jego, B., Theodoro, F., Kessler, P., Mourier, G., Robin, P., Diarra, S.S., Palea, S., Flahault, A., Chorfa, A., Corbani, M., Llorens-Cortes, C., Mouillac, B., Mendre, C., Pruvost, A., Servent, D., Truillet, C., Gilles, N., 2020. A snake toxin as a theranostic agent for the type 2 vasopressin receptor. *Theranostics* 10, 11580–11594. <https://doi.org/10.7150/thno.47485>

Ducancel, F., 2005. Endothelin-like peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2828–2839.

<https://doi.org/10.1007/s00018-005-5286-x>

Ducancel, F., 2002. The sarafotoxins. *Toxicon* 40, 1541–1545. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00159-9](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00159-9)

Duda, T.F., Lee, T., 2009. Ecological release and venom evolution of a predatory marine snail at Easter Island. *PLoS One* 4, e5558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005558>

Dupont, A.G., Brouwers, S., 2010. Brain angiotensin peptides regulate sympathetic tone and blood pressure. *Journal of Hypertension* 28, 1599. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833af3b2>

Dutertre, S., Croker, D., Daly, N.L., Andersson, A., Muttenthaler, M., Lumsden, N.G., Craik, D.J., Alewood, P.F., Guillon, G., Lewis, R.J., 2008. Conopressin-T from *Conus tulipa* reveals an antagonist switch in vasopressin-like peptides. *J Biol Chem* 283, 7100–7108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706477200>

Dutertre, S., Jin, A.-H., Alewood, P.F., Lewis, R.J., 2014a. Intraspecific variations in *Conus geographus* defence-evoked venom and estimation of the human lethal dose. *Toxicon* 91, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.09.011>

Dutertre, S., Jin, A.-H., Vetter, I., Hamilton, B., Sunagar, K., Lavergne, V., Dutertre, V., Fry, B.G., Antunes, A., Venter, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J., 2014b. Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nat Commun* 5, 3521. <https://doi.org/10.1038/ncomms4521>

Ehlers, M.R., Schwager, S.L., Scholle, R.R., Manji, G.A., Brandt, W.F., Riordan, J.F., 1996. Proteolytic release of membrane-bound angiotensin-converting enzyme: role of the juxtamembrane stalk sequence. *Biochemistry* 35, 9549–9559. <https://doi.org/10.1021/bi9602425>

EMA, 2021. Evrenzo [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/evrenzo> (accessed 12.21.22).

EMA, 2018a. Eperzan [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/eperzan> (accessed 10.26.22).

EMA, 2018b. Plavix [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/plavix> (accessed 10.26.22).

EMA, 2018c. Firazyr [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/firazyr> (accessed 10.26.22).

EMA, 2018d. Latanoprost [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/paediatric-investigation-plans/latanoprost> (accessed 10.26.22).

EMA, 2018e. Levodopa/Carbidopa/Entacapone Orion [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/levodopa-carbidopa-entacapone-orion> (accessed 10.26.22).

EMA, 2018f. Abilify [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/abilify> (accessed 10.26.22).

EMA, 2018g. Entresto [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/entresto> (accessed 12.21.22).

EMA, 2018h. Integrilin [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/integrilin> (accessed 10.20.22).

EMA, 2018i. Aggrastat [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/aggrastat> (accessed 10.27.22).

Eng, J., Andrews, P.C., Kleinman, W.A., Singh, L., Raufman, J.P., 1990. Purification and structure of exendin-3, a new pancreatic secretagogue isolated from *Heloderma horridum* venom. *J Biol Chem* 265, 20259–20262.

Eng, J., Kleinman, W.A., Singh, L., Singh, G., Raufman, J.P., 1992. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 267, 7402–7405.

England, L.J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A.G., Gulyas, J., Akhtar, M., Rivier, J., Julius, D., Olivera, B.M., 1998. Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from

marine snails. *Science* 281, 575–578. <https://doi.org/10.1126/science.281.5376.575>

Feng, Y.H., Miura, S., Husain, A., Karnik, S.S., 1998. Mechanism of constitutive activation of the AT1 receptor: influence of the size of the agonist switch binding residue Asn(111). *Biochemistry* 37, 15791–15798. <https://doi.org/10.1021/bi980863t>

Fernandes, R.S., Dias, H.B., de Souza Jaques, W.A., Becker, T., Rigatto, K., 2021. Assessment of Alamandine in Pulmonary Fibrosis and Respiratory Mechanics in Rodents. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2021, 9975315. <https://doi.org/10.1155/2021/9975315>

Ferrario, C.M., Chappell, M.C., Tallant, E.A., Brosnihan, K.B., Diz, D.I., 1997. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* 30, 535–541. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.30.3.535>

Fillion, D., Cabana, J., Guillemette, G., Leduc, R., Lavigne, P., Escher, E., 2013. Structure of the Human Angiotensin II Type 1 (AT1) Receptor Bound to Angiotensin II from Multiple Chemoselective Photoprobe Contacts Reveals a Unique Peptide Binding Mode. *J. Biol. Chem.* 288, 8187–8197. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442053>

Firibastat - First-in-class - hypertension as monotherapy, n.d. . Quantum Genomics. URL <https://quantum-genomics.com/en/science/pipeline/firibastat-first-in-class-hypertension-as-monotherapy/> (accessed 4.20.20).

Fischer, T.A., Singh, K., O'Hara, D.S., Kaye, D.M., Kelly, R.A., 1998. Role of AT1 and AT2 receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol* 275, H906-916. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.3.H906>

Fisher, A., Heldman, E., Gurwitz, D., Haring, R., Barak, D., Meshulam, H., Marciano, D., Brandeis, R., Pittel, Z., Segal, M., Vogel, Z., Karton, Y., 1993. Selective Signaling via Unique M1 Muscarinic Agonists. *Annals of the New York Academy of Sciences* 695, 300–303. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb23070.x>

Flammer, A.J., Sudano, I., Hermann, F., Gay, S., Forster, A., Neidhart, M., Künzler, P., Enseleit, F., Périat, D., Hermann, M., Nussberger, J., Luscher, T.F., Corti, R., Noll, G., Ruschitzka, F., 2008. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis. *Circulation* 117, 2262–2269. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734384>

Flores-Muñoz, M., Smith, N.J., Haggerty, C., Milligan, G., Nicklin, S.A., 2011. Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 939–951. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.203075>

Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., Schiöth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256–1272. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>

Freeman, E.J., Ruehr, M.L., Dorman, R.V., 1998. ANG II-induced translocation of cytosolic PLA2 to the nucleus in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274, C282-288. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.1.C282>

Freeman, N.E., Page, I.H., 1937. Hypertension produced by constriction of the renal artery in sympathectomized dogs. *American Heart Journal* 14, 405–414. [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(37\)90519-2](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(37)90519-2)

Fry, B.G., Roelants, K., Champagne, D.E., Scheib, H., Tyndall, J.D.A., King, G.F., Nevalainen, T.J., Norman, J.A., Lewis, R.J., Norton, R.S., Renjifo, C., de la Vega, R.C.R., 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10, 483–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>

Furman, B.L., 2012. The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicon* 59, 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.016>

Gaidarov, I., Adams, J., Frazer, J., Anthony, T., Chen, X., Gatlin, J., Semple, G., Unett, D.J., 2018. Angiotensin (1–7) does not interact directly with MAS1, but can potently antagonize signaling from the AT1 receptor. *Cellular Signalling* 50, 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.06.007>

Galés, C., 2012. [G-protein-coupled receptors plasticity and signalling]. *Med Sci (Paris)* 28, 883–885. <https://doi.org/10.1051/medsci/20122810018>

- Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prézeau, L., Pin, J.P., 2001. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* 20, 2152–2159. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2152>
- Geng, Q., Shi, K., Ye, G., Zhang, W., Aihara, H., Li, F., 2022. Structural Basis for Human Receptor Recognition by SARS-CoV-2 Omicron Variant BA.1. *J Virol* 96, e0024922. <https://doi.org/10.1128/jvi.00249-22>
- Georgiou, N., Gkalpinos, V.K., Katsakos, S.D., Vassiliou, S., Tzakos, A.G., Mavromoustakos, T., 2021. Rational Design and Synthesis of AT1R Antagonists. *Molecules* 26, 2927. <https://doi.org/10.3390/molecules26102927>
- Gilles, N., Servent, D., 2014. The European FP7 Venomics Project. *Future Med Chem* 6, 1611–1612. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.85>
- Giribaldi, J., Ragnarsson, L., Pujante, T., Enjalbal, C., Wilson, D., Daly, N.L., Lewis, R.J., Dutertre, S., 2020. Synthesis, Pharmacological and Structural Characterization of Novel Conopressins from *Conus miliaris*. *Mar Drugs* 18, E150. <https://doi.org/10.3390/md18030150>
- Gohlke, P., Pees, C., Unger, T., 1998. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* 31, 349–355. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.31.1.349>
- Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L., 1981. Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7219–7223. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.7219>
- Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D., Alexander, R.W., 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74, 1141–1148. <https://doi.org/10.1161/01.res.74.6.1141>
- Grobe, J.L., Grobe, C.L., Beltz, T.G., Westphal, S.G., Morgan, D.A., Xu, D., de Lange, W.J., Li, H., Sakai, K., Thedens, D.R., Cassis, L.A., Rahmouni, K., Mark, A.L., Johnson, A.K., Sigmund, C.D., 2010. The brain Renin-angiotensin system controls divergent efferent mechanisms to regulate fluid and energy balance. *Cell Metab* 12, 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.09.011>
- Grogan, A., Lucero, E.Y., Jiang, H., Rockman, H.A., 2022. Pathophysiology and pharmacology of G protein-coupled receptors in the heart. *Cardiovasc Res* cvac171. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac171>
- Guy, J.L., Jackson, R.M., Acharya, K.R., Sturrock, E.D., Hooper, N.M., Turner, A.J., 2003. Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE2): Comparative Modeling of the Active Site, Specificity Requirements, and Chloride Dependence. *Biochemistry* 42, 13185–13192. <https://doi.org/10.1021/bi035268s>
- Habiyakare, B., Alsaadon, H., Mathai, M.L., Hayes, A., Zulli, A., 2014. Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *International Journal of Experimental Pathology* 95, 290–295. <https://doi.org/10.1111/iep.12087>
- Hagihara, G.N., Lobato, N.S., Filgueira, F.P., Akamine, E.H., Aragão, D.S., Casarini, D.E., Carvalho, M.H.C., Fortes, Z.B., 2014. Upregulation of ERK1/2-eNOS via AT2 receptors decreases the contractile response to angiotensin II in resistance mesenteric arteries from obese rats. *PLoS One* 9, e106029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106029>
- Hanlon, C.D., Andrew, D.J., 2015. Outside-in signaling--a brief review of GPCR signaling with a focus on the *Drosophila* GPCR family. *J Cell Sci* 128, 3533–3542. <https://doi.org/10.1242/jcs.175158>
- Hansen, J.L., Servant, G., Baranski, T.J., Fujita, T., Iiri, T., Sheikh, S.P., 2000. Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation. *Circ Res* 87, 753–759. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.9.753>
- Hayashida, W., Horiuchi, M., Dzau, V.J., 1996. Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. *J Biol Chem* 271, 21985–21992. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.36.21985>
- Healy, D.P., Maciejewski, A.R., Printz, M.P., 1986. Localization of central angiotensin II

receptors with [125I]-sar1, ile8-angiotensin II: periventricular sites of the anterior third ventricle. *Neuroendocrinology* 44, 15–21. <https://doi.org/10.1159/000124615>

Hein, L., 2006. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res* 326, 541–551. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0285-2>

Herrick, A.L., Batta, R., Overbeck, K., Raud, J., Manning, J., Murray, A., Dinsdale, G., Tornling, G., 2022. A Phase 2 trial investigating the effects of the angiotensin II type 2 receptor agonist C21 in systemic sclerosis-related Raynaud's. *Rheumatology (Oxford)* keac426. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keac426>

Hiyoshi, H., Yayama, K., Takano, M., Okamoto, H., 2005. Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension* 45, 967–973. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000164571.77710.19>

Hiyoshi, H., Yayama, K., Takano, M., Okamoto, H., 2004. Stimulation of cyclic GMP production via AT2 and B2 receptors in the pressure-overloaded aorta after banding. *Hypertension* 43, 1258–1263. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000128022.24598.4f>

Hodgson, W.C., Isbister, G.K., 2009. The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* 9, 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.11.007>

Holloway, A.C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S., Southwell, B.R., Lew, M.J., Thomas, W.G., 2002. Side-Chain Substitutions within Angiotensin II Reveal Different Requirements for Signaling, Internalization, and Phosphorylation of Type 1A Angiotensin Receptors. *Mol Pharmacol* 61, 768–777. <https://doi.org/10.1124/mol.61.4.768>

Hounsou, C., Margathe, J.-F., Oueslati, N., Belhocine, A., Dupuis, E., Thomas, C., Mann, A., Ilien, B., Rognan, D., Trinquet, E., Hibert, M., Pin, J.-P., Bonnet, D., Durroux, T., 2015. Time-resolved FRET binding assay to investigate hetero-oligomer binding properties: proof of concept with dopamine D1/D3 heterodimer. *ACS Chem Biol* 10, 466–474. <https://doi.org/10.1021/cb5007568>

Hu, W., Gao, W., Miao, J., Xu, Z., Sun, L., 2021. Alamandine, a derivative of angiotensin-(1-7), alleviates sepsis-associated renal inflammation and apoptosis by inhibiting the PI3K/Ak and MAPK pathways. *Peptides* 146, 170627. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170627>

Hunyady, L., Catt, K.J., 2006. Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. *Mol Endocrinol* 20, 953–970. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0536>

Hypertension artérielle (HTA) [WWW Document], 2020. . Inserm - La science pour la santé. URL <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/hypertension-arterielle-hta> (accessed 4.16.20).

Hypertension artérielle [WWW Document], n.d. URL <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-cardiovasculaires-et-accident-vasculaire-cerebral/hypertension-arterielle> (accessed 8.2.22).

Iwai, M., Horiuchi, M., 2009. Devil and angel in the renin–angiotensin system: ACE–angiotensin II–AT 1 receptor axis vs . ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas receptor axis. *Hypertens Res* 32, 533–536. <https://doi.org/10.1038/hr.2009.74>

Jankowski Vera, Vanholder Raymond, van der Giet Markus, Tölle Markus, Karadogan Sevil, Gobom Johan, Furkert Jens, Oksche Alexander, Krause Eberhard, Anh Tran Thi Nguyet, Tepel Martin, Schuchardt Mirjam, Schlüter Hartmut, Wiedon Annette, Beyermann Michael, Bader Michael, Todiras Mihail, Zidek Walter, Jankowski Joachim, 2007. Mass-Spectrometric Identification of a Novel Angiotensin Peptide in Human Plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, 297–302. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000253889.09765.5f>

Jelinek, G.A., 2001. Australian Animal Toxins: The Creatures, Their Toxins and Care of the Poisoned Patient. *Emergency Medicine* 13, 473–474. https://doi.org/10.1046/j.1035-6851.2001.00266_2.x

Johnson, M.D., Malvin, R.L., 1977. Stimulation of renal sodium reabsorption by angiotensin II. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 232, F298–F306. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1977.232.4.F298>

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O.,

- Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kaas, Q., Yu, R., Jin, A.-H., Dutertre, S., Craik, D.J., 2012. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Res* 40, D325-30. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr886>
- Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T., Inagami, T., 1993. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* 268, 24543–24546.
- Kang, J., Posner, P., Sumners, C., 1994. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 267, C1389-1397. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.5.C1389>
- Kangussu, L.M., Melo-Braga, M.N., de Souza Lima, B.S., Santos, R.A.S., de Andrade, H.M., Campagnole-Santos, M.J., 2021. Angiotensin-(1-7) Central Mechanisms After ICV Infusion in Hypertensive Transgenic (mRen2)27 Rats. *Front Neurosci* 15, 624249. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.624249>
- Karlsson, E., Risinger, C., Jolkkonen, M., Wernstedt, C., Adem, A., 1991. Amino acid sequence of a snake venom toxin that binds to the muscarinic acetylcholine receptor. *Toxicon* 29, 521–526. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90027-O](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90027-O)
- Karnik, S.S., Singh, K.D., Tirupula, K., Unal, H., 2017. Significance of angiotensin 1–7 coupling with MAS1 receptor and other GPCRs to the renin-angiotensin system: IUPHAR Review 22. *British Journal of Pharmacology* 174, 737–753. <https://doi.org/10.1111/bph.13742>
- Karnik, S.S., Unal, H., Kemp, J.R., Tirupula, K.C., Eguchi, S., Vanderheyden, P.M.L., Thomas, W.G., 2015. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]. *Pharmacol Rev* 67, 754–819. <https://doi.org/10.1124/pr.114.010454>
- Kaschina, E., Unger, T., 2003. Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signalling and Function. *Blood Pressure* 12, 70–88. <https://doi.org/10.1080/08037050310001057>
- Katugampola, S.D., Davenport, A.P., 2002. Radioligand binding reveals chymase as the predominant enzyme for mediating tissue conversion of angiotensin I in the normal human heart. *Clin Sci (Lond)* 102, 15–21.
- Kawamura, T., Oda, T., Muramatsu, T., 2000. Purification and characterization of a dipeptidyl carboxypeptidase from the polychaete *Neanthes virens* resembling angiotensin I converting enzyme. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126, 29–37. [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(00\)00177-2](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(00)00177-2)
- Kenakin, T., 1995. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 232–238. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)89032-x](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)89032-x)
- Kessler, P., Marchot, P., Silva, M., Servent, D., 2017. The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions. *J Neurochem* 142 Suppl 2, 7–18. <https://doi.org/10.1111/jnc.13975>
- Kloog, Y., Ambar, I., Sokolovsky, M., Kochva, E., Wollberg, Z., Bdolah, A., 1988. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* 242, 268–270. <https://doi.org/10.1126/science.2845579>
- Kobilka, B.K., 2007. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768, 794–807. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.021>
- Kohout, T.A., Lefkowitz, R.J., 2003. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol. Pharmacol.* 63, 9–18. <https://doi.org/10.1124/mol.63.1.9>
- Krege, J.H., John, S.W., Langenbach, L.L., Hodgin, J.B., Hagaman, J.R., Bachman, E.S.,

Jennette, J.C., O'Brien, D.A., Smithies, O., 1995. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375, 146–148. <https://doi.org/10.1038/375146a0>

Laps, S., Atamleh, F., Kamnesky, G., Sun, H., Brik, A., 2021. General synthetic strategy for regioselective ultrafast formation of disulfide bonds in peptides and proteins. *Nature Communications* 12, 870. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21209-0>

Lautner Roberto Queiroga, Villela Daniel C., Fraga-Silva Rodrigo A., Silva Neiva, Verano-Braga Thiago, Costa-Fraga Fabiana, Jankowski Joachim, Jankowski Vera, Sousa Frederico, Alzamora Andreia, Soares Everton, Barbosa Claudiane, Kjeldsen Frank, Oliveira Aline, Braga Janaina, Savergnini Silvia, Maia Gisele, Peluso Antonio Bastos, Passos-Silva Danielle, Ferreira Anderson, Alves Fabiana, Martins Almir, Raizada Mohan, Paula Renata, Motta-Santos Daisy, Kemplin Friederike, Pimenta Adriano, Alenina Natalia, Sinisterra Ruben, Bader Michael, Campagnole-Santos Maria Jose, Santos Robson A.S., 2013. Discovery and Characterization of Alamandine. *Circulation Research* 112, 1104–1111. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301077>

Lebbe, E.K.M., Tytgat, J., 2016. In the picture: disulfide-poor conopeptides, a class of pharmacologically interesting compounds. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 22, 30. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0083-6>

Leipold, E., Lu, S., Gordon, D., Hansel, A., Heinemann, S.H., 2004. Combinatorial interaction of scorpion toxins Lqh-2, Lqh-3, and LqhalphalIT with sodium channel receptor sites-3. *Mol Pharmacol* 65, 685–691. <https://doi.org/10.1124/mol.65.3.685>

Leite, A.P. de O., Li, X.C., Nwia, S.M., Hassan, R., Zhuo, J.L., 2022. Angiotensin II and AT1a Receptors in the Proximal Tubules of the Kidney: New Roles in Blood Pressure Control and Hypertension. *Int J Mol Sci* 23, 2402. <https://doi.org/10.3390/ijms23052402>

Les résultats de l'étude ESTEBAN 2014-2015 [WWW Document], 2020. URL /determinants-de-sante/nutrition-et-activite-physique/articles/les-resultats-de-l-etude-esteban-2014-2015 (accessed 1.29.20).

Li, D., Xiao, Y., Xu, X., Xiong, X., Lu, S., Liu, Z., Zhu, Q., Wang, M., Gu, X., Liang, S., 2004. Structure--activity relationships of hainantoxin-IV and structure determination of active and inactive sodium channel blockers. *J Biol Chem* 279, 37734–37740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405765200>

Li, J.-M., Mogi, M., Tsukuda, K., Tomochika, H., Iwanami, J., Min, L.-J., Nahmias, C., Iwai, M., Horiuchi, M., 2007. Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2 (AT2) receptor-MMS2 cascade involving interaction between AT2 receptor-interacting protein and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Mol Endocrinol* 21, 499–511. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0005>

Li, M., Liu, K., Michalick, J., Angus, J.A., Hunt, J.E., Dell'Italia, L.J., Feneley, M.P., Graham, R.M., Husain, A., 2004. Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *J. Clin. Invest.* 114, 112–120. <https://doi.org/10.1172/JCI20805>

Lino, C.A., Barreto-Chaves, M.L., 2022. Beta-arrestins in the context of cardiovascular diseases: Focusing on angiotensin II type 1 receptor (AT1R). *Cell Signal* 92, 110253. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110253>

Lippens, G., Najib, J., Wodak, S.J., Tartar, A., 1995. NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry* 34, 13–21. <https://doi.org/10.1021/bi00001a003>

Lodowski, D.T., Pitcher, J.A., Capel, W.D., Lefkowitz, R.J., Tesmer, J.J.G., 2003. Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science* 300, 1256–1262. <https://doi.org/10.1126/science.1082348>

Loison, S., Cottet, M., Orcel, H., Adihou, H., Rahmeh, R., Lamarque, L., Trinquet, E., Kellenberger, E., Hibert, M., Durroux, T., Mouillac, B., Bonnet, D., 2012. Selective fluorescent nonpeptidic antagonists for vasopressin V₂ GPCR: application to ligand screening and oligomerization assays. *J Med Chem* 55, 8588–8602. <https://doi.org/10.1021/jm3006146>

Lu, J., Zhang, K., Wang, S., Sun, T., Yu, S., Dai, Q., Liu, Z., 2017. Cloning, expression and

functional characterization of a D-superfamily conotoxin Lt28.1 with previously undescribed cysteine pattern. *Peptides* 94, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.06.008>

Lu, S., He, X., Yang, Z., Chai, Z., Zhou, S., Wang, J., Rehman, A.U., Ni, D., Pu, J., Sun, J., Zhang, J., 2021. Activation pathway of a G protein-coupled receptor uncovers conformational intermediates as targets for allosteric drug design. *Nat Commun* 12, 4721. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25020-9>

Lubbe, L., Sewell, B.T., Woodward, J.D., Sturrock, E.D., 2022. Cryo-EM reveals mechanisms of angiotensin I-converting enzyme allostery and dimerization. *EMBO J* 41, e110550. <https://doi.org/10.15252/embj.2021110550>

Luo, S., Christensen, S., Zhangsun, D., Wu, Y., Hu, Y., Zhu, X., Chhabra, S., Norton, R.S., McIntosh, J.M., 2013. A novel inhibitor of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors from *Conus vexillum* delineates a new conotoxin superfamily. *PLoS One* 8, e54648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054648>

Luo, S., Zhangsun, D., Zhang, B., Chen, X., Feng, J., 2006. Direct cDNA cloning of novel conotoxins of the T-superfamily from *Conus textile*. *Peptides* 27, 2640–2646. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.05.002>

Lyngsø, C., Erikstrup, N., Hansen, J.L., 2009. Functional interactions between 7TM receptors in the renin-angiotensin system--dimerization or crosstalk? *Mol Cell Endocrinol* 302, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.09.018>

Maeda, S., Xu, J., Kadji, F.M.N., Clark, M., Zhao, J., Tsutsumi, N., Aoki, J., Sunahara, R., Inoue, A., Garcia, K., Kobilka, B., 2020. Structure and selectivity engineering of the M1 muscarinic receptor toxin complex. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aax2517>

Maïga, A., Mourier, G., Quinton, L., Rouget, C., Gales, C., Denis, C., Lluell, P., Sénard, J.-M., Palea, S., Servent, D., Gilles, N., 2012. G protein-coupled receptors, an unexploited animal toxin targets: Exploration of green mamba venom for novel drug candidates active against adrenoceptors. *Toxicon, From venoms to drugs* 59, 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.03.009>

Mangiafico, S., Costello-Boerrigter, L.C., Andersen, I.A., Cataliotti, A., Burnett, J.C., 2013. Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. *Eur Heart J* 34, 886–893. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs262>

Marrero, M.B., Schieffer, B., Paxton, W.G., Heerdt, L., Berk, B.C., Delafontaine, P., Bernstein, K.E., 1995. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT 1 receptor. *Nature* 375, 247–250. <https://doi.org/10.1038/375247a0>

Martyniak, A., Tomasik, P.J., 2022. A New Perspective on the Renin-Angiotensin System. *Diagnostics (Basel)* 13, 16. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13010016>

Masuyer, G., Yates, C.J., Sturrock, E.D., Acharya, K.R., 2014. Angiotensin-I converting enzyme (ACE): structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence. *Biol. Chem.* 395, 1135–1149. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0157>

Max, S.I., Liang, J.S., Potter, L.T., 1993. Purification and properties of m1-toxin, a specific antagonist of m1 muscarinic receptors. *J Neurosci* 13, 4293–4300. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-10-04293.1993>

McIntosh, M., Cruz, L.J., Hunkapiller, M.W., Gray, W.R., Olivera, B.M., 1982. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch Biochem Biophys* 218, 329–334. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90351-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90351-4)

Merrifield, R.B., 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>

Miguel-Carrasco, J.L., Zambrano, S., Blanca, A.J., Mate, A., Vázquez, C.M., 2010. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF- κ B. *J Inflamm (Lond)* 7, 21. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-21>

Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P., Adams, M.E., 1992. P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* 355, 827–829. <https://doi.org/10.1038/355827a0>

Miura, S., Karnik, S.S., 1999. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors bind angiotensin II

- through different types of epitope recognition. *J. Hypertens.* 17, 397–404. <https://doi.org/10.1097/00004872-199917030-00013>
- Miyata, N., Park, F., Li, X.F., Cowley, A.W., 1999. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* 277, F437–446. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.3.F437>
- Mourier, G., Dutertre, S., Fruchart-Gaillard, C., Ménez, A., Servent, D., 2003. Chemical synthesis of MT1 and MT7 muscarinic toxins: critical role of Arg-34 in their interaction with M1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* 63, 26–35. <https://doi.org/10.1124/mol.63.1.26>
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R.E., Dzau, V.J., 1993. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 268, 24539–24542.
- Murugan, D., Lau, Y.S., Lau, C.W., Mustafa, M.R., Huang, Y., 2016. Correction: Angiotensin 1-7 Protects against Angiotensin II-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Endothelial Dysfunction via Mas Receptor. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147892>
- Nair, D.G., Fry, B.G., Alewood, P., Kumar, P.P., Kini, R.M., 2007. Antimicrobial activity of omwaprins, a new member of the waprins family of snake venom proteins. *Biochem J* 402, 93–104. <https://doi.org/10.1042/BJ20060318>
- Nakagawa, P., Gomez, J., Grobe, J.L., Sigmund, C.D., 2020. The Renin-Angiotensin System in the Central Nervous System and Its Role in Blood Pressure Regulation. *Curr Hypertens Rep* 22, 7. <https://doi.org/10.1007/s11906-019-1011-2>
- Namkung, Y., LeGouill, C., Kumar, S., Cao, Y., Teixeira, L.B., Lukashcheva, V., Giubilaro, J., Simões, S.C., Longpré, J.-M., Devost, D., Hébert, T.E., Piñeyro, G., Leduc, R., Costa-Neto, C.M., Bouvier, M., Laporte, S.A., 2018. Functional selectivity profiling of the angiotensin II type 1 receptor using pathway-wide BRET signaling sensors. *Sci. Signal.* 11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat1631>
- Namsolleck, P., Recarti, C., Foulquier, S., Steckelings, U.M., Unger, T., 2014. AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Curr Hypertens Rep* 16, 416. <https://doi.org/10.1007/s11906-013-0416-6>
- Näreoja, K., Näsman, J., 2012. Selective targeting of G-protein-coupled receptor subtypes with venom peptides. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 186–201. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02305.x>
- Nataraj, C., Oliverio, M.I., Mannon, R.B., Mannon, P.J., Audoly, L.P., Amuchastegui, C.S., Ruiz, P., Smithies, O., Coffman, T.M., 1999. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest* 104, 1693–1701. <https://doi.org/10.1172/JCI7451>
- Näveri, L., Strömberg, C., Saavedra, J.M., 1994. Angiotensin II AT1 receptor mediated contraction of the perfused rat cerebral artery. *Neuroreport* 5, 2278–2280. <https://doi.org/10.1097/00001756-199411000-00018>
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R., Smith, T.F., 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371, 297–300. <https://doi.org/10.1038/371297a0>
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 79, 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Nguyen Dinh Cat, A., Montezano, A.C., Burger, D., Touyz, R.M., 2013. Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. *Antioxid Redox Signal* 19, 1110–1120. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4641>
- Nivedha, A.K., Lee, S., Vaidehi, N., 2022. Biased agonists differentially modulate the receptor conformation ensembles in Angiotensin II type 1 receptor. *J Mol Graph Model* 118, 108365. <https://doi.org/10.1016/j.jmgl.2022.108365>
- Noda, K., Feng, Y.H., Liu, X.P., Saad, Y., Husain, A., Karnik, S.S., 1996. The active state of the AT1 angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry* 35, 16435–16442. <https://doi.org/10.1021/bi961593m>
- Nouet, S., Amzallag, N., Li, J.-M., Louis, S., Seitz, I., Cui, T.-X., Alleaume, A.-M., Di

- Benedetto, M., Boden, C., Masson, M., Strosberg, A.D., Horiuchi, M., Couraud, P.-O., Nahmias, C., 2004. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT₂ receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* 279, 28989–28997. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403880200>
- Nouet, S., Nahmias, C., 2000. Signal Transduction from the Angiotensin II AT₂ Receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 11, 1–6. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(99\)00205-2](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(99)00205-2)
- Ocaranza, M.P., Moya, J., Barrientos, V., Alzamora, R., Hevia, D., Morales, C., Pinto, M., Escudero, N., García, L., Novoa, U., Ayala, P., Díaz-Araya, G., Godoy, I., Chiong, M., Lavandero, S., Jalil, J.E., Michea, L., 2014. Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J. Hypertens.* 32, 771–783. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000094>
- Oliveira, A.L., Viegas, M.F., da Silva, S.L., Soares, A.M., Ramos, M.J., Fernandes, P.A., 2022. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nat Rev Chem* 6, 451–469. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7>
- OMS | Panorama mondial de l'hypertension [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/fr/ (accessed 4.27.20).
- Ota, M., Hayashi, K., 1973. Localization of the five disulfide bridges in toxin B from the venom of the Indian cobra (*Naja naja*). *Biochem Biophys Res Commun* 55, 431–438. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(73\)91105-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(73)91105-4)
- Page, I.H., Helmer, O.M., 1940. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J. Exp. Med.* 71, 29–42. <https://doi.org/10.1084/jem.71.1.29>
- Palea, S., Maiga, A., Guilloteau, V., Rekik, M., Guérard, M., Rouget, C., Rischmann, P., Botto, H., Camparo, P., Lluell, P., Gilles, N., 2013. Effects of ρ -Dala a peptidic $\alpha(1)$ (A) -adrenoceptor antagonist in human isolated prostatic adenoma and anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 168, 618–631. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02231.x>
- Pang, P.S., Butler, J., Collins, S.P., Cotter, G., Davison, B.A., Ezekowitz, J.A., Filippatos, G., Levy, P.D., Metra, M., Ponikowski, P., Teerlink, J.R., Voors, A.A., Bharucha, D., Goin, K., Soergel, D.G., Felker, G.M., 2017. Biased ligand of the angiotensin II type 1 receptor in patients with acute heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIB, dose ranging trial (BLAST-AHF). *Eur Heart J* 38, 2364–2373. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx196>
- Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F.W., Thibault, G., Nemer, M., 2000. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 931–936. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.931>
- Park, B.M., Phuong, H.T.A., Yu, L., Kim, S.H., 2018. Alamandine Protects the Heart Against Reperfusion Injury via the MrgD Receptor. *Circ. J.* 82, 2584–2593. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-17-1381>
- Patel, S., Hussain, T., 2018. Dimerization of AT₂ and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep* 20, 41. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0845-3>
- Pavo, N., Prausmüller, S., Spinka, G., Goliasch, G., Bartko, P.E., Wurm, R., Arfsten, H., Strunk, G., Poglitsch, M., Domenig, O., Mascherbauer, J., Uyanik-Ünal, K., Hengstenberg, C., Zuckermann, A., Hülsmann, M., 2021. Myocardial Angiotensin Metabolism in End-Stage Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 77, 1731–1743. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.01.052>
- Peigneur, S., Billen, B., Derua, R., Waelkens, E., Debaveye, S., Béress, L., Tytgat, J., 2011. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem Pharmacol* 82, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.023>
- Peiró, C., Vallejo, S., Gemhardt, F., Azcutia, V., Heringer-Walther, S., Rodríguez-Mañas, L., Schultheiss, H.-P., Sánchez-Ferrer, C.F., Walther, T., 2007. Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *J Hypertens* 25, 2421–2425. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282f0143c>
- Peluso, A.A., Bertelsen, J.B., Andersen, K., Mortensen, T.P., Hansen, P.B., Summers, C., Bader, M., Santos, R.A., Steckelings, U.M., 2018. Identification of protein phosphatase involvement

in the AT2 receptor-induced activation of endothelial nitric oxide synthase. *Clin. Sci.* 132, 777–790. <https://doi.org/10.1042/CS20171598>

Peluso, A.A.B., Kempf, S.J., Verano-Braga, T., Rodrigues-Ribeiro, L., Johansen, L.E., Hansen, M.R., Kitlen, G., Haugaard, A.H., Sumners, C., Ditzel, H.J., Santos, R.A., Bader, M., Larsen, M.R., Steckelings, U.M., 2022. Quantitative Phosphoproteomics of the Angiotensin AT2-Receptor Signaling Network Identifies HDAC1 (Histone-Deacetylase-1) and p53 as Mediators of Antiproliferation and Apoptosis. *Hypertension* 101161HYPERTENSIONAHA12118620. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.18620>

Perryman, R., Renziehausen, A., Shaye, H., Kostagianni, A.D., Tsailanis, A.D., Thorne, T., Chatziathanasiadou, M.V., Sivolapenko, G.B., El Mubarak, M.A., Han, G.W., Zarzycka, B., Katritch, V., Lebon, G., Lo Nigro, C., Lattanzio, L., Morse, S.V., Choi, J.J., O'Neill, K., Kanaki, Z., Klinakis, A., Crook, T., Cherezov, V., Tzakos, A.G., Syed, N., 2022. Inhibition of the angiotensin II type 2 receptor AT2R is a novel therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, e2116289119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116289119>

Peterson, Y.K., Luttrell, L.M., 2017. The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol Rev* 69, 256–297. <https://doi.org/10.1124/pr.116.013367>

Petrel, C., Hocking, H.G., Reynaud, M., Upert, G., Favreau, P., Biass, D., Paolini-Bertrand, M., Peigneur, S., Tytgat, J., Gilles, N., Hartley, O., Boelens, R., Stocklin, R., Servent, D., 2013. Identification, structural and pharmacological characterization of τ -CnVA, a conopeptide that selectively interacts with somatostatin sst3 receptor. *Biochem Pharmacol* 85, 1663–1671. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.019>

Pierce, K.L., Lefkowitz, R.J., 2001. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 727–733. <https://doi.org/10.1038/35094577>

Pinzar, E., Wang, T., Garrido, M.R., Xu, W., Levy, P., Bottari, S.P., 2005. Angiotensin II induces tyrosine nitration and activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 579, 5100–5104. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.019>

Porrello, E.R., Delbridge, L.M.D., Thomas, W.G., 2009. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 958–972. <https://doi.org/10.2741/3289>

Prise en charge de l'hypertension artérielle de l'adulte [WWW Document], 2020. . Haute Autorité de Santé. URL https://www.has-sante.fr/jcms/c_2059286/fr/prise-en-charge-de-l-hypertension-arterielle-de-l-adulte (accessed 2.3.20).

Qaradakh, T., Apostolopoulos, V., Zulli, A., 2016. Angiotensin (1-7) and Alamandine: Similarities and differences. *Pharmacological Research* 111, 820–826. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.025>

Quinton, L., Girard, E., Maiga, A., Rekik, M., Lluet, P., Masuyer, G., Larregola, M., Marquer, C., Ciolek, J., Magnin, T., Wagner, R., Molgó, J., Thai, R., Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Chamot-Rooke, J., Ménez, A., Palea, S., Servent, D., Gilles, N., 2010. Isolation and pharmacological characterization of AdTx1, a natural peptide displaying specific insurmountable antagonism of the α 1A-adrenoceptor. *Br J Pharmacol* 159, 316–325. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00532.x>

Ragnarsson, L., Wang, C.-I.A., Andersson, Å., Fajarningsih, D., Monks, T., Brust, A., Rosengren, K.J., Lewis, R.J., 2013. Conopeptide ρ -TIA defines a new allosteric site on the extracellular surface of the α 1B-adrenoceptor. *J Biol Chem* 288, 1814–1827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.430785>

Rajagopal, S., Rajagopal, K., Lefkowitz, R.J., 2010. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 9, 373–386. <https://doi.org/10.1038/nrd3024>

Ramiro, I.B.L., Bjørn-Yoshimoto, W.E., Imperial, J.S., Gajewiak, J., Salcedo, P.F., Watkins, M., Taylor, D., Resager, W., Ueberheide, B., Bräuner-Osborne, H., Whitby, F.G., Hill, C.P., Martin, L.F., Patwardhan, A., Concepcion, G.P., Olivera, B.M., Safavi-Hemami, H., 2022. Somatostatin venom analogs evolved by fish-hunting cone snails: From prey capture behavior to identifying drug

leads. *Sci Adv* 8, eabk1410. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abk1410>

Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F.X., Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383–387. <https://doi.org/10.1038/nature06325>

Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T.A., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., Kobilka, B.K., 2011. Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549–555. <https://doi.org/10.1038/nature10361>

Raufman, J.P., Jensen, R.T., Sutliff, V.E., Pisano, J.J., Gardner, J.D., 1982. Actions of Gila monster venom on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Am J Physiol* 242, G470-474. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1982.242.5.G470>

Reaux, A., Fournie-Zaluski, M.C., Llorens-Cortes, C., 2001. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 157–162. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(01\)00381-2](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(01)00381-2)

Reid, I.A., 1992. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol* 262, E763-778. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.262.6.E763>

Résumé des Caractéristiques du Produit [WWW Document], n.d. URL <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0256378.htm> (accessed 8.3.22).

Reynaud, S., Ciolek, J., Degueldre, M., Saez, N.J., Sequeira, A.F., Duhoo, Y., Brás, J.L.A., Meudal, H., Cabo Díez, M., Fernández Pedrosa, V., Verdenaud, M., Boeri, J., Pereira Ramos, O., Ducancel, F., Vanden Driessche, M., Fourmy, R., Violette, A., Upert, G., Mourier, G., Beck-Sickinger, A.G., Mörl, K., Landon, C., Fontes, C.M.G.A., Miñambres Herráiz, R., Rodríguez de la Vega, R.C., Peigneur, S., Tytgat, J., Quinton, L., De Pauw, E., Vincentelli, R., Servent, D., Gilles, N., 2020. A Venomics Approach Coupled to High-Throughput Toxin Production Strategies Identifies the First Venom-Derived Melanocortin Receptor Agonists. *J Med Chem* 63, 8250–8264. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00485>

Reynaud, S., Laurin, S.-A., Ciolek, J., Barbe, P., Van Baelen, A.-C., Susset, M., Blondel, F., Ghazarian, M., Boeri, J., Vanden Driessche, M., Upert, G., Mourier, G., Kessler, P., Konnert, L., Beroud, R., Keck, M., Servent, D., Bouvier, M., Gilles, N., 2022. From a Cone Snail Toxin to a Competitive MC4R Antagonist. *J Med Chem* 65, 12084–12094. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00786>

Rodbell, M., 1980. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284, 17–22. <https://doi.org/10.1038/284017a0>

Rodrigues-Ferreira, S., Nahmias, C., 2010. An ATIPical family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins. *Trends Endocrinol Metab* 21, 684–690. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.009>

Romero, A., Dongil, P., Valencia, I., Vallejo, S., Hipólito-Luengo, Á.S., Díaz-Araya, G., Bartha, J.L., González-Arlanzón, M.M., Rivilla, F., de la Cuesta, F., Sánchez-Ferrer, C.F., Peiró, C., 2022. Pharmacological Blockade of NLRP3 Inflammasome/IL-1 β -Positive Loop Mitigates Endothelial Cell Senescence and Dysfunction. *Aging Dis* 13, 284–297. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0617>

Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F., Kobilka, B.K., 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature08144>

Rouget, C., Quinton, L., Maïga, A., Gales, C., Masuyer, G., Malosse, C., Chamot-Rooke, J., Thai, R., Mourier, G., De Pauw, E., Gilles, N., Servent, D., 2010. Identification of a novel snake peptide toxin displaying high affinity and antagonist behaviour for the α 2-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 161, 1361–1374. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00966.x>

Sabareesh, V., Gowd, K.H., Ramasamy, P., Sudarslal, S., Krishnan, K.S., Sikdar, S.K., Balaram, P., 2006. Characterization of contryphans from *Conus lorioisii* and *Conus amadis* that target

- calcium channels. *Peptides* 27, 2647–2654. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.07.009>
- Sandberg, K., Ji, H., Clark, A.J., Shapira, H., Catt, K.J., 1992. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 267, 9455–9458.
- Santos, R.A.S., e Silva, A.C.S., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V.B., Lopes, M.T., Bader, M., Mendes, E.P., Lemos, V.S., Campagnole-Santos, M.J., Schultheiss, H.-P., Speth, R., Walther, T., 2003. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8258–8263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>
- Schleifenbaum, J., 2019. Alamandine and Its Receptor MrgD Pair Up to Join the Protective Arm of the Renin-Angiotensin System. *Front Med (Lausanne)* 6. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00107>
- Schwarz, H., Bumpus, F.M., Page, I., 1957. Synthesis of a Biologically Active Octapeptide Similar to Natural Isoleucine Angiotonin Octapeptide1. <https://doi.org/10.1021/JA01578A030>
- Sehnert, B., Valero-Esquitino, V., Schett, G., Unger, T., Steckelings, U.M., Voll, R.E., 2022. Angiotensin AT2 Receptor Stimulation Alleviates Collagen-Induced Arthritis by Upregulation of Regulatory T Cell Numbers. *Frontiers in Immunology* 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.921488>
- Servent, D., Blanchet, G., Mourier, G., Marquer, C., Marcon, E., Fruchart-Gaillard, C., 2011. Muscarinic toxins. *Toxicon* 58, 455–463. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.004>
- Servent, D., Fruchart-Gaillard, C., 2009. Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *Journal of neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06092.x>
- Shah, J.N., Guo, G.-Q., Krishnan, A., Ramesh, M., Katari, N.K., Shahbaaz, M., Abdellattif, M.H., Singh, S.K., Dua, K., 2022. Peptides-based therapeutics: Emerging potential therapeutic agents for COVID-19. *Therapie* 77, 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.therap.2021.09.007>
- Sharpe, I.A., Gehrman, J., Loughnan, M.L., Thomas, L., Adams, D.A., Atkins, A., Palant, E., Craik, D.J., Adams, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J., 2001. Two new classes of conopeptides inhibit the alpha1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nat Neurosci* 4, 902–907. <https://doi.org/10.1038/nn0901-902>
- Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., 2011. β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences* 32, 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.05.002>
- Shibata, T., Suzuki, C., Ohnishi, J., Murakami, K., Miyazaki, H., 1996. Identification of regions in the human angiotensin II receptor type 1 responsible for Gi and Gq coupling by mutagenesis study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 383–389. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0067>
- Shinohara, T., Harada, M., Ogi, K., Maruyama, M., Fujii, R., Tanaka, H., Fukusumi, S., Komatsu, H., Hosoya, M., Noguchi, Y., Watanabe, T., Moriya, T., Itoh, Y., Hinuma, S., 2004. Identification of a G Protein-coupled Receptor Specifically Responsive to β -Alanine. *J. Biol. Chem.* 279, 23559–23564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314240200>
- Shukla, A.K., Manglik, A., Kruse, A.C., Xiao, K., Reis, R.I., Tseng, W.-C., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.-Y., Paduch, M., Tripathi-Shukla, P., Koide, A., Koide, S., Weis, W.I., Kossiakoff, A.A., Kobilka, B.K., Lefkowitz, R.J., 2013. Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497, 137–141. <https://doi.org/10.1038/nature12120>
- Silva, L.C.S., Fontes, M.A.P., Campagnole-Santos, M.J., Khosla, M.C., Campos, R.R., Guertzenstein, P.G., Santos, R.A.S., 1993. Cardiovascular effects produced by micro-injection of angiotensin-(1–7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain Research* 613, 321–325. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90920-I](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90920-I)
- Skarzyński, T., 1992. Crystal structure of alpha-dendrotoxin from the green mamba venom and its comparison with the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol* 224, 671–683. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90552-u](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90552-u)

- Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn, J.R., Shumway, N.P., 1954. The existence of two forms of hypertensin. *J Exp Med* 99, 275–282. <https://doi.org/10.1084/jem.99.3.275>
- Slivnick, J., Lampert, B.C., 2019. Hypertension and Heart Failure. *Heart Fail Clin* 15, 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2019.06.007>
- Soergel, D.G., Subach, R.A., Cowan, C.L., Violin, J.D., Lark, M.W., 2013. First Clinical Experience with TRV027: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Healthy Volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology* 53, 892–899. <https://doi.org/10.1002/jcph.111>
- Solinski, H.J., Gudermann, T., Breit, A., 2014. Pharmacology and Signaling of MAS-Related G Protein–Coupled Receptors. *Pharmacol Rev* 66, 570–597. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008425>
- Steckelings, U.M., Larhed, M., Hallberg, A., Widdop, R.E., Jones, E.S., Wallinder, C., Namsolleck, P., Dahlöf, B., Unger, T., 2011. Non-peptide AT₂-receptor agonists. *Current Opinion in Pharmacology, Cardiovascular and renal* 11, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.11.002>
- Stoyell-Conti, F.F., Itty, S., Abraham, C., Rigatto, K., West, C.A., Speth, R.C., 2021. 125I-Angiotensin 1-7 binds to a different site than angiotensin 1-7 in tissue membrane preparations. *Endocrine* 72, 529–538. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02572-2>
- Strachan, R.T., Sun, J., Rominger, D.H., Violin, J.D., Ahn, S., Thomsen, A.R.B., Zhu, X., Kleist, A., Costa, T., Lefkowitz, R.J., 2014. Divergent Transducer-specific Molecular Efficacies Generate Biased Agonism at a G Protein-coupled Receptor (GPCR). *J. Biol. Chem.* 289, 14211–14224. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548131>
- Stragier, B., De Bundel, D., Sarre, S., Smolders, I., Vauquelin, G., Dupont, A., Michotte, Y., Vanderheyden, P., 2008. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review. *Heart Fail Rev* 13, 321–337. <https://doi.org/10.1007/s10741-007-9062-x>
- Sugihara, S., Ichiki, T., Chen, Y., Harty, G.J., Heublen, D.M., Iyer, S.R., Huntley, B.K., Pan, S., Sangaralingham, S.J., McCormick, D.J., Burnett, J.C., 2019. P6342Subcutaneous delivery of NPA7, first-in-class novel bispecific designer peptide: enhances cardiorenal function and suppresses renin and aldosterone in vivo and in vitro. *Eur Heart J* 40. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz746.0939>
- Sukumaran, V., Watanabe, K., Veeraveedu, P.T., Gurusamy, N., Ma, M., Thandavarayan, R.A., Lakshmanan, A.P., Yamaguchi, K., Suzuki, K., Kodama, M., 2011. Olmesartan, an AT₁ Antagonist, Attenuates Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress and Cardiac Inflammatory Mediators in Rats with Heart Failure Induced by Experimental Autoimmune Myocarditis. *Int J Biol Sci* 7, 154–167.
- Summers, C., Alleyne, A., Rodríguez, V., Pioquinto, D.J., Ludin, J.A., Kar, S., Winder, Z., Ortiz, Y., Liu, M., Krause, E.G., de Kloet, A.D., 2020. Brain angiotensin type-1 and type-2 receptors: cellular locations under normal and hypertensive conditions. *Hypertens. Res.* 43, 281–295. <https://doi.org/10.1038/s41440-019-0374-8>
- Suzuki, S., Iida, M., Hiroaki, Y., Tanaka, K., Kawamoto, A., Kato, T., Oshima, A., 2022. Structural insight into the activation mechanism of MrgD with heterotrimeric Gi-protein revealed by cryo-EM. *Commun Biol* 5, 707. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03668-3>
- Swanson, G.N., Hanesworth, J.M., Sardinia, M.F., Coleman, J.K., Wright, J.W., Hall, K.L., Miller-Wing, A.V., Stobb, J.W., Cook, V.I., Harding, E.C., 1992. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul. Pept.* 40, 409–419. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(92\)90527-2](https://doi.org/10.1016/0167-0115(92)90527-2)
- Taal, M.W., Brenner, B.M., 2000. Renoprotective benefits of RAS inhibition: From ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney International* 57, 1803–1817. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00031.x>
- Takada, Y., Hiwada, K., Akutsu, H., Hashimoto, A., Kokubu, T., 1984. The immunocytochemical detection of angiotensin-converting enzyme in alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *Lung* 162, 317–323. <https://doi.org/10.1007/BF02715664>
- Teixeira, L.B., Parreiras-E-Silva, L.T., Bruder-Nascimento, T., Duarte, D.A., Simões, S.C., Costa, R.M., Rodríguez, D.Y., Ferreira, P.A.B., Silva, C.A.A., Abrao, E.P., Oliveira, E.B., Bouvier,

- M., Tostes, R.C., Costa-Neto, C.M., 2017. Ang-(1-7) is an endogenous β -arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy. *Sci Rep* 7, 11903. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12074-3>
- Tetzner, A., Naughton, M., Gebolys, K., Eichhorst, J., Sala, E., Villacañas, Ó., Walther, T., 2018. Decarboxylation of Ang-(1-7) to Ala1-Ang-(1-7) leads to significant changes in pharmacodynamics. *European Journal of Pharmacology* 833, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.031>
- Tigerstedt, R., Bergman, P.Q., 1898. Niere und Kreislauf1. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie* 8, 223–271. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1898.tb00272.x>
- Tikellis, C., Brown, R., Head, G.A., Cooper, M.E., Thomas, M.C., 2014. Angiotensin-converting enzyme 2 mediates hyperfiltration associated with diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 306, F773–780. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00264.2013>
- Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A.J., 2000. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275, 33238–33243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002615200>
- Tirupula, K.C., Desnoyer, R., Speth, R.C., Karnik, S.S., 2014. Atypical Signaling and Functional Desensitization Response of MAS Receptor to Peptide Ligands. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103520>
- Traverse Therapeutics, Inc., 2022. Efficacy and Safety of RE-021, a Dual Endothelin Receptor and Angiotensin Receptor Blocker, in Patients With Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS): a Randomized, Double-Blind, Active-Control, Dose-Escalation Study (Clinical trial registration No. NCT01613118). clinicaltrials.gov.
- Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M, 1992. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 71, 620–630. <https://doi.org/10.1161/01.RES.71.3.620>
- Turu, G., Szidonya, L., Gáborik, Z., Buday, L., Spät, A., Clark, A.J.L., Hunyady, L., 2006. Differential beta-arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors. *FEBS Lett* 580, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.044>
- Udovin, L., Otero-Losada, M., Bordet, S., Chevalier, G., Quarracino, C., Capani, F., Pérez-Lloret, S., 2021. Effects of angiotensin type 1 receptor antagonists on Parkinson's disease progression: An exploratory study in the PPMI database. *Parkinsonism Relat Disord* 86, 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.03.007>
- Unal, H., Karnik, S.S., 2014. Constitutive activity in the angiotensin II type 1 receptor: discovery and applications. *Adv Pharmacol* 70, 155–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417197-8.00006-7>
- Valencia, C., Dujet, C., Margathe, J.-F., Iturrioz, X., Roux, T., Trinquet, E., Villa, P., Hibert, M., Dupuis, E., Llorens-Cortes, C., Bonnet, D., 2017. A Time-Resolved FRET Cell-Based Binding Assay for the Apelin Receptor. *ChemMedChem* 12, 925–931. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700106>
- Valencia, Shamoan, L., Romero, A., De la Cuesta, F., Sánchez-Ferrer, C.F., Peiró, C., 2022. Angiotensin-(1-7), a protective peptide against vascular aging. *Peptides* 152, 170775. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170775>
- Van Baelen, A.-C., Robin, P., Kessler, P., Maïga, A., Gilles, N., Servent, D., 2022. Structural and Functional Diversity of Animal Toxins Interacting With GPCRs. *Front Mol Biosci* 9, 811365. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.811365>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., Velankar, S., 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* 50, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>

Vicore Pharma AB, 2022. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Parallel Group, Phase 3, Multicenter Trial Investigating the Efficacy and Safety of C21 as Add on to Standard of Care in Adult Subjects With COVID-19. (Clinical trial registration No. NCT04880642). clinicaltrials.gov.

Vieira, T.N., Saraiva, A.L.L., Guimarães, R.M., Luiz, J.P.M., Pinto, L.G., de Melo Rodrigues Ávila, V., Goulart, L.R., Cunha-Junior, J.P., McNaughton, P.A., Cunha, T.M., Ferreira, J., Silva, C.R., 2022. Angiotensin type 2 receptor antagonism as a new target to manage gout. *Inflammopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-01076-x>

Violin, J.D., DeWire, S.M., Yamashita, D., Rominger, D.H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E.J., Gowen, M., Lark, M.W., 2010. Selectively Engaging β -Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *J Pharmacol Exp Ther* 335, 572–579. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.173005>

Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 2003. Independent β -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *PROC. NAT. ACAD. OF SCI. (U.S.A.)* 100, 10782–10787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834556100>

Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2018. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem* 87, 897–919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>

Wettschureck, N., Offermanns, S., 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* 85, 1159–1204. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005>

Wiemer, G., Dobrucki, W., Louka, F.R., Malinski, T., Heitsch, H., 2002. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 40, 847–852. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000037979.53963.8F>

Williams, J.A., Day, M., Heavner, J.E., 2008. Ziconotide: an update and review. *Expert Opin Pharmacother* 9, 1575–1583. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.9.1575>

Wingler, L.M., McMahon, C., Staus, D.P., Lefkowitz, R.J., Kruse, A.C., 2019. Distinctive Activation Mechanism for Angiotensin Receptor Revealed by a Synthetic Nanobody. *Cell* 176, 479–490.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.006>

Wingler, L.M., Skiba, M.A., McMahon, C., Staus, D.P., Kleinhenz, A.L.W., Suomivuori, C.-M., Latorraca, N.R., Dror, R.O., Lefkowitz, R.J., Kruse, A.C., 2020. Angiotensin and biased analogs induce structurally distinct active conformations within a GPCR. *Science* 367, 888–892. <https://doi.org/10.1126/science.aay9813>

Wirth, A., Benyó, Z., LukasoVA, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horváth, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., Lemmer, B., Schütz, G., Gutkind, J.S., Offermanns, S., 2008. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med* 14, 64–68. <https://doi.org/10.1038/nm1666>

Wong, M.K.S., 2016. Subchapter 29D - Angiotensin Converting Enzymes, in: Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K. (Eds.), *Handbook of Hormones*. Academic Press, San Diego, pp. 263-e29D-4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00254-3>

World Health Organization, 2021. Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults. World Health Organization, Geneva.

Wright, J.W., Miller-Wing, A.V., Shaffer, M.J., Higginson, C., Wright, D.E., Hanesworth, J.M., Harding, J.W., 1993. Angiotensin II(3-8) (ANG IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory. *Brain Res. Bull.* 32, 497–502. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90297-o](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90297-o)

Wright, J.W., Mizutani, S., Harding, J.W., 2008. Pathways involved in the transition from hypertension to hypertrophy to heart failure. Treatment strategies. *Heart Fail Rev* 13, 367–375. <https://doi.org/10.1007/s10741-007-9060-z>

Wruck, C.J., Funke-Kaiser, H., Pufe, T., Kusserow, H., Menk, M., Scheffe, J.H., Kruse, M.L., Stoll, M., Unger, T., 2005. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 57–64. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000150662.51436.14>

Wu, F., Song, G., de Graaf, C., Stevens, R.C., 2017. Structure and Function of Peptide-Binding G Protein-Coupled Receptors. *Journal of Molecular Biology*, John Kendrew's 100th Anniversary Special Edition 429, 2726–2745. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.06.022>

Wu, H., Sun, Q., Yuan, S., Wang, J., Li, F., Gao, H., Chen, X., Yang, R., Xu, J., 2022. AT1 Receptors: Their Actions from Hypertension to Cognitive Impairment. *Cardiovasc Toxicol* 22, 311–325. <https://doi.org/10.1007/s12012-022-09730-0>

Xiao, R., Zhao, H.-C., Yan, T.-T., Zhang, Q., Huang, Y.-S., 2021. Angiotensin II and hypoxia induce autophagy in cardiomyocytes via activating specific protein kinase C subtypes. *Cardiovasc Diagn Ther* 11, 744–759. <https://doi.org/10.21037/cdt-20-883>

Xu Ping, Costa-Goncalves Andrey C., Todiras Mihail, Rabelo Luiza A., Sampaio Walkyria O., Moura Marina M., Sousa Santos Sergio, Luft Friedrich C., Bader Michael, Gross Volkmar, Alenina Natalia, Santos Robson A.S., 2008. Endothelial Dysfunction and Elevated Blood Pressure in Mas Gene-Deleted Mice. *Hypertension* 51, 574–580. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.102764>

Xue, H., Zhou, L., Yuan, P., Wang, Z., Ni, J., Yao, T., Wang, J., Huang, Y., Yu, C., Lu, L., 2012. Counteraction between angiotensin II and angiotensin-(1-7) via activating angiotensin type I and Mas receptor on rat renal mesangial cells. *Regul Pept* 177, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.04.002>

Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., Yuliantie, E., Xie, L., Tao, H., Cheng, J., Liu, Q., Zhao, S., Shui, W., Jiang, Y., Wang, M.-W., 2021. G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduct Target Ther* 6, 7. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00435-w>

Yang, D.C., Deuis, J.R., Dashevsky, D., Dobson, J., Jackson, T.N.W., Brust, A., Xie, B., Xie, B., Koludarov, I., Debono, J., Hendrikx, I., Hodgson, W.C., Josh, P., Nouwens, A., Baillie, G.J., Bruxner, T.J.C., Alewood, P.F., Lim, K.K.P., Frank, N., Vetter, I., Fry, B.G., 2016. The Snake with the Scorpion's Sting: Novel Three-Finger Toxin Sodium Channel Activators from the Venom of the Long-Glanded Blue Coral Snake (*Calliophis bivirgatus*). *Toxins (Basel)* 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8100303>

Yang, H.Y., Erdös, E.G., Levin, Y., 1970. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim. Biophys. Acta* 214, 374–376. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(70\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0005-2795(70)90017-6)

Yang Rui, Smolders Ilse, Vanderheyden Patrick, Demaegdt Heidi, Van Eeckhaut Ann, Vauquelin Georges, Lukaszuk Aneta, Tourwé Dirk, Chai Siew Yeen, Albiston Anthony L., Nahmias Clara, Walther Thomas, Dupont Alain G., 2011. Pressor and Renal Hemodynamic Effects of the Novel Angiotensin A Peptide Are Angiotensin II Type 1A Receptor Dependent. *Hypertension* 57, 956–964. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.161836>

Yu, J., Wang, S., Shi, W., Zhou, W., Niu, Y., Huang, S., Zhang, Y., Zhang, A., Jia, Z., 2021. Roxadustat prevents Ang II hypertension by targeting angiotensin receptors and eNOS. *JCI Insight* 6, e133690. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.133690>

Yugandhar, V.G., Clark, M.A., 2013. Angiotensin III: a physiological relevant peptide of the renin angiotensin system. *Peptides* 46, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.04.014>

Zebala, J.A., Schuler, A.D., Kahn, S.J., Maeda, D.Y., 2019. Desmetramadol Is Identified as a G-Protein Biased μ Opioid Receptor Agonist. *Front Pharmacol* 10, 1680. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01680>

Zhang, H., Han, G.W., Batyuk, A., Ishchenko, A., White, K.L., Patel, N., Sadybekov, A., Zamlynny, B., Rudd, M.T., Hollenstein, K., Tolstikova, A., White, T.A., Hunter, M.S., Weierstall, U., Liu, W., Babaoglu, K., Moore, E.L., Katz, R.D., Shipman, J.M., Garcia-Calvo, M., Sharma, S., Sheth, P., Soisson, S.M., Stevens, R.C., Katritch, V., Cherezov, V., 2017. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature* 544, 327–332. <https://doi.org/10.1038/nature22035>

Zhang, H., Shi, Y.-G., Woods, J.H., Watson, S.J., Ko, M.-C., 2007. Central κ -opioid receptor-mediated antidepressant-like effects of nor-Binaltorphimine: Behavioral and BDNF mRNA

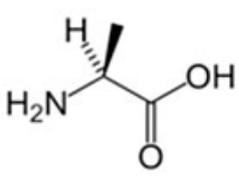
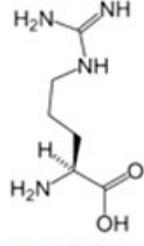
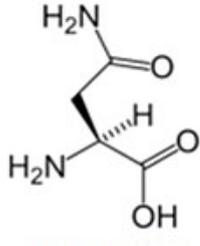
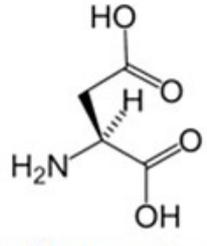
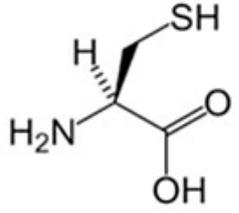
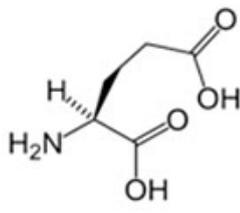
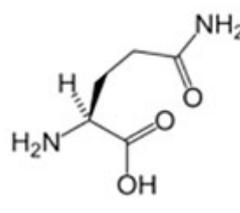
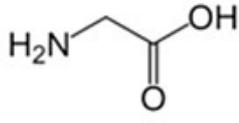
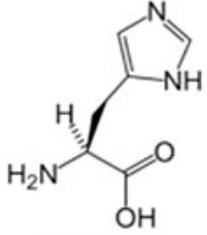
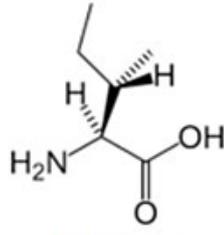
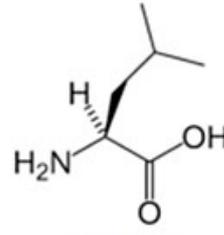
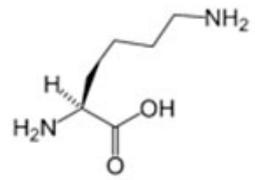
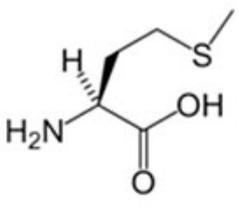
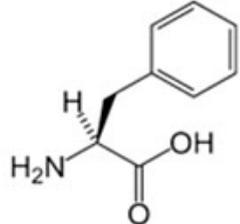
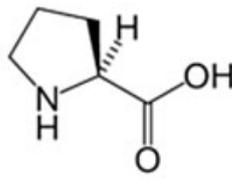
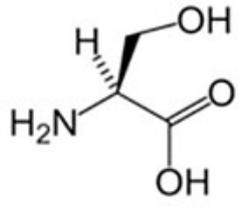
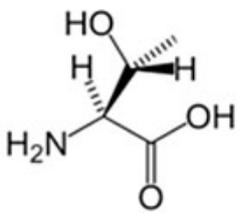
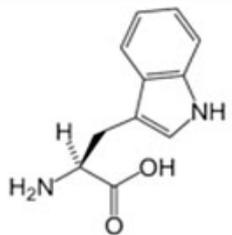
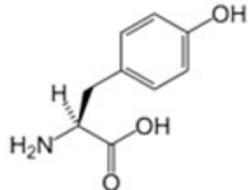
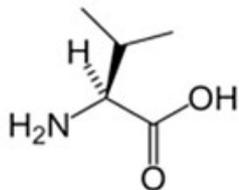
expression studies. *European Journal of Pharmacology* 570, 89–96.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.05.045>

Zhang, H., Unal, H., Gati, C., Han, G.W., Liu, W., Zatselin, N.A., James, D., Wang, D., Nelson, G., Weierstall, U., Sawaya, M.R., Xu, Q., Messerschmidt, M., Williams, G.J., Boutet, S., Yefanov, O.M., White, T.A., Wang, C., Ishchenko, A., Tirupula, K.C., Desnoyer, R., Coe, J., Conrad, C.E., Fromme, P., Stevens, R.C., Katritch, V., Karnik, S.S., Cherezov, V., 2015. Structure of the Angiotensin Receptor Revealed by Serial Femtosecond Crystallography. *Cell* 161, 833–844.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.011>

Zhang, J., Pratt, R.E., 1996. The AT₂ receptor selectively associates with G α ₂ and G α ₃ in the rat fetus. *J Biol Chem* 271, 15026–15033.

9 Annexes

Annexe 1 : Liste des 20 acides aminés naturels.

			
Alanine	Arginine	Asparagine	Acide aspartique
			
Cystéine	Acide glutamique	Glutamine	Glycine
			
Histidine	Isoleucine	Leucine	Lysine
			
Méthionine	Phénylalanine	Proline	Sérine
			
Thréonine	Tryptophane	Tyrosine	Valine

Annexe 2 : Étapes de la synthèse peptidique sur phase solide.

Gonflement de la résine : nous utilisons une résine dite Wang, formée d'un bras qui crée un lien ester avec le premier AA de la séquence greffée, bras qui sera clivé en conditions spécifiques acides à la fin de la synthèse. Cette résine doit être gonflée (ici avec du dichlorométhane, DCM) en début de synthèse pour rendre accessible les groupements réactifs. La charge de résine théorique est définie comme le nombre de moles de bras par gramme de résine, qui correspond approximativement au nombre de moles de peptides synthétisés par gramme de résine.

Déprotection : le groupement Fmoc de chaque AA à greffer est déprotégé en milieu basique (pipéridine à 20% dans la N-méthyl-2-pyrrolidone, NMP) par β -élimination.

Activation et couplage : la formation d'une chaîne peptidique n'est pas spontanée à température ambiante car l'amine agit comme une base avec l'acide carboxylique, conduisant à la formation d'un sel d'ammonium non réactif. L'incorporation d'un nouvel AA requiert donc l'activation de la fonction COOH pour permettre l'attaque nucléophile du N-ter de la chaîne peptidique. Le groupement carboxylique est activé par une solution d'HCTU (O-(1H-6-chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate) en présence d'une base, la 4-méthylmorpholine (NMM), permettant la formation d'un ester actif (**Figure S1**). La fonction amine de l'AA à coupler réagit avec cet ester activé pour former le lien amide. Après chaque couplage, le peptide n'ayant pas réagi est acétylé par une solution d'anhydride acétique.

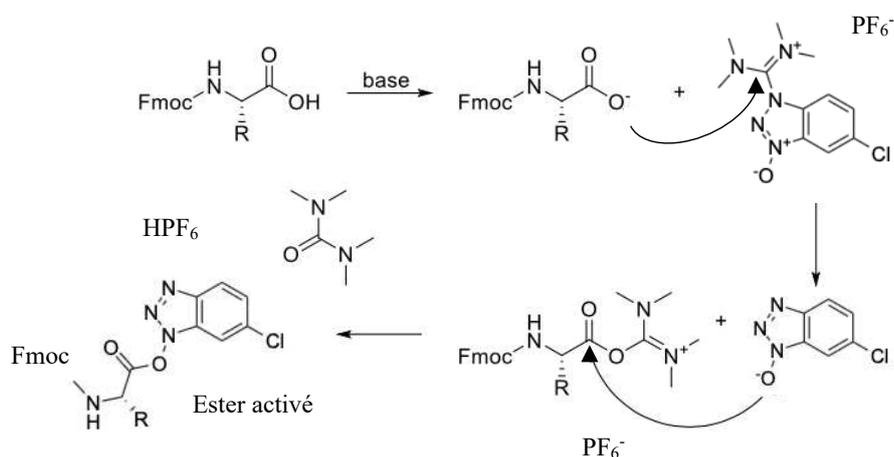


Figure S1 : mécanisme d'activation de l'acide carboxylique avec l'HCTU.

Clivage : à la fin de la synthèse, la solution de déprotection et d'élimination du Fmoc du dernier AA est collectée et son absorbance à 300 nm par spectroscopie UV-Visible est mesurée, nous permettant d'établir le rendement de synthèse. Le peptide est ensuite clivé de son support solide et les chaînes latérales sont déprotégées par une solution de TFA (acide

trifluoroacétique)/Thioanisole/Anisole/H₂O/TIPS (triisopropylsilane). Le TFA permet le clivage de la résine et la déprotection des groupements protecteurs des chaînes latérales labiles des AA en milieu acide.

Le peptide est ensuite précipité dans l'éther éthylique puis solubilisé dans une solution de TFA 0,1% pour être analysé.

Annexe 3 : Contrôle qualité des peptides produits.

Contrôle qualité du produit linéaire brut :

Quantification : le peptide linéaire brut solubilisé dans H₂O/TFA 0,1% est quantifié par spectroscopie UV-Visible par mesure de son absorbance à 280 nm (à condition qu'il y ait les groupements aromatiques Tyr ou Trp). La concentration de la solution est ensuite calculée selon la loi de Beer-Lambert :

$$c = \frac{\epsilon \times l}{A}$$

c = concentration de l'échantillon en mol/L ; l = longueur du trajet optique correspondant à l'épaisseur de la cuve en cm ; ϵ = coefficient d'extinction molaire à 280 nm en L/mol/cm.

HPLC (High-performance liquid chromatography) analytique en phase inverse : les composés sont séparés selon leur hydrophobicité (les plus hydrophobes étant les plus retenus) sur une colonne composée de particules de silices greffées de chaînes alkyles et élués grâce à un gradient d'acétonitrile adapté permet. La mesure de l'absorbance en sortie de colonne permet d'obtenir un chromatogramme représentatif des produits présents dans l'échantillon.

Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) : la technique de spectrométrie de masse à ionisation par électrospray de type trappe à ion ESI-IT (ElectroSpray Ionisation-Ion Trap) est couplée à une purification par HPLC. L'échantillon est ensuite ionisé dans la source, séparé dans l'analyseur de masse et détecté, renseignant alors sur les masses des produits présent dans l'échantillon. Elle permet la séparation de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Purification du produit linéaire brut par HPLC :

L'échantillon brut en fin de synthèse est purifié par une méthode chromatographique semi-préparative en phase inverse à un débit de 4 mL/min. Une optimisation du gradient permet d'isoler seulement le peptide linéaire pur.

Contrôle qualité du produit linéaire purifié : Par *quantification (cf ci-avant) et par HPLC analytique (cf ci-avant)*.

MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization – Time of flight) : cette technique de spectrométrie de masse non séparative est réalisée en mode reflectron. L'échantillon est co-cristallisé sur plaque avec une solution d'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique (HCCA). Des tirs de laser pulsés viennent désorber la matrice acide qui ionise alors le composé par transfert de charge. Par différences de potentiels appliquées, les molécules ionisées sont accélérées puis transférées dans l'analyseur TOF. L'analyseur permet alors de séparer les molécules ionisées en fonction de leur

rapport masse sur charge (m/z). Le signal est enregistré et retransmis sous forme de spectre de masse. Les valeurs de m/z reportées correspondent au pic mono-isotopique.

Contrôle qualité du produit oxydé brut : *par HPLC analytique en phase inverse (cf ci-avant).*

Purification du produit oxydé brut par HPLC :

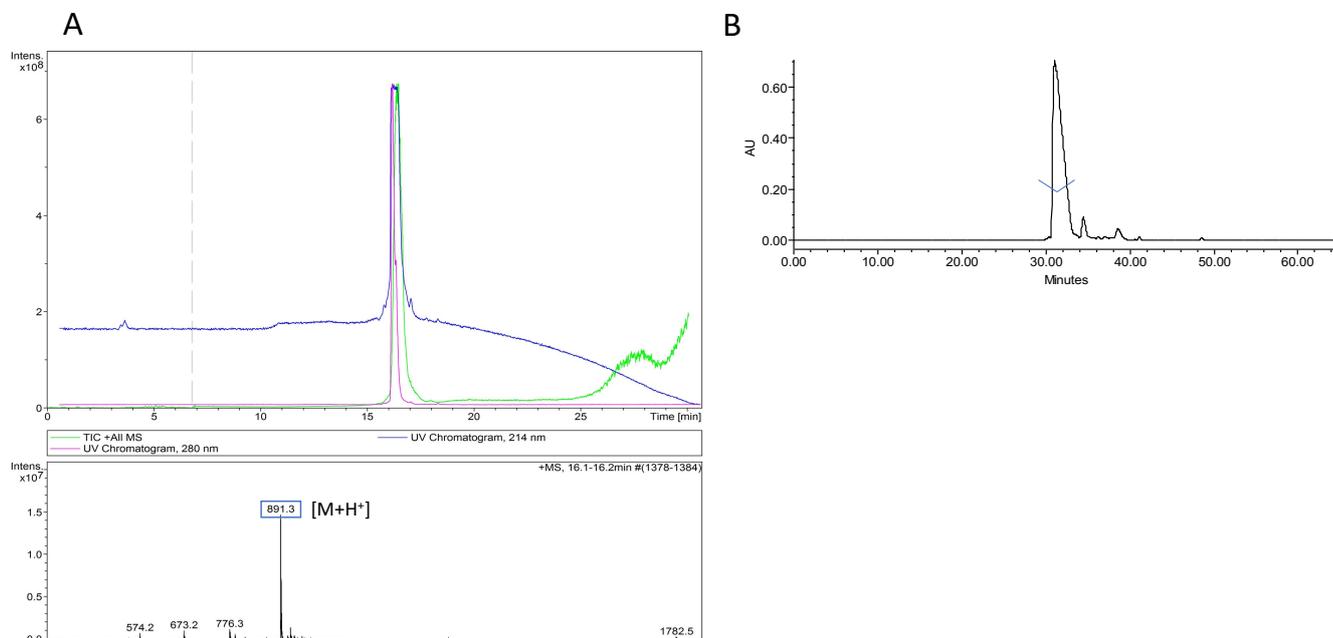
L'échantillon brut en fin de synthèse est purifié par une méthode chromatographique préparative en phase inverse à un débit de 13 mL/min. Une optimisation du gradient permet d'isoler seulement le peptide oxydé pur.

Contrôle qualité du produit oxydé purifié : *par quantification (cf ci-avant), par HPLC analytique (cf ci-avant) et par LC-MS (cf ci-avant).*

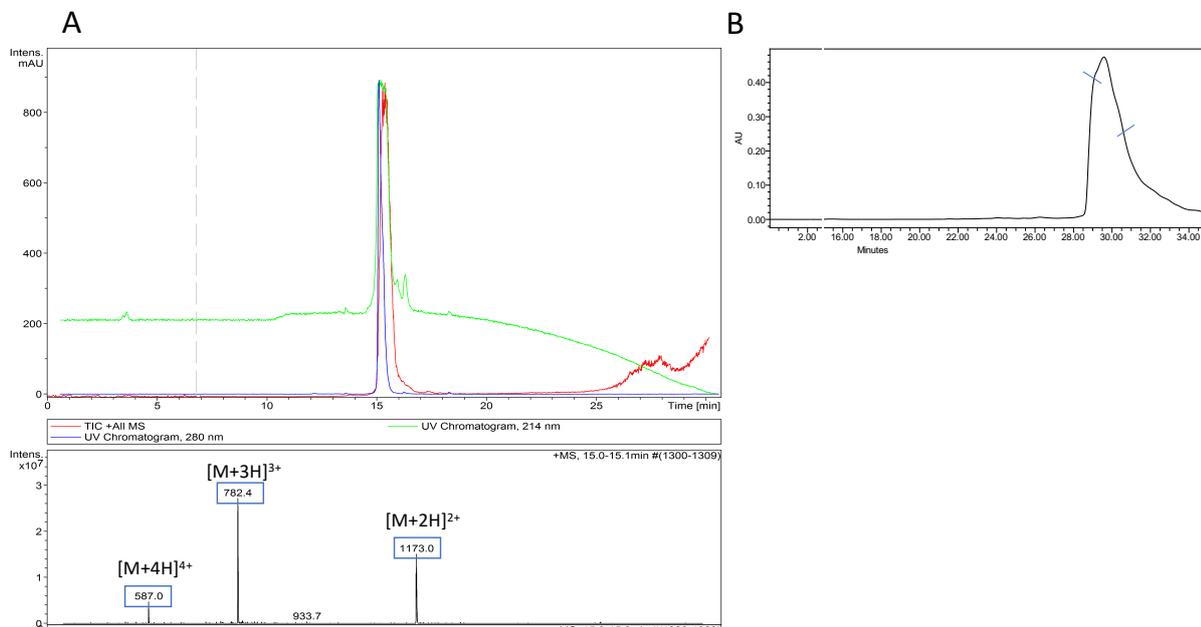
Les étapes de contrôle qualité du produit brut, de la purification et du contrôle qualité du produit purifié sont les mêmes pour tous les peptides synthétisés.

Sauf mentionné différemment le gradient utilisé en HPLC analytique, semi-préparative ou préparative est de 1% d'ACN/min et le gradient utilisé en LC-MS est de 5 à 100% d'ACN en 60 min, avec un débit de 1 mL/min. Les phases mobiles utilisées sont A : H₂O/TFA 0,1% et B : ACN/TFA 0,1%.

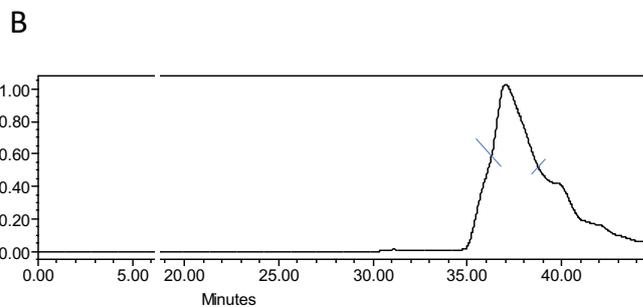
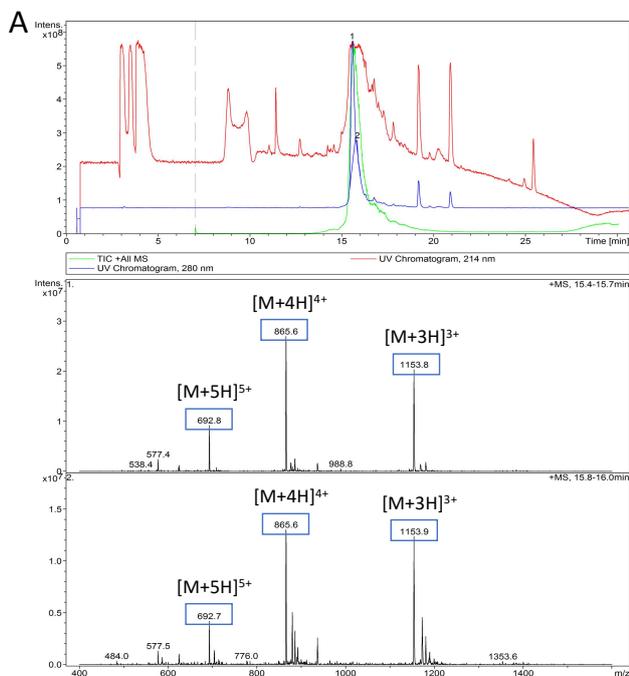
Annexe 4 : (A) Analyse du spectre de masse extrait de l'analyse LC-MS du brut de synthèse linéaire de A-CTX-cMila en mode ESI +, la masse correspondant au produit final est encadrée ; (B) Profil HPLC de la purification du brut de synthèse, le peptide linéaire purifié est récupéré entre les lignes bleues ; Colonne Vydac C18 300Å 10 µm 10 x 250 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 4 mL/min.



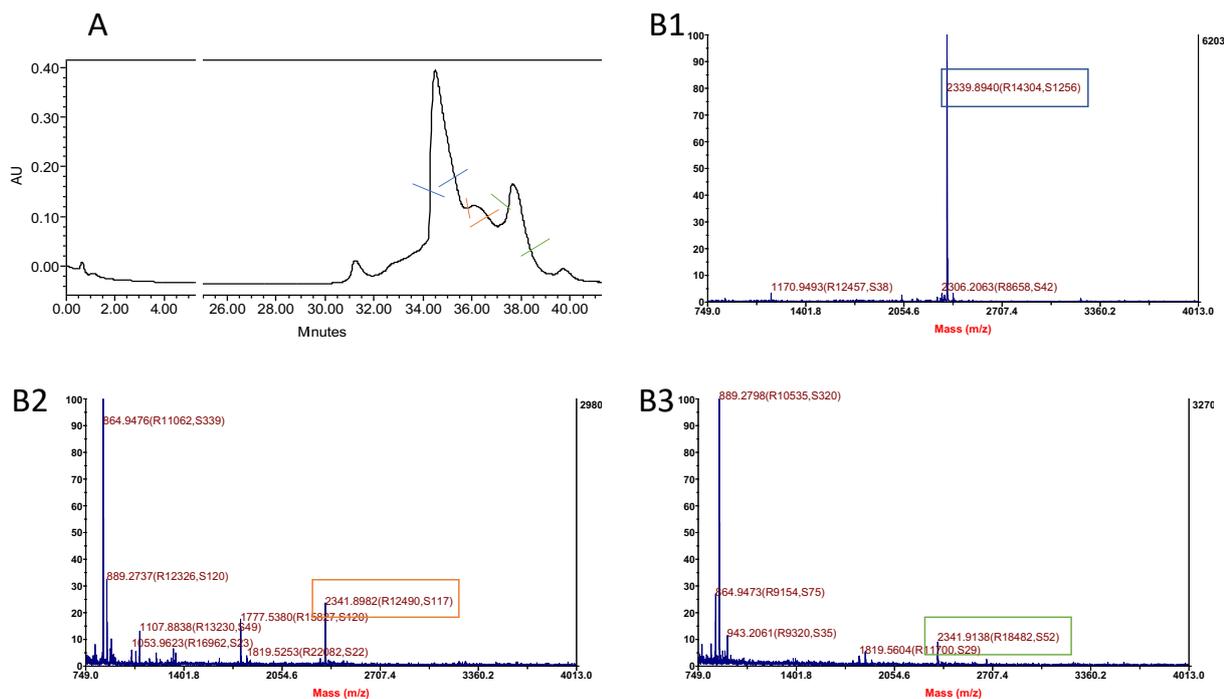
Annexe 5 : (A) Analyse du spectre de masse extrait de l'analyse LC-MS du brut de synthèse linéaire de A-CTX-MilVa en mode ESI +, la masse correspondant au produit final est encadrée ; (B) Profil HPLC de la purification du brut de synthèse, le peptide linéaire purifié est récupéré entre les lignes bleues ; Colonne Vydac C18 300Å 10 µm 10 x 250 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 4 mL/min.



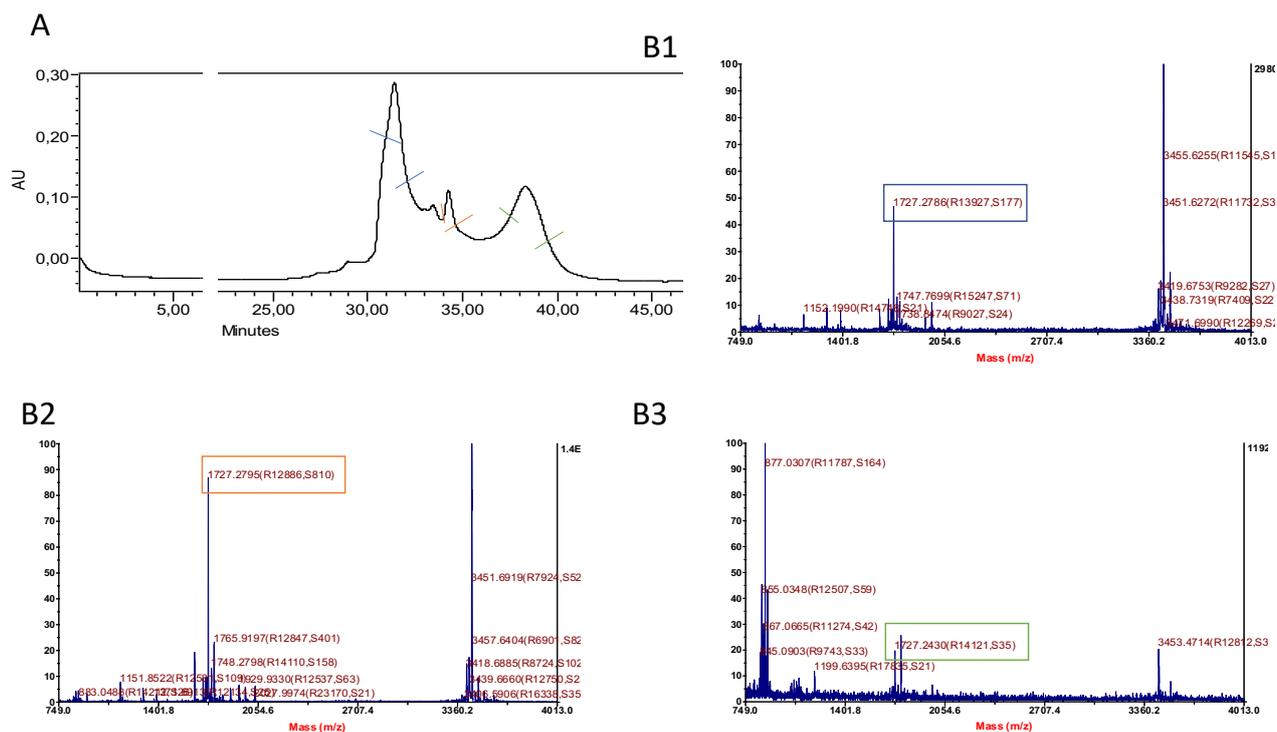
Annexe 6 : (A) Analyse du spectre de masse extrait de l'analyse LC-MS du brut de synthèse linéaire de A-TRTX-Por1a en mode ESI +, la masse correspondant au produit final est encadrée ; (B) Profil HPLC de la purification du brut de synthèse, le peptide linéaire purifié est récupéré entre les lignes bleues ; Colonne Vydac C18 300Å 10 µm 10 x 250 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 4 mL/min.



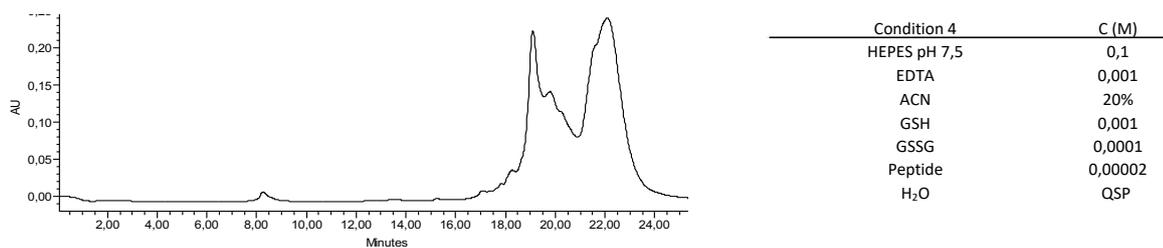
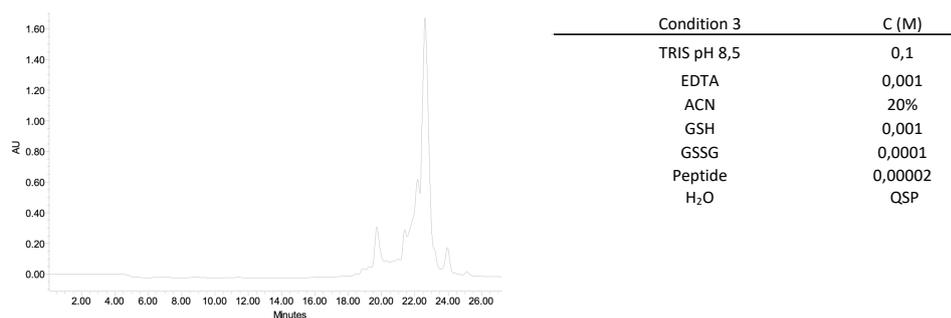
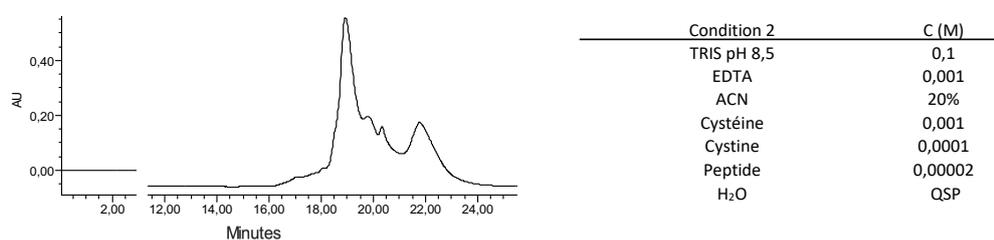
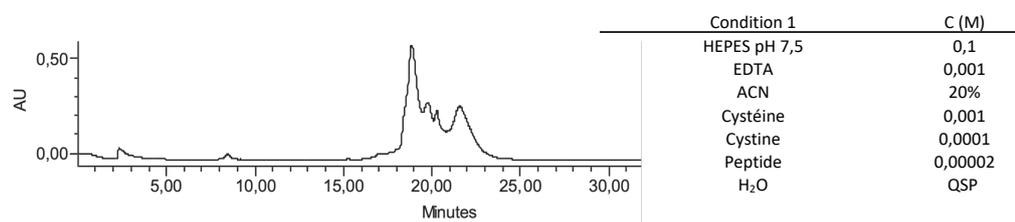
Annexe 7 : Contrôle qualité de la forme oxydée de A-CTX-MilVa. (A) Profil du chromatogramme de purification du produit oxydé. En bleu, pic récolté correspondant au produit final, en orange et vert sont représentées les autres fractions pour analyse ; Colonne Vydac C18 300Å 10 µm 10 x 250 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 4 mL/min. (B) Analyse du spectre de masse MALDI-TOF des fractions de purification, B1 correspondant à la fraction bleue, B2 à la fraction orange, B3 à la fraction verte. La masse représentée correspond à la masse monoisotopique.



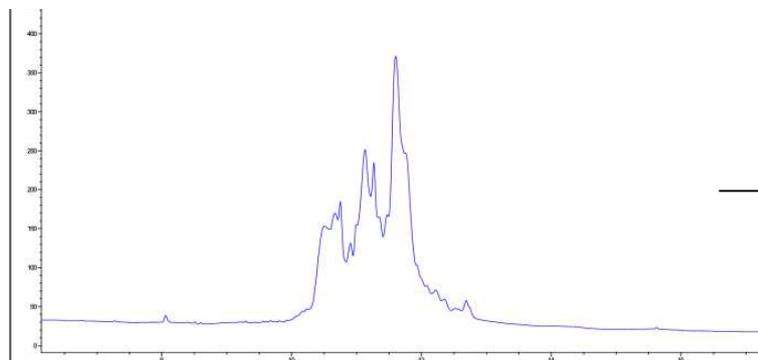
Annexe 8 : Contrôle qualité de la forme oxydée de A-TRTX-Por1a. (A) Profil du chromatogramme de purification du produit oxydé. En bleu, pic récolté correspondant au produit final, en orange et vert sont représentées les autres fractions pour analyse ; Colonne Vydac C18 300Å 10 µm 10 x 250 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 4 mL/min. (B) Analyse du spectre de masse MALDI-TOF des fractions de purification, B1 correspondant à la fraction bleue, B2 à la fraction orange, B3 à la fraction verte. La masse représentée correspond à la masse monoisotopique $[M+2H]^{2+}$.



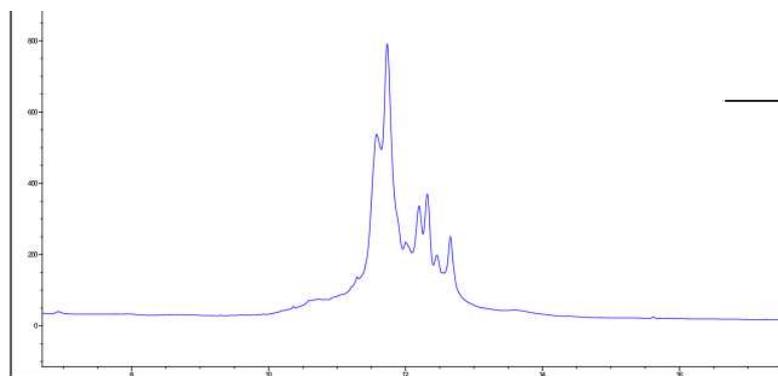
Annexe 9 : Conditions d'oxydation de Por1a réalisées au laboratoire avec le profil HPLC de purification associé ; Colonne Vydac C18 300Å 10 µm 10 x 250 mm ; 0-80% ACN en 40 min, débit : 4 mL/min. Ici sont représentés les chromatogrammes après 48h d'oxydation.



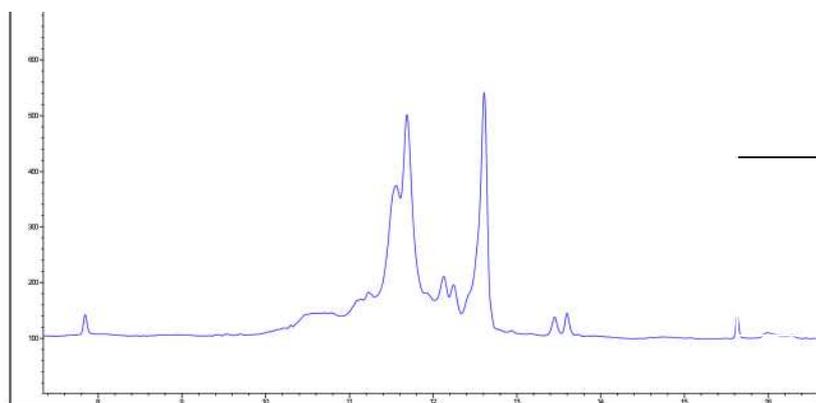
Annexe 10 : Conditions d'oxydation de Por1a réalisées en collaboration avec Smartox Biotechnology avec le profil HPLC de purification associé. Ici sont représentés les chromatogrammes après 48h d'oxydation.



Condition 1 (24h)	
	C (M)
TRIS pH 8,2	0,1
GSH	0,0005
GSSG	0,005
Peptide	0,00001
H ₂ O	QSP

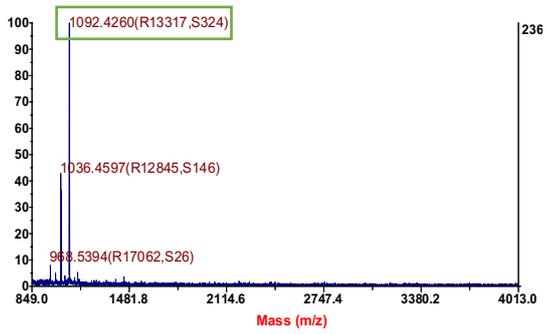


Condition 2 (48h)	
	C (M)
TRIS pH 8,2	0,1
DMSO	10%
ACN	10%
TFE	10%
guanidine	1
Peptide	0,00001
H ₂ O	QSP

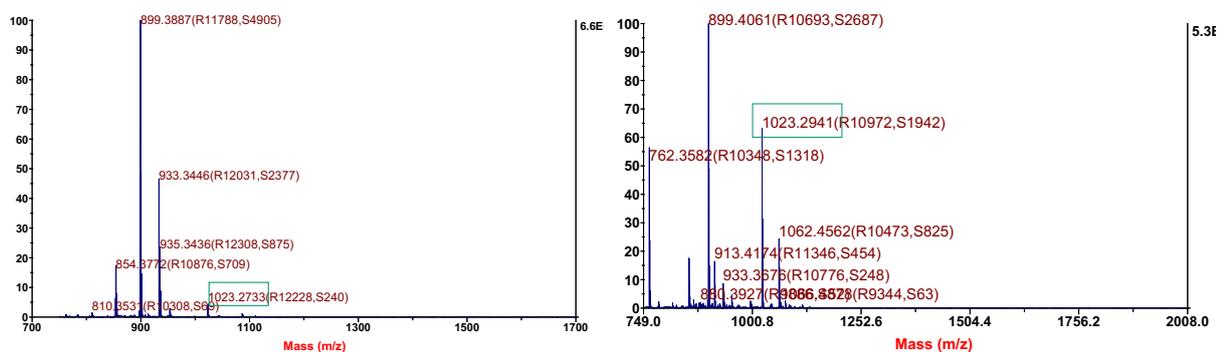


Condition 3 (24h)	
	C (M)
TRIS pH 8,2	0,1
Brij 35	10%
GSH	0,001
cystamine	0,001
Peptide	0,00001
H ₂ O	QSP

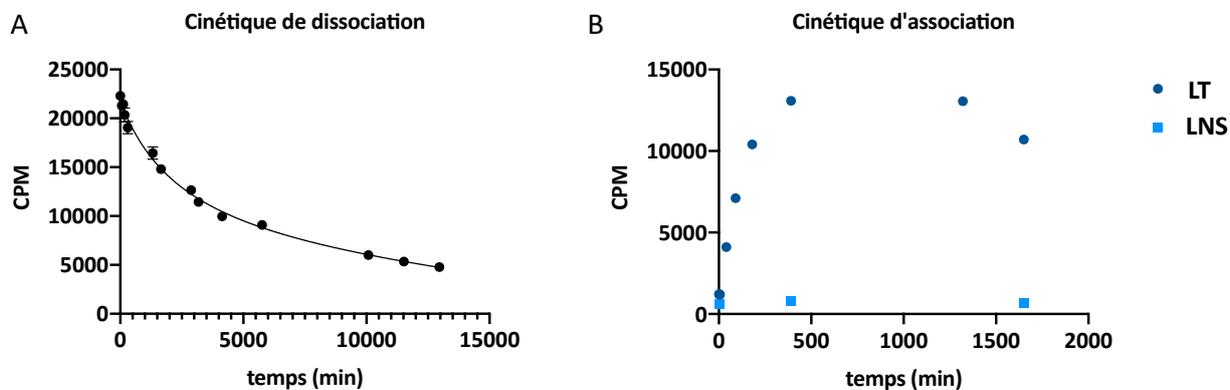
Annexe 11 : Analyses de masse par MALDI-TOF de la iodation de la Sar1, Ile8-AngII avec l'utilisation de iodogène. Le produit monoiodé correspond à la masse encadrée en vert.



Annexe 12 : Analyses de masse par MALDI-TOF de la iodation de l'Ang1-7, (A) par l'utilisation de chloramine-T, (B) par l'utilisation de iodogène. Le produit monoiodé correspond à la masse encadrée en vert.



Annexe 13 : (A) cinétique de dissociation de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII avec 3,3 μL de membrane contenant le récepteur AT1 par tube et 2 μM de ligand froid ; (B) cinétique d'association de la ^{125}I -Sar1, Ile8-AngII avec 0,18 μL de membrane contenant le récepteur AT1 par tube, LNS réalisée en ajoutant 2 μM de ligand froid. CPM : coups par minute.



Méthode

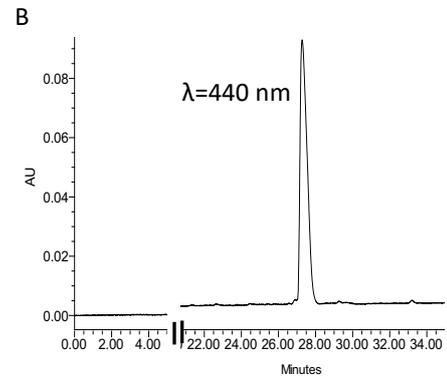
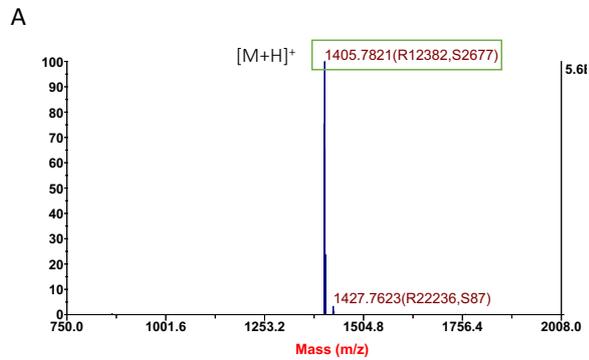
Un mélange contenant les membranes de cellules contenant le récepteur AT1 (0,18 μL), le radioligand (^{125}I -Sar1, Ile8-AngII, 50 000 CPM) est préparé dans le tampon de liaison (TRIS 100 mM pH 7,5). Après lavage et filtration, la radioactivité est comptée à différents temps : de 1 min à 28 h. Le comptage de la radioactivité est aussi réalisé en rajoutant au mix la solution de ligand froid en excès à 2 μM (mesure de la liaison non spécifique à 10 min, 390 min et 1650 min). La filtration de chaque tube à travers un filtre préalablement saturé au PEI (polyéthylèneimine, 0,5%, sigma Aldrich) permet ainsi de retracer la cinétique d'association du ligand radioactif.

Un mix contenant les membranes contenant le récepteur AT1 (3,3 μL), le radioligand (^{125}I -Sar1, Ile8-AngII 50 000 CPM), le ligand froid en excès (AngII à 2 μM) est préparé dans le tampon de liaison. Après lavage et filtration, la radioactivité est comptée à différents temps : de 1 min à 12960 min. La filtration de chaque tube à travers un filtre préalablement saturé au PEI permet ainsi de retracer la cinétique de dissociation du ligand radioactif.

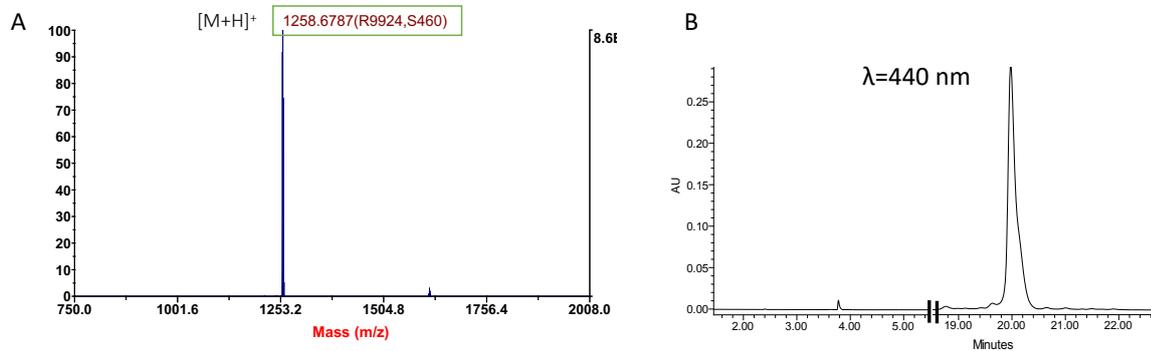
Annexe 14 : Liste des peptides produits marqués à un fluorophore.

Nom	Séquence	Fluorophore
AngII	DRVYIHPF	Carboxyfluorescéine en N-ter
Ang1-7	DRVYIHP	Carboxyfluorescéine en N-ter
β -Ala-Ang1-7	β -Ala-DRVYIHP	Carboxyfluorescéine en N-ter
β -Ala ₂ -Ang1-7	β -Ala ₂ -DRVYIHP	Carboxyfluorescéine en N-ter
β -Ala-Alamandine	β -Ala-ARVYIHP	Carboxyfluorescéine en N-ter
Ang1-7-Lys(ivDde)	Boc-D-RVYIH-KivDde	Carboxyfluorescéine en C-ter
Alamandine-Lys(ivDde)	Boc-A-RVYIH-KivDde	Carboxyfluorescéine en C-ter
Cy3-AngII	Cy3-DRVYIHPF	Cyanine 3 en N-ter
Cy5-AngII	Cy5-DRVYIHPF	Cyanine 5 en N-ter

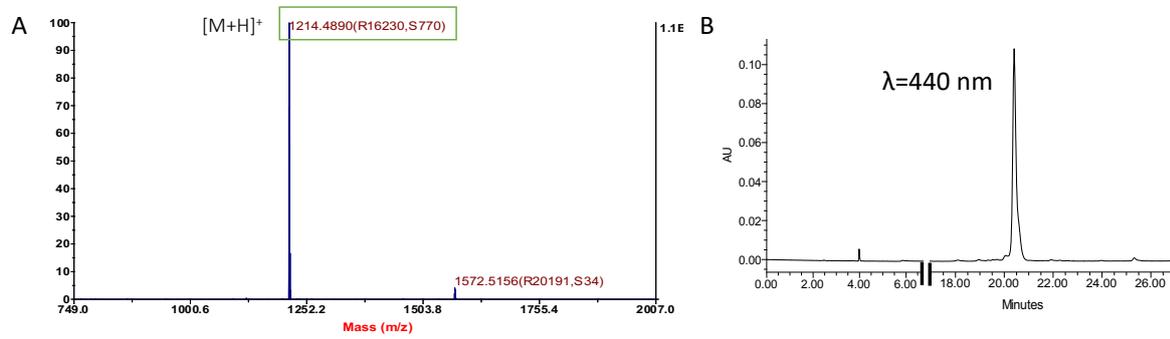
Annexe 15 : Contrôle qualité de la FLUO-AngII. (A) Spectre de masse MALDI-TOF ; (B) Profil HPLC analytique ; Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 µm 4,6 x 150 mm ; 0-60 % d'ACN en 50 min ; débit : 1 mL/min.



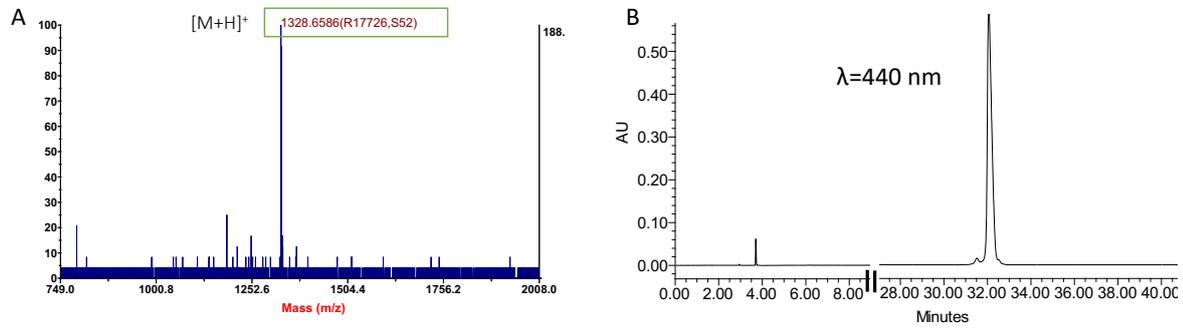
Annexe 16 : Contrôle qualité de la FLUO-Ang1-7. (A) Spectre de masse MALDI-TOF ; (B) Profil HPLC analytique, Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 µm 4,6 x 150 mm ; 0-100 % d'ACN à 2% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min.



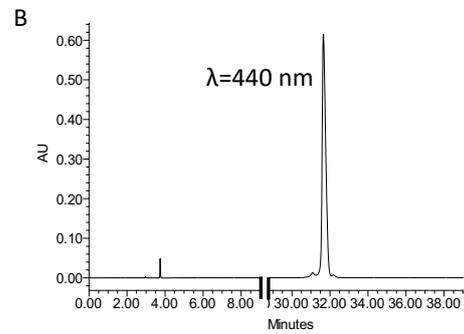
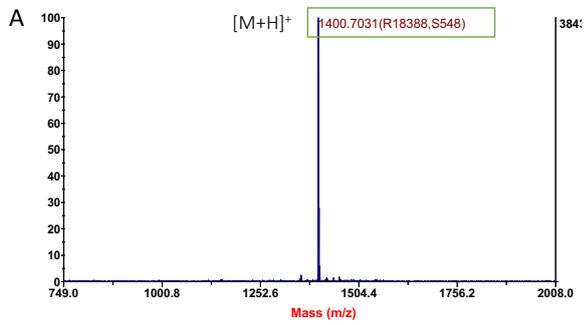
Annexe 17 : Contrôle qualité de la FLUO-Alamandine. (A) Spectre de masse MALDI-TOF ; (B) Profil HPLC analytique, Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 µm 4,6 x 150 mm ; 0-100 % d'ACN à 2% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min.



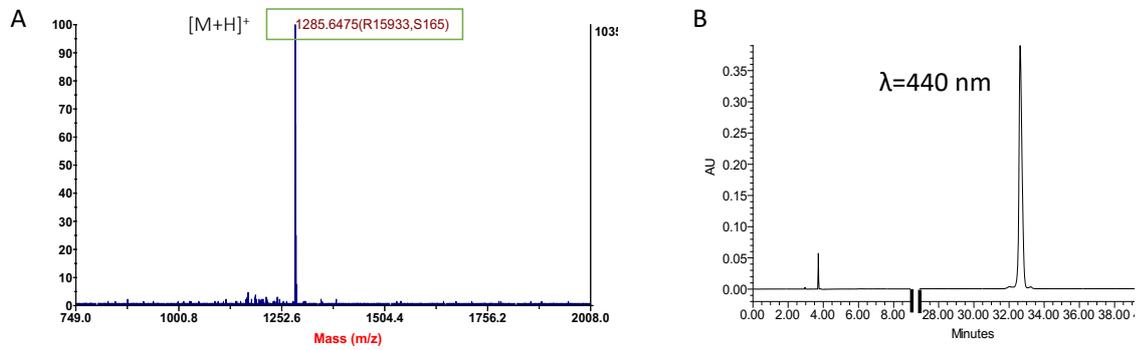
Annexe 18 : Contrôle qualité de la FLUO- β -Ala-Ang1-7. (A) Spectre de masse MALDI-TOF ; (B) Profil HPLC analytique, Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 μ m 4,6 x 150 mm ; 0-100 % d'ACN à 2% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min.



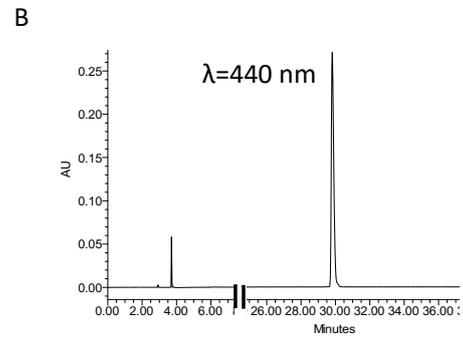
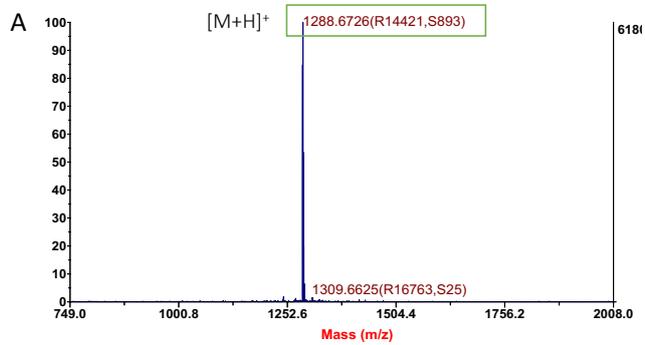
Annexe 19 : Contrôle qualité de la FLUO- β -Ala₂-Ang1-7. (A) Spectre de masse MALDI-TOF ; (B) Profil HPLC analytique, Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 μ m 4,6 x 150 mm ; 0-100 % d'ACN à 2% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min.



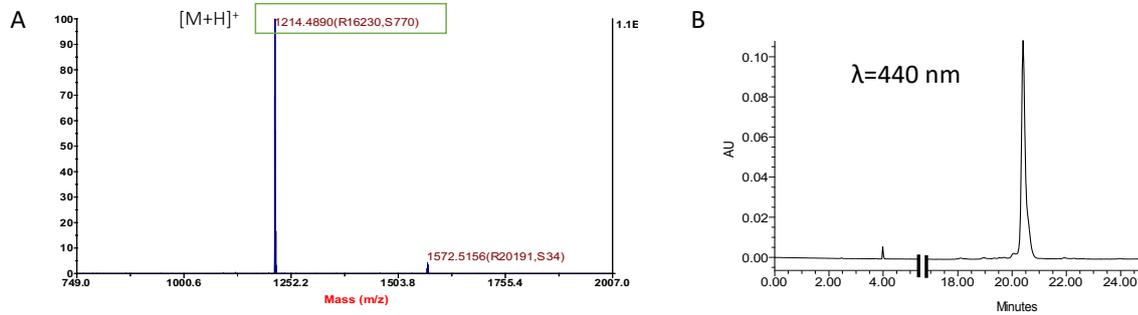
Annexe 20 : Contrôle qualité de la FLUO- β -Ala-Alamandine. (A) Spectre de masse MALDI-TOF ; (B) Profil HPLC analytique, Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 μ m 4,6 x 150 mm ; 0-100 % d'ACN à 2% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min.



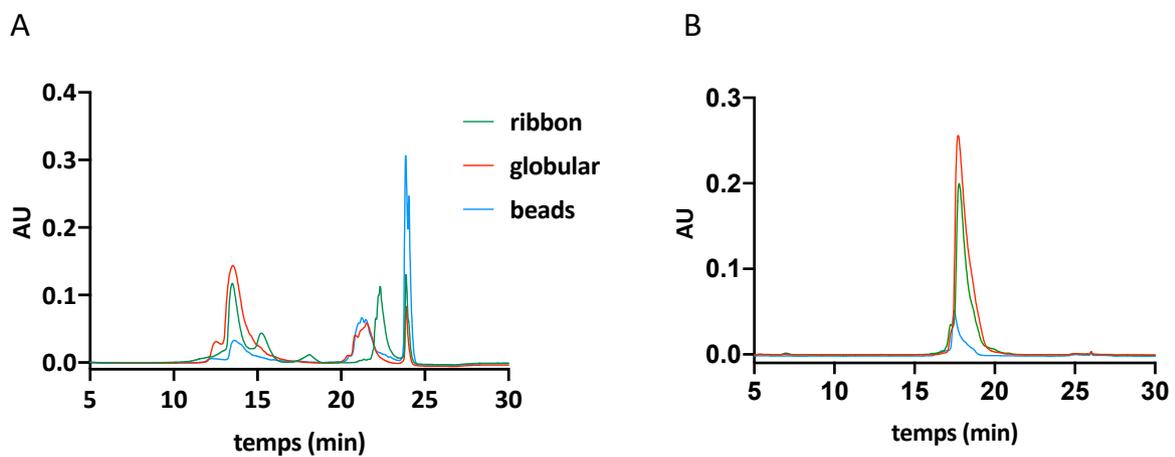
Annexe 21 : Contrôle qualité de la K7-Ang1-7-carboxyfluorescéine. (A) Spectre de masse MALDI-TOF ; (B) Profil HPLC analytique, Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 µm 4,6 x 150 mm ; 0-100 % d'ACN à 2% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min.



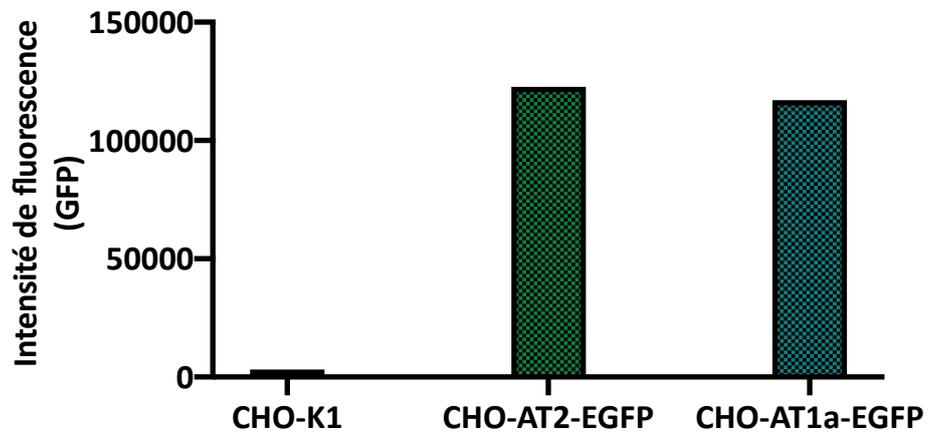
Annexe 22 : Contrôle qualité de la K7-Alamandine-carboxyfluorescéine. (A) Spectre de masse MALDI-TOF ; (B) Profil HPLC analytique, Colonne XBridge Peptide BEH C18 300Å 3,5 µm 4,6 x 150 mm ; 0-100 % d'ACN à 2% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min.



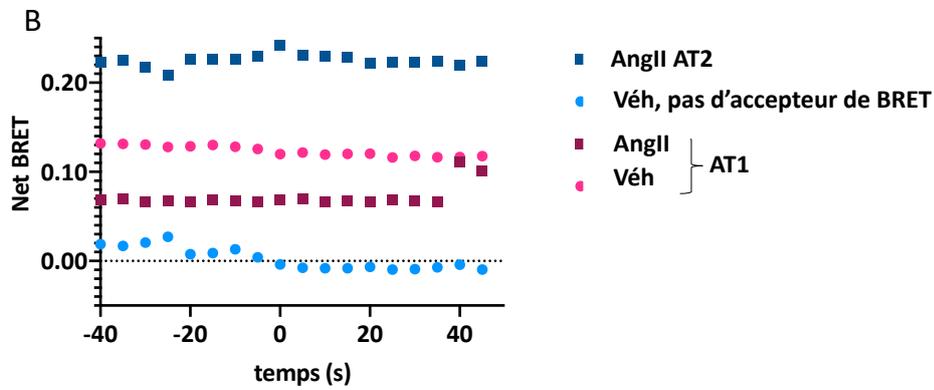
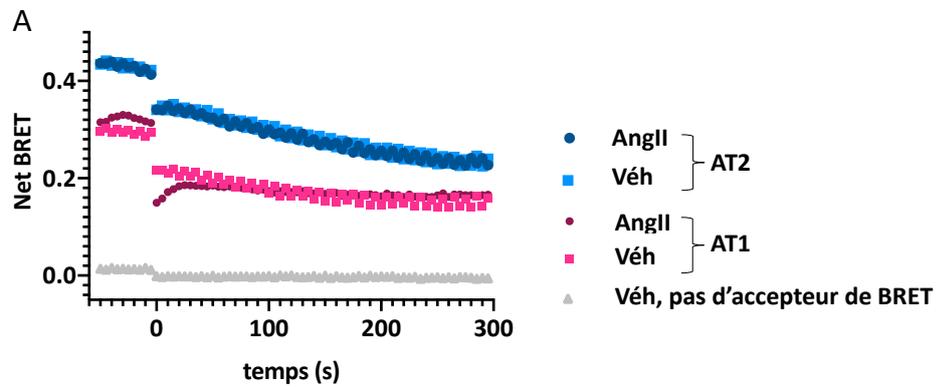
Annexe 23 : Contrôle qualité des formes Cys(Acm) de la A-CTX-MilVa linéaire. (A) Profil HPLC du brut du synthèse. Colonne Vydac C18 300Å 10 µm 10 x 250 mm ; 0-60 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 4 mL/min ; (B) Profil HPLC du produit linéaire purifié. Colonne Vydac C4 214MS5415 300Å 5 µm 4,6 x 150 mm ; 10-40 % d'ACN à 1% d'ACN/min ; débit : 1 mL/min.



Annexe 24 : Évaluation de l'expression des récepteurs AT1 et AT2 marqués à la EGFP. Mesure du signal de fluorescence émis par la EGFP pour les cellules CHO-K1, CHO-AT2-EGFP et CHO-AT1a-EGFP.



Annexe 25 : Mesure du signal de BRET résultant de l'activation (A) de la voie $G\beta\gamma$ (B) et de la voie $G\alpha_o$ après stimulation de HEK293T par l'AngII. n=2, Véh : véhicule.





Structural and Functional Diversity of Animal Toxins Interacting With GPCRs

Anne-Cécile Van Baelen¹, Philippe Robin¹, Pascal Kessler¹, Arhamatoulaye Maïga^{1,2}, Nicolas Gilles¹ and Denis Servent^{1*}

¹CEA, Département Médicaments et Technologies pour La Santé (DMTS), SIMoS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France, ²CHU Sainte Justine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

Peptide toxins from venoms have undergone a long evolutionary process allowing host defense or prey capture and making them highly selective and potent for their target. This has resulted in the emergence of a large panel of toxins from a wide diversity of species, with varied structures and multiple associated biological functions. In this way, animal toxins constitute an inexhaustible reservoir of druggable molecules due to their interesting pharmacological properties. One of the most interesting classes of therapeutic targets is the G-protein coupled receptors (GPCRs). GPCRs represent the largest family of membrane receptors in mammals with approximately 800 different members. They are involved in almost all biological functions and are the target of almost 30% of drugs currently on the market. Given the interest of GPCRs in the therapeutic field, the study of toxins that can interact with and modulate their activity with the purpose of drug development is of particular importance. The present review focuses on toxins targeting GPCRs, including peptide-interacting receptors or aminergic receptors, with a particular focus on structural aspects and, when relevant, on potential medical applications. The toxins described here exhibit a great diversity in size, from 10 to 80 amino acids long, in disulfide bridges, from none to five, and belong to a large panel of structural scaffolds. Particular toxin structures developed here include inhibitory cystine knot (ICK), three-finger fold, and Kunitz-type toxins. We summarize current knowledge on the structural and functional diversity of toxins interacting with GPCRs, concerning first the agonist-mimicking toxins that act as endogenous agonists targeting the corresponding receptor, and second the toxins that differ structurally from natural agonists and which display agonist, antagonist, or allosteric properties.

OPEN ACCESS

Edited by:

Congbao Kang,
Experimental Drug Development
Centre (EDDC), Singapore

Reviewed by:

Augie Pioszak,
University of Oklahoma Health
Sciences Center, United States
Yinglong Miao,
University of Kansas, United States
Lu Shaoyong,
Shanghai Jiao Tong University, China

*Correspondence:

Denis Servent
denis.servent@cea.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Biochemistry,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 08 November 2021

Accepted: 05 January 2022

Published: 07 February 2022

Citation:

Van Baelen A-C, Robin P, Kessler P, Maïga A, Gilles N and Servent D (2022) Structural and Functional Diversity of Animal Toxins Interacting With GPCRs. *Front. Mol. Biosci.* 9:811365. doi: 10.3389/fmolb.2022.811365

Keywords: toxins, GPCR, structure, peptides, venom

INTRODUCTION

Traditional medicine has always been inspired by nature as a source of care and even today many active components are found in the animal and plant kingdoms (Newman and Cragg, 2016). Venoms of venomous animals constitute a vast library of biochemically stable peptide toxins with particular pharmacological properties, which have evolved to provide their host with capture or defense capabilities. It is estimated that the 200,000 species of venomous animals existing on earth could produce around 40 million toxins, which are still largely unexploited (Gilles and Servent, 2014). Toxins are composed of natural and post-translationally modified amino acids, including often cysteines, giving them particular cross-linking patterns and various functional three-dimensional

structures. Due to a specific evolutionary process which happens in many animal lineages independently, toxins may acquire high affinity and selectivity for their respective targets, explaining their major impact on hemostatic, cardiovascular or central and peripheral nervous systems of prey. In addition, the biological effects and molecular targets of many toxins present in venoms are still unknown, which explains why venom screening to identify new ligand-receptor pairs has gained momentum. Currently, out of the 7,000 toxins discovered and characterized so far, a large majority are associated with the detrimental effect of the venoms via their interaction with voltage-gated or ligand-gated ion channels. Nevertheless, some of them are usefully exploited as insecticides or therapeutic agents, such as ziconotide from *Conus magus* venom, a blocker of the calcium channel $Ca_v2.2$ used as a painkiller in morphine-resistant patients (Williams et al., 2008). Interestingly, some therapeutic agents isolated from venoms also target the GPCR superfamily. That is the case of exenatide, the synthetic version of exendin-4 isolated from the saliva of the Gila monster, which is a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue which is marketed for the treatment of type 2 diabetes. Given their huge diversity and the multiplicity of unexplored targets, it is likely that many toxin/target combinations with high therapeutic importance are still to be discovered.

GPCRs form the largest family of membrane proteins in mammals with approximately 800 different members, representing more than 30% of therapeutic targets (Rajagopal et al., 2010). They are constituted by seven transmembrane α -helices linked by three external and three internal loops. Once activated by endogenous ligands, these receptors undergo conformational changes allowing the coupling to heterotrimeric G proteins. For example, in class A receptors the transmembrane helices V and VI are moved outward from the center of the receptor, creating a binding site for $G\alpha$ proteins at the cytoplasmic face of the receptor (Lu et al., 2021). These mechanisms allow the engagement of the receptor in specific intracellular signaling pathways, in order to control almost all physiological processes in humans. Lack of knowledge about the toxin-GPCR interaction highlights the importance of accumulating structural, pharmacological and molecular data on these interactions. Today, little is known about the mechanism of action of these toxins or their structure-activity relationship, and even less about the structure of toxin-GPCR complexes.

In this review, we have classified the GPCR-interacting toxins in two main categories: those that strongly resemble an endogenous ligand, with high structural and biological similarity, called agonist-mimicking peptides, and the other peptides, which are not related to endogenous ligands and display agonist, antagonist or allosteric properties on their respective target GPCRs. The molecular and structural aspects of toxins/receptor interaction leading to diverse modes of action and diverse pharmacological functions will be developed and structure-activity relationships and engineering data of some toxins will be detailed. When relevant, the potential therapeutic applications of toxins are also presented.

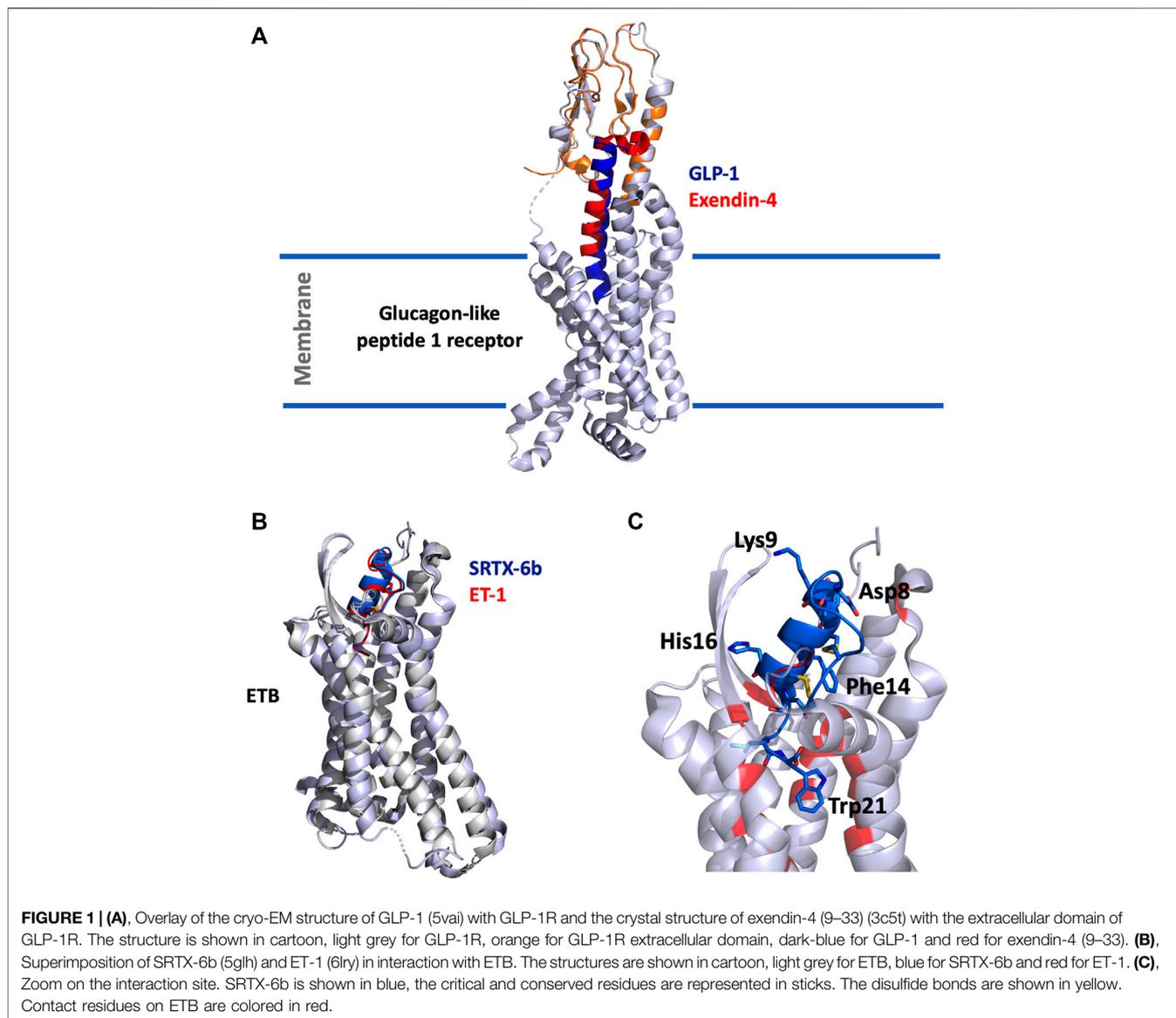
AGONIST-MIMICKING TOXINS

General Considerations

Toxins present in venoms display a huge diversity of sequences and three-dimensional structures including sometimes a high homology with natural hormones or neurotransmitters produced in non-venomous animals to control several physiological functions. Understanding the evolutionary origin of venom peptides and, in particular, the structural adaptations that underlie their unique biophysical properties is very challenging, even if studies show that 3D structure analysis can be used to identify the evolutionary connections between toxins and their ancestral non-toxic precursors (Undheim et al., 2016). Interestingly, during this recruitment process from endogenous body proteins, toxins may undergo a weaponization process associated with key structural adaptations. This is the case, for example, of spiders and centipede toxins that have evolved from hyperglycemic hormones (Undheim et al., 2015). In parallel, agonist-like peptides present in venoms may also exert a deleterious effect due to their high toxic concentration in prey. This is the case, for example, for cono-insulin, used by net-hunting cone snails to induce hypoglycemic shock in fish (Safavi-Hemami et al., 2015) or for sarafotoxins from *Atractaspis* snakes, which induce a lethal vasoconstriction in their prey by interacting with endothelin receptors. In the first part of this review, we will focus on six well characterized agonist-mimicking toxin families interacting with GPCRs and isolated from cone snails, snakes and the Gila monster. We will describe their isolation, structure-function analysis, structural characterization and *in vivo* effects, which cover a large diversity of functional effects. Due to limited information and in particular to the lack of structure-function studies, other agonist-mimicking toxins will not be considered. This is the case, for example, of conorfamide toxins, such as the conorfamide-Sr1 isolated from *Conus spurius* (Maillo et al., 2002). This RFamide peptide with an RF sequence at its C-terminal (C-ter) end elicits hyperactivity by the presumed activation of the MrgprC11 receptor, a Mas-related GPCR (Espino et al., 2018). However, many conorfamides are known to target ion channels (Campos-Lira et al., 2017), suggesting that this conotoxin family is not specific to GPCR interaction. Finally, BmK-YA, an enkephalin-like peptide, recently isolated from the scorpion *Buthus martensii* Karsch, appears to be an agonist of mammalian opioid receptors, especially the δ -subtype (Zhang et al., 2012). Unfortunately, nothing is known about the mode of action or structure-activity relationship of this toxin.

Exendin-4/GLP-1: GLP-1 Receptor

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is an incretin hormone involved in glucose homeostasis, targeting the GLP-1 receptor (GLP-1R). This receptor is expressed in most cell types and organs, but its most documented effect is an increase in glucose-dependent insulin secretion by pancreatic β -cells (Eng et al., 1990). In these β -cells, GLP-1R also promotes insulin synthesis, proliferation and protection against apoptosis. GLP-1 also has cardiovascular protective and neuroprotective effects,



and reduces appetite and food intake. This has made the GLP-1R a therapeutic target of choice for the treatment of type 2 diabetes. This GPCR is coupled to Gas, provoking a cyclic adenosine monophosphate (cAMP) increase, and β -arrestin recruitment, both of which are drivers of insulin secretion (Montrose-Rafizadeh et al., 1999; Tomas et al., 2020). Unfortunately, the short half-life of GLP-1 (around 2 min) means it is impossible to use it for an anti-diabetic treatment.

The composition and activity of venom produced in the salivary glands of the Gila monster, *Heloderma suspectum*, has been investigated. This has led to the isolation of a 39-amino-acid peptide, designated exendin-4 (Ex-4), showing 53% sequence homology with GLP-1. Exendin-4 targets GLP-1R in pancreatic β -cells (Eng et al., 1992) and shares a similar pharmacological profile with GLP-1 (Raufman et al., 1982). Its sequence was determined by mass spectrometry and sequencing of small peptide fragments obtained by digestion with trypsin

(HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS), with the C-ter amidated (Eng et al., 1990). mRNA coding of these toxins recovered from venom glands has been performed (Chen et al., 2006). However, more recently, the proteome of the Gila monster venom was studied by 2D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry-based on *de novo* peptide sequencing followed by protein identification based on sequence homology. A total of 39 different new proteins were identified and fill the gaps in the study of toxins from this venom (Sanggaard et al., 2015). ^{125}I -exendin-4 (9–39) competition radioligand binding experiments highlighted that exendin-4 and GLP-1 bind to human pancreatic GLP-1R with a similar affinity ($\text{IC}_{50} = 8.9$ and 8.7 nM, respectively) (Mann et al., 2010).

The structure of the GLP-1 in complex with GLP-1R and its associated G-protein Gas was solved recently by cryo-electron microscopy (cryo-EM) (Zhang et al., 2017) (Figure 1A). In addition, the crystal structure of the N-terminal (N-ter)

ecto-domain of GLP-1R in complex with the truncated peptide exendin-4 (9–39) was also solved at 2.2 Å resolution (Runge et al., 2008) (**Figure 1A**), as was the crystal structure of GLP-1 complexed with the extracellular domain of GLP-1R (Underwood et al., 2010). The hydrophobic binding site of GLP-1R is defined by discontinuous segments including primarily a well-defined α -helix in the N-ter of GLP-1R and a loop between two antiparallel β -strands (Runge et al., 2008). Exendin-4 forms a single helix between residues 11–27 and has a Glu residue (Glu16) at the position equivalent to Gly22 in GLP-1 (**Figure 2A**) (Neidigh et al., 2001). However, the first six residues of GLP-1 are not really structured, leading to the formation of two helices from positions 13–20 and 24–35 linked around Gly22 (Thornton and Gorenstein, 1994). The C-ter regions of exendin-4 and GLP-1 interact the same way with the N-ter extracellular domain of the GLP-1R. This allows the interaction of the N-ter part of exendin-4 with the transmembrane domain of the receptor leading to its activation (Zhang et al., 2015). Conformational changes are then facilitated, regulated by the G protein and other intracellular partners. As highlighted in **Figure 2A**, GLP-1 and exendin-4 contain a similar N-ter sequence necessary for activity on GLP-1R (Liang et al., 2018). Furthermore, binding assays have demonstrated that the N-ter positions 7, 10, 12, 13, and 15 of GLP-1 are important for affinity at GLP-1R (Suzuki et al., 1989; Adelhorst et al., 1994) and that the first histidine of GLP-1 at position 7 as a free N-ter amino acid is very important in stimulating insulin release. The same amino acids are present in exendin-4, confirming their critical role in the binding to GLP-1R (Suzuki et al., 1989), as confirmed in the 3D structure of the complex. Surprisingly, exendin-4 has a higher affinity for the N-ter extracellular domain of GLP-1R (nGLP-1R) than GLP-1 ($IC_{50} = 6$ and $1,120$ nM, respectively) (Runge et al., 2007). This difference may be explained either by non-conserved residues in the central part of the two ligands or by the specific C-ter extension of exendin-4. Interestingly, the role of this C-ter extension (PSSGAPPPS) in the binding of exendin-4 to GLP-1R was excluded (Runge et al., 2008), reinforcing the critical importance of the Leu10-Gly30 sequence of exendin-4 in its high affinity for nGLP-1R.

The switch from an agonist to antagonist mode of action is highly dependent on a few amino acid substitutions. Indeed, exendin-3 (Ex-3) is an analogue of exendin-4, isolated from the Mexican beaded lizard *Heloderma horridum*. It differs from exendin-4 by two substitutions, Ser2-Asp3 in place of Gly2-Glu3, making their bioactivities completely different: exendin-3 being an antagonist of GLP-1R (Eng et al., 1992; Chen et al., 2006). The truncated form of exendin-4 (9–39) is also a competitive antagonist of GLP-1R. It has a high affinity for GLP-1R ($IC_{50} = 0.6$ nM) and is able to inhibit GLP-1 and exendin-4 from binding to the receptor. Many analogue peptides have been synthesized in order to understand the determinants that enable exendin-4 (9–39) to have antagonist activity, whereas the truncated GLP-1 (15–36), for instance, remains an agonist (Patterson et al., 2011). Glu16, Val19, and Arg20 were shown to be the essential determinants of exendin-4 (9–39)'s antagonism (Runge et al., 2008). Moreover, the removal of the first two N-ter residues of GLP-1 yielded a partial agonist

with a 100-fold reduction in affinity (Montrose-Rafizadeh et al., 1999). Interestingly, exendin-4 has a Gly8 in place of an Ala8 and an additional C-ter extension of nine amino acids which is absent from GLP-1, preventing degradation of the peptide from dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and neutral endopeptidase, and enhancing its half-life compared with GLP-1 (Doyle et al., 2003). It should be noted that a biased agonist of GLP-1R called P5 has also been discovered, promoting G-protein signaling comparable to GLP-1 and exendin-4, but exhibited a significantly reduced β -arrestin response. It shares a common C-ter sequence with exendin-4, but only 4% homology with the N-ter sequence, which interacts with GLP-1R, explaining this biased activity (Zhang et al., 2015; Liang et al., 2018).

Thus, like GLP-1, on isolated rat islets, exendin-4 inhibits glucagon secretion (Silvestre et al., 2003), stimulates insulin synthesis (Alarcon et al., 2006), and protects against β -cell apoptosis in response to different insults (Ferdaoussi et al., 2008). In type 2 diabetes patients, exendin-4 decreases blood glucose and raises β -cell sensitivity to glucose when given twice daily subcutaneously for 1 month (Egan et al., 2003). After subcutaneous administration, exenatide (exendin-4 synthetic form) reaches a maximum plasma concentration in 2 h, and the mean half-life is almost 4 h. Due to its longer half-life (almost 120 times higher), exenatide was the first anti-diabetic drug GLP-1-based therapy to reach the market, in 2005 (Furman, 2012). Today, seven drugs derived from GLP-1 have been approved, with the idea of improving the half-life to space out the medication (Madsbad, 2016). With the idea of improving the half-life of exenatide as a therapeutic tool, some efforts have been made with pharmacomodulations: exenatide LAR (long-acting release) is formulated with exenatide in microspheres commonly used in extended drug release formulations. Once weekly subcutaneous injection is thought to be the desired frequency, and it is currently undergoing phase III clinical trials (Weill Medical College of Cornell University, 2017). On the other hand, liraglutide is a GLP-1 analog with two modifications: a substitution of Arg34 for Lys34 and an attachment of a C-16 free fatty acid derivative via a glutamoyl spacer to Lys26, known to delay the absorption rate by 13 h (Knudsen et al., 2000), allowing a once daily injection which prevents the progression of diabetic nephropathy. So far, many “glutide” drugs have been approved and marketed (Nauck et al., 2021).

Sarafotoxin/Endothelin: Endothelin Receptors ETA/ETB

Endothelins (ET1, ET2, and ET3), initially described as endogenous regulators of the cardiovascular system, mediate their effects through two class A GPCRs, named ETA and ETB. These receptors are widely expressed and are coupled to the G α_q , G α_i/o , G $\alpha_{12/13}$ G-protein pathways. Among the multiple effects of endothelins, the most documented is cardiovascular and participates in vascular tone control at the level of endothelial and vascular smooth muscle cells. In the vasculature, the vascular smooth muscle cells express both ETA and ETB receptors, while endothelial cells express only ETB. Activation of ETB in endothelial cells causes vasorelaxation

associated elevation of mean arterial pressure (Betts and Kozłowski, 2000). ET-1 is considered as the most potent endogenous vasoconstrictor (Yanagisawa et al., 1988), but also induces contraction of many other smooth muscles such as airway, uterine and prostate smooth muscles (Kozuka et al., 1989; Maggi et al., 1989; Kobayashi et al., 1994). Besides their contractile action, ET receptors have mitogenic and anti-apoptotic effects in various cell types. The ETB receptor is also involved in the development of the neural crest during embryonic development and ETB mutations are associated with megacolon formation characteristic of Hirschsprung disease (Hosoda et al., 1994; Lahav et al., 1996). The ETB receptor is also described as a clearance receptor allowing elimination of circulating ET-1 in the lung (Fukuroda et al., 1994). Several cardiovascular and renal diseases are associated with the endothelin system, in particular, pulmonary arterial hypertension for which endothelin receptor antagonists ambrisentan (Volibris®) and bosentan (Tracleer®) are used for therapeutic treatment (Enevoldsen et al., 2020). Endothelin receptors have also been shown to be overexpressed in various cancers, such as ovarian carcinoma, melanoma, prostate, lung, renal, and colon cancers (Nelson et al., 2003; Rosanò et al., 2013).

Sarafotoxins (SRTXs) form a family of toxins isolated from the venom of *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) and other Atractaspidae, venomous snakes from the Middle East. SRTXs are among the most toxic snake toxins with lethal dose of 0.15 µg/kg body weight in mice (Ducancel, 2005). They exert their toxic effect by inducing a strong general vasoconstriction leading to heart failure. The first sarafotoxins, SRTX-6a, -6b, and -6c, were discovered by fractionation of the venom by HPLC and analysis of the cardiotoxicity of each fraction in mice (Kloog et al., 1988; Takasaki et al., 1988). These three peptides were found to be highly homologous in sequence and structure between them and also with the endothelin family of peptides. Like endothelins, they are twenty-one amino acids long and contain two conserved disulfide bridges, making them bicyclic peptides. More recently, the long SRTX-m and SRTX-i3 families, containing two to ten amino acid extensions at their C-ter, were discovered (Hayashi et al., 2004).

Given their high homology with endothelin peptides, SRTXs mediate their effects through the endothelin receptors and behave as endothelin mimicking peptides. The ETA and ETB receptors differ in their properties in binding to endothelins and SRTXs. The ETA receptor is selective and binds the three endothelins with the selectivity order ET-1 > ET-2 >> ET-3. ETA binds ET-1 with an affinity in the sub-nanomolar range, and ET3 with an affinity at least 1000-fold lower. By contrast, the ETB receptor is not selective and binds the three endothelin peptides as well as SRTX-6a, 6b and 6c, with affinities in the sub-nanomolar range. SRTX-6b binds ETA with nanomolar affinity, whereas SRTX-6c exhibits only micromolar affinity for ETA, making SRTX-6c an ETB-selective ligand (Ducancel, 2005; Barton and Yanagisawa, 2019). In contrast to short SRTX, long SRTX-m and SRTX-i3 only show moderate affinity for ETB ($K_D > 300$ nM) and virtually do not bind to ETA ($K_D > 50$ µM) (Mourier et al., 2012). However, truncation of their additional C-ter tail at position 21 drastically increases their affinity and makes them as potent as

SRTX-6b on ETB. Surprisingly, long SRTX-m, SRTX-I3 and short SRTX-6b have different hemodynamic and respiratory effects (Mahjoub et al., 2015, 2017; Malaquin et al., 2016).

The sequence alignment of SRTX and endothelins (**Figure 2B**) reveals the high homology of these peptides and shows the conserved residues. Among them are the four cysteine residues organized in a unique motif Cys1-X-Cys3—Cys11-X-X-X-Cys15 and forming Cys1-Cys15 and Cys3-Cys11 disulfide bridges. The other conserved residues are Asp8, Lys9 (except for SRTX-6c), Glu10, Phe14 (except for ET-3). The C-ter part of the peptide is the most conserved with invariant residues His16, Asp18, Ile20, and Trp21. By contrast the sequence at positions 4-7 represents the variable region of the ET and SRTX peptide family. The structure of these peptides obtained by NMR shows that they contain an extended region (residues 1-4), followed by a turn (residues 5-7) and an α -helical part (residues 8-15). The extended region, connected to the helical region by the two disulfide bridges, constitutes a cysteine stabilized domain, while the C-ter part of the peptide (16-21) is conformationally variable and can adopt multiple conformations. This structural organization is conserved in both short and long SFTX (Mourier et al., 2012).

Structure-activity relationship studies have revealed the crucial determinants for endothelin and SRTX binding and activity. Early studies demonstrated that substitution or modifications of the invariant Trp21 resulted in a loss of function of ET-1 in pulmonary artery contraction assays. Comparable results were obtained by substitution of the other invariant residues Asp8, Glu10, and Phe14. The effect of ET-1 was also abolished by the reduction of the four cysteines or their replacement by alanines (Nakajima et al., 1989; Tam et al., 1994).

In the last 5 years, several crystallographic structures of the ETB receptor complexed with various ligands have been published (Shihoya et al., 2016, 2018; Izume et al., 2020). The structures of ETB complexed with ET-1 or with SRTX-6b reveal that the positions of the two peptides in the receptor are virtually identical (**Figure 1B**). For both peptides, the C-ter part dives into the hydrophobic pocket of the orthosteric site of the receptor located in its core heptahelical domain. The placement of the C-ter Trp21 residue at the bottom of the binding site is consistent with the previous observation that longer peptides, i.e. long SRTX or un-matured endothelins, do not bind to ET receptors with good affinity. The other part of the peptide, the cysteine stabilized helical domain, is sandwiched between the second extracellular loop (ECL) and the extracellular ends of the transmembrane helices VI and VII. The structures also revealed that the conserved residues of the ET/SRTX family are all involved in the interaction with the receptor. Moreover, Trp21, which has been experimentally shown to be crucial for binding and activation of the receptor, interacts with the tryptophan residue of the CWXP motif involved in the signaling function of class A GPCRs (**Figure 1C**).

Considering the importance of the pathophysiological role of the endothelin system, many ligands targeting the endothelin receptors have been developed for therapeutic purposes. Most of them are antagonists with various selectivity profiles. Despite the number of clinical studies done with peptide and non-peptide

antagonists, only bosentan and ambrisentan, small molecules with a slight selectivity towards ETA, have proved their efficacy and are on the market for the treatment of pulmonary arterial hypertension (Davenport et al., 2016). In the face of this unappealing clinical picture, the unique indication for which an endothelin agonist has emerged with a positive outcome is stroke treatment. Indeed, IRL-1620 (Sovateltide), currently in phase III clinical trials, has yielded better recovery from acute cerebral ischemic stroke (Gulati et al., 2021; Pharmazz, Inc. 2021). IRL-1620 is a linear, truncated, modifier ET/SRTX family peptide that acts as a selective and potent ETB agonist. IRL-1620 is a 14-amino-acid peptide, corresponding to amino acids 8–21 of ET-1 in which Cys11 and Cys15 have been replaced by alanine, Lys9 by glutamic acid, as in SRTX-6c, and the amino-terminal end is succinylated. This peptide, acting as an ETB agonist, enhances neurogenesis, angiogenesis and protects neural cells from apoptosis in rats (Leonard and Gulati, 2013; Briyal et al., 2019).

Conopressins/Oxytocin-Vasopressin: Oxytocin/Vasopressin Receptor

The oxytocin/vasopressin signaling system constitutes one of the most complex and important neuroendocrine systems in humans. Oxytocin (OT) and arginine-vasopressin (AVP) mediate their biological effects by acting on specific receptors. AVP mediates its actions through three known vasopressin receptors: V1aR, V1bR, and V2R. V1a receptors are expressed in the liver, vascular smooth muscle cells, brain and in many other tissues. In the vasculature, V1aR mediate the pressor actions of AVP by a phospholipase C-mediated pathway. In the brain, V1aR mediates the anxiety-producing responses to AVP (Ring, 2005). V1b receptors, present in the anterior pituitary, mediate the adrenocorticotrophic hormone-releasing effects of AVP. V1bR is also expressed in the brain, the kidney and the adrenal medulla. Recently, V1bR has been shown to mediate anxiety and stress in rats and in humans (Ishizuka et al., 2010). V2 receptors, present in the collecting duct of the kidney, mediate the antidiuretic action of AVP by an adenylate cyclase-mediated pathway. The AVP pathways of V1aR-mediated vasoconstriction and V2R-induced water retention represent a potentially attractive target of therapy for edematous diseases. Experimental and clinical evidence suggests beneficial effects of AVP receptor antagonists by increasing free water excretion and serum sodium levels. Thus, the incidence of cardiovascular diseases may be enhanced by a dysregulation of OT and AVP levels (Szczechowska-Sadowska et al., 2021). New AVP receptor antagonists have been developed in order to treat chronic heart failure, liver cirrhosis and syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (Ali et al., 2007). OT mediates its actions through OT receptors expressed in the uterus, mammary gland, ovary, brain, kidney, heart, bone, and endothelial cells (Gimpl and Fahrenholz, 2001). In the uterus, OT receptors mediate the uterine contracting effect of OT. The OTR is capable of binding to either G α i or G α q proteins and activates a set of signaling cascades, such as the MAPK, PKC, PLC, and CaMK pathways (Devost et al., 2008). The central effects of OT continue to be the focus of intense investigative

scrutiny in animals and in humans (Meyer-Lindenberg et al., 2011), as a possible therapeutic agent for the treatment of autism and other anxiety disorders.

Conopressin toxins isolated from *Conus* venoms constitute a wide family of peptides, known to target the vasopressin/oxytocin receptor family. Among them, conotoxins Ba1, Ba2, and Ba3 have been isolated from *Conus bayani* by using transcriptomics and mass sequencing (Rajaian Pushpabai et al., 2021). Above all, conopressin-T (cono-T) was isolated from the venom of *Conus tulipa* by its ability to induce a scratching effect after injection in mice. Its sequence was determined by *de novo* mass spectrometry sequencing: CYIQNCLRV. Cono-T belongs to the vasopressin-like peptide family and displays high sequence homology with the mammalian hormones oxytocin and vasopressin (Dutertre et al., 2008). Dutt et al. conducted the first venomomics approach on venom's ducts of *Conus tulipa* by integrating transcriptomics and proteomics: they identified several conotoxin precursors across two specimens of *Conus tulipa*, notably concerning conopressins. From the proteome, a mass corresponding to conopressin-T (1,107.6 Da) was identified. However, due to its anatomic distribution in the duct, conopressin-T may play a role in defense despite a suggested predatory role. That might explain the antagonist effect on vasopressin receptors (Dutt et al., 2019a). Indeed, cono-T is a selective V1aR antagonist ($K_i = 319$ nM), has a partial agonist activity at the oxytocin receptor ($K_i = 108$ nM), producing 22% of AVP and OT maximal activity, a partial activity on V1bR, producing 9% of AVP and OT maximal activity, and no detectable activity on V2 receptors. In CHO cells expressing V1aR, cono-T induces inhibition of AVP-stimulated IP production. Finally, cono-T does not stimulate phospholipase C activity in cells expressing V1aR (Dutertre et al., 2008). Conopressins of the vasopressin family are all characterized by a disulfide-containing ring between residues 1–6 and a short exocyclic C-ter tripeptide between residues 7–9. As highlighted in **Figure 2C**, residues 7 and 9 are conserved in OT and AVP (Pro7 and Gly9), whereas they are replaced by Leu7 and Val9 in conopressin-T (Giribaldi et al., 2020). Conopressins, AVP and OT share the same structural loop between the two cysteine residues, but the C-ter fragment of cono-T is not superimposed with the tail region of AVP or OT (Dutertre et al., 2008). The agonist binding site is mainly made by the three extracellular domains of the oxytocin receptor, whereas the different binding sites of various antagonist ligands are formed by transmembrane helices 1, 2, and 7 (Postina et al., 1996; Giribaldi et al., 2020). It should be noted that Arg8 is essential for pressor activity and enables a tight interaction with V2R. An aromatic residue at position 3 decreases, the potency at all other receptors, but enhances peptide selectivity for V1aR and V1bR. Finally, the presence at position 4 of a basic residue instead of a glutamine diminishes the potency at all tested receptors, especially at V2R (Giribaldi et al., 2020).

Many other peptides belonging to the family of conopressins have been isolated from other species and have distinct pharmacological profiles with human receptors. Among them, conopressin-G (cono-G) from *Conus geographus* venom and conopressin-S (cono-S) from *Conus striatus* venom were the first conopressins identified (Cruz et al., 1987). They both

cause severe itching and scratching in mice within a few minutes after injection. Although the sequences of these conopressins are close to that of vasopressin itself, they have an additional positive charge in position 4. Cono-S has a similar affinity for OTR, but is less potent at V1aR and does not bind to V2R. Cono-S binds with high affinity to V1bR ($K_i = 8.3$ nM) (Dutertre et al., 2008). Lys-conopressin-G, an analogue of cono-G (Nielsen et al., 1994), and Arg-conopressin-S, an analogue of cono-S, are characterized by an amidated C-ter tail and two basic amino acids: one Arg in position 4 and a Arg or Lys in position 8, outside of the cyclic structure (Cruz et al., 1987).

Recently, Giribaldi et al., discovered and characterized two new conopressins from the venom gland transcriptome of *Conus miliaris*, called conopressin-M1 (cono-M1) and conopressin-M2 (cono-M2). It was highlighted that the amidated form of cono-M1 has a partial agonist activity at V1bR and at V1aR for both the amidated and acid forms. Conopressin-M2 is a full agonist at the V2R, albeit with low micromolar affinity. Thus, the low activity of cono-M1 and cono-M2 can be explained by the substitution of Gln4 by a glycine residue, the absence of a basic residue in position 8 and the missing glycine residue in position 9 (Giribaldi et al., 2020). L7P-cono-T is a more potent analogue of cono-T on V1aR, but has a similar affinity for OTR. Like cono-T, it induces inhibition of IP production in CHO without stimulating phospholipase C activity in cells expressing V1aR. L7P-cono-T differs from AVT only at position 9 and acts as a V1aR antagonist. This modification alone can switch peptide activity from agonist to antagonist (Dutertre et al., 2008). The biological effects in animals are not yet well known. As AVP, it is likely that conopressins have a role in renal homeostasis, for instance.

Contulakin-G/Neurotensin: Neurotensin Receptors

Neurotensin (NT), a hypotensive peptide, first isolated from bovine hypothalamus, acts as a neurotransmitter and neurotransmodulator in the central nervous system (CNS), and also as a local hormone in the small intestine (Carraway and Leeman, 1973). This tridecapeptide is an agonist of neurotensin receptors (NTSRs) with a sub-nanomolar affinity (Checler et al., 1986). Three of them, NTSR1 and NTSR2, which are both GPCRs, and NTSR3, a single transmembrane domain sorting receptor, have been identified as targets (Vincent et al., 1999). Neurotensin is involved in many central biological processes, but also in many peripheral effects like gastrointestinal motility and vasodilatation (Carraway and Leeman, 1973). In the CNS, NT exerts various effects, including analgesia (Clineschmidt and McGuffin, 1977) and central control of blood pressure (Rioux et al., 1981), is involved in the pathophysiology of schizophrenia and Parkinson's disease, with levels of endogenous NT and NTSR1 expression decreased in patients with the symptoms of schizophrenia (Nemeroff, 1980) (Clineschmidt and McGuffin 1977; Yamada et al., 1995; St-Gelais et al., 2006). In the gastrointestinal tract, NT has effects on pancreatic endocrine secretion and colonic motility, and decreases gastric acid secretion (Osumi et al., 1978). NT has a high affinity for NTSR1 and activates PLC through the Gαq/11-coupled pathway, producing inositol triphosphate (IP3) and DAG diacylglycerol (DAG). This

pathway induces activation of PKC and mobilization of intracellular calcium, key oncogenic effectors (Chabry et al., 1994). NTSR2, like NTSR1, is present in both the CNS and peripheral organs. It is coupled to the Gαq/11-dependent PLC signal pathway, Gαi/o and Gα12/13 (Sarret et al., 1998; Vincent et al., 1999). Finally, NTSR3 forms a heterodimer with NTSR1 on the surface of HT29 cells, activating the IP3/PKC signaling pathway (Martin et al., 2002). NT is particularly involved in the occurrence of gastrointestinal cancers with increased levels of NT and NTSR1 (Clineschmidt and McGuffin, 1977; Nemeroff, 1980; Yamada et al., 1995; St-Gelais et al., 2006). NT and NTSR1 are then promising candidates for clinical screening for gastrointestinal cancers because of their overexpression in these cancers, and are promising targets because the inhibition of NTSR1 expression or the knockdown of the *NTS1* gene decreases oncotic MMP-9 expression and activity (Dong et al., 2017; Sánchez and Coveñas, 2021). Finally, NT has central opioid-independent anti-nociceptive effects, leading to improved therapeutic management of pain (Chartier et al., 2021).

By testing fractions from the venom of *Conus geographus* on the loss of motor control in mice, a peptide named contulakin-G has been isolated by HPLC. It is a linear 16-amino-acid peptide whose sequence was determined by Edman sequencing and O-glycosidase and β-galactosidase hydrolysis: pESEEGGSNATKKPYIL, with the O-glycosylation [β-D-Galp-(1→3)-α-D-GalpNAc-(1→) on Thr10.

By measuring phosphoinositide accumulation in CHO cells expressing NTSR1, NTSR2, and NTSR3, Craig et al. determined the agonist potency of synthetic contulakin-G. This toxin is an agonist for all three subtypes of neurotensin receptors with sub-micromolar potency ($IC_{50} = 0.96, 0.73$ and 0.25 μM, respectively) (Craig et al., 1999). Contulakin-G is less potent than NT, but shares a common C-ter sequence (KKPYIL) which is highly conserved and responsible for their interaction with the receptor and their biological activities (Figure 2D). The substitution of Glu7 of NT by a positive or non-charged amino acid decreases the desensitization potency and the substitution of Lys9 decreases the agonist potency, thus explaining the lower potency of contulakin-G. Finally, electrostatic interactions seem very important: replacing the two conserved Arg residues diminishes the agonist potency (Lee et al., 2015). SAR studies for contulakin-G highlight the importance of the glycoamino acid in determining interactions with neurotensin receptors. It has been demonstrated that removing this glycosylated residue resulted in an increase of the affinity for all the receptor subtypes, with an IC_{50} of contulakin-G for NTSR1 40 times higher than the IC_{50} of deglycosylated contulakin-G (Craig et al., 1999). Interestingly, contulakin-G exhibits higher potency *in vivo*: after intracerebroventricular (icv) injection in mice of both forms, contulakin-G induces loss of motor control at lower doses than the deglycosylated form (Craig et al., 1999). This is probably due to the slowdown of proteolytic degradation thanks to the O-glycan. To support the role of glycosylation of contulakin-G, some molecular docking simulations have been performed on both the contulakin-G forms in interaction with NTSR1. The glycosylation of Thr10 modifies the conformation of contulakin-G in comparison with the deglycosylated form. Indeed, the salt bridges between the terminal carboxyl of the peptide and Arg94 and Arg241 of NTSR1 facilitate interactions. The Tyr145 residue, which is near these two Arg, favors the stabilization of these residues by cation-π interactions. Thus, this anchoring point formed by the salt bridge between the

C-ter of the peptide and the receptor leads to the repositioning of the Lys12 so that it can form a hydrogen bond with Glu332. When the peptide is glycosylated, this major interaction between Lys12-Glu332 is lost (Lee et al., 2015). Thus, the desensitization of neurotensin receptors is enhanced by the presence of both glycosylation of contulakin-G and charged amino acid residues.

In *in vivo* experiments, beagles were injected for many days with infusions or bolus doses of contulakin-G, leading to biexponential disposition function. The kinetics show a rapid initial redistribution phase followed by a slow terminal elimination phase. It appears that contulakin-G might be metabolized within the CNS or rapidly metabolized in the systemic circulation or bound by tissues (Kern et al., 2007). In the rat, contulakin-G provokes, like neurotensin, central effects as loss of motor control, absence of preening/grooming, reduced sensitivity to tail depression and peripheral effects as gut contraction (Craig et al., 1999). With regard to these interesting biological effects of the toxin, Cognetix developed a synthetic form of contulakin-G, CGX-1160, which in 2005 obtained orphan drug status for the treatment of chronic intractable pain following intrathecal administration in patients with spinal cord injury by the US Food and Drug Administration (FDA). After a break in development, a phase Ia trial was started to determine the safety of escalating doses in patients with central neuropathic pain (Sang et al., 2016).

Conorphin-T/Dynorphin A: κ -opioid Receptor

The Kappa opioid receptor (KOR) is a GPCR known to modulate the effects of several neurotransmitters such as dopamine and serotonin, and glutamate release in the central nervous system. KOR and its endogenous ligand dynorphin-A (dynA (1–17), with a K_i of 0.28 nM) (Goldstein et al., 1981), have a widespread distribution, especially in the CNS, but also in the peripheral system. Dynorphin-A is a neurotransmitter peptide processed from its precursor prodynorphin (Chavkin et al., 1982). It interacts with KOR which is coupled to Gai/o, leading to inhibition of adenylyl cyclase and a decrease in the production of cAMP, thus modulating the conductance of Ca^{2+} and K^+ channels. Furthermore, this activation implies kinase cascades including GRK and members of the MAPK family (ERK1/2, p38 and JNK) (Bruchas and Chavkin, 2010). Dysregulation of the dynorphin/KOR system is involved in several psychiatric diseases, including schizophrenia, depression, bipolar disorder, drug addiction, and especially analgesia, thus being an interesting new therapeutic target to investigate as a potential analgesic (Zhang et al., 2007; Koob and Volkow, 2010; Clark, 2020; Sapio et al., 2020). Initially, agonists were thought to treat analgesia: bremazocine was synthesized in an effort to produce opiates with greater KOR selectivity and with minimal morphine-like side effects (Römer et al., 1980), and asimadoline succeeded in phase II for acute attacks of pain in irritable bowel syndrome (Williams and Mangel, 2010; Camilleri, 2011). Finally, KOR antagonists have already reached the market, such as buprenorphin and naloxone to treat mood disorders and morphine addiction.

Extraction of total RNA from the ducts of *Conus textile* and cDNA cloning and sequencing have led to the identification of the cDNA

sequence of conorphin-T (NCCRRQICC), a nonapeptide present in *Conus textile* (Luo et al., 2006). The screening of a conopeptide library on KOR highlighted that conorphin-T is a new selective agonist of the KOR that mimics dynorphin-A (Brust et al., 2016). Conorphin-T is a member of the T-superfamily of conotoxins which includes 1,000 distinct active peptides found in the venom of various *Conus* species (Aguilar et al., 2006).

Conorphin-T contains two Arg residues side by side, a spacer amino acid followed by a hydrophobic residue and two Cys on the C-ter tail. Docking studies have shown that even if conorphin-T and dynA have low sequence similarity, the toxin interacts similarly with KOR and the truncated dynorphin-A (1–8) (Brust et al., 2016). Indeed, it was demonstrated that the last nine amino acids at the C-ter of dynA have little impact on KOR activity. However, the N-ter YGGF sequence of dynA is common to endogenous opioid ligands, such as endorphins and enkephalins, and is known to play a major role in opiate receptor affinity. It then appears that the essential pharmacophore of dynA lies within the N-ter fragment YGGFLRR. The presence of two arginines side by side is often a marker of KOR selectivity (Brust et al., 2016).

Interestingly, the three isomers (beads, globular and ribbon) of conorphin-T were synthesized and radioligand binding assays highlighted that the bead form was the most active one on KOR ($K_i = 80$ nM), compared to the ribbon form ($K_i = 580$ nM) and the globular one ($K_i = 1,5$ μ M). Many analogues derived from conorphin-T were also synthesized in order to increase affinity and stability. So, the substitution of Asn1 by Tyr1 (such as dynA) increased affinity for KOR twofold, meaning that an aromatic residue at the N-ter position is important for the affinity. The alanine scan of the peptide also highlighted that the residues 4–7 (RRQI) are important for the affinity on KOR. Furthermore, the presence of an aromatic amino acid at position 6 improved affinity. Thus, the authors identified an active sequence in the C-ter tail: RRQICC, with the two vicinal Cys in C-ter deeply critical for high KOR affinity (Figure 2E). Finally, the glutamine residue is a spacer necessary to the presentation of the peptide to the receptor (Brust et al., 2016).

Like dynA, conorphin-T may have antinociceptive properties. Furthermore, conorphin-1, an analogue peptide of conorphin-T, was recently developed and shown to activate KOR with sub-nanomolar potency and high selectivity above other opioid receptors. In rodent models of nociceptive pain (formalin-induced pain), the analgesic and antiallodynic effects of conorphin-1 were evaluated. However, if the peptide was delivered peripherally by intraplantar injection, no analgesic effect was observed, maybe due to the impossibility of targeting KOR in peripheral sensory nerve endings innervating the skin (Deuis et al., 2015).

MIT1/Prokineticin/EG-VEGF: Prokineticin Receptors PKR1/PKR2

Prokineticin 1, is an angiogenic factor also known as endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) (LeCouter et al., 2001; Li et al., 2001). Prokineticin 2 is a related peptide of prokineticin 1 (87% homology), known to be a mammalian homologue of the frog skin peptide Bv8

(Wechselberger et al., 1999). Both peptides bind to prokineticin 1 and 2 receptors (PKR1 and PKR2), members of the neuropeptide Y receptor family, with nanomolar affinity (Lin et al., 2002; Masuda et al., 2002; Negri et al., 2007). PKR1 is highly expressed in spleen and gastrointestinal tissues, where its activation enhances smooth muscle contraction (Li et al., 2001), whereas PKR2 is widely expressed in the CNS (Masuda et al., 2002). The PKRs are G α q-coupled receptors and promote intracellular Ca²⁺ mobilization. They also may couple to G α i and G α s and some other G-proteins, like G α 12 or G13 (Lin et al., 2002; Soga et al., 2002). This activation is known to increase intracellular Ca²⁺ concentration with nanomolar potency in CHO cells (Masuda et al., 2002). Finally, prokineticins and their receptors are widely distributed, which may suggest their role, among others, in angiogenesis in endocrine glands, heart failure, colorectal cancer, etc. (Masuda et al., 2002). So far, antagonists, especially of PKR1, have been developed (Levit et al., 2011).

In 1990, Schweitz et al. identified almost thirty peptides from the venom of *Dendroaspis polylepsis*, half of them having a contractile effect on intestinal smooth muscle (Schweitz et al., 1990). In this venom a mamba intestinal toxin-1 (MIT1) was isolated, whose sequence of 81 amino acids and 10 cysteines at identical positions of Bv8 was determined by Edman degradation (AVITGACERDLQCGKGTCCA VSLWIKSVRVCTPVGTS GEDCHPASHKIPFSGQRMHHTCPCAPNLACVQTSPKKFK CLSKS) (Schweitz et al., 1999). MIT1 is a homologue of the human endogenous ligand EG-VEGF and prokineticin 1, sharing 80% sequence identity with them and 58% sequence identity with prokineticin 2 (Li et al., 2001). This toxin is more active and affine for its receptor than EG-VEGF/prokineticin 1 and prokineticin 2, with a K_i of 4.1 nM for PKR1 and 0.67 nM for PKR2 (Masuda et al., 2002). The N-ter sequence AVITGA is characteristic of the “AVIT” family of toxins. They are composed of 80–90 amino acids, analogues of MIT1, and are presumed to have a potent effect on intestinal contractility and to increase hyperalgesia (Wen et al., 2005).

The solution structure of MIT1 has been investigated using 2D homonuclear NMR. MIT1 contains ten cysteines, involved or not in disulfide bridges and leading to various disulfide bridging configurations. This may confer a particular importance on this topological information in order to determine accurately the 3D structure. MIT1 is an analogue of colipase, a co-enzyme required for optimal activity of pancreatic lipase, which shares the same cysteine configuration. Several charged residues are buried inside the molecule, whereas some hydrophobic residues, such as Trp24, are exposed on the surface (Boisbouvier et al., 1998). There is little information regarding the SAR of MIT1, but some prokineticin residues conserved in MIT1 have been highlighted in **Figure 2F** as critical for activity. The N-ter part of AVITGA is highly conserved among prokineticins and analogue proteins and is critical for activity. The deletion of this part leads to inactivation of the peptide. The C-ter rich in cysteine is also essential for bioactivity of prokineticins. The substitution of Cys18 provokes a decrease in activity. Interestingly, the substitution of Ala1 by Met or an addition of Met in the N-ter tail leads to a switch towards an antagonist mode of action (Bullock et al., 2004).

The first identified biological action of MIT1 was the contraction of the isolated guinea pig ileum and distal colon

and relaxation of the proximal colon (Schweitz et al., 1999). Interestingly, Bv8, a 77-amino-acid peptide, was isolated from skin secretions of *Bombina variegata* and *Bombina bombina*. This peptide was also found to stimulate the contraction of gastrointestinal smooth muscle with high potency (Mollay et al., 1999; Negri et al., 2007).

TOXINS TARGETING GPCRS

Toxins With 2 Disulfide Bonds

Toxins with two disulfide bridges are much less present in venoms as compared to toxins with three or four disulfide bridges (Reynaud et al., 2020), and most of them are found in conus venoms. Exceptionally, they were identified in arthropods (Smith et al., 2011; Daly and Wilson, 2018) as disulfide directed β -hairpin (DDH: C-C-C-C framework with the I-III, II-IV connectivity), a fold which seems to be evolutionarily linked to three-disulfide-bridge ICK toxins (Undheim et al., 2016). Interestingly, the same cysteine pattern was also found in apamin, a bee-venom toxin that selectively blocks the small conductance of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in CNS (Lazdunski, 1983). There is a large diversity of two-disulfide-bridge toxins in cone snails venoms and they cover five different cysteine frameworks (I, V, X, XIV, and XXIV (Kaas et al., 2012)). The pattern CC-C-C is the most common one, including the α -conotoxins active on nicotinic acetylcholine receptors, the ρ -conotoxins active on adrenoceptors and the χ -conotoxins active on norepinephrine transporter. The CC-CC pattern contains many members belonging to the T-superfamily, including the τ -conotoxins interacting with somatostatin receptors (Petrel et al., 2013). Moreover, the C-CC-C pattern was also recently found in *Conus vexillum* venom, delineating a new α B-conotoxin superfamily (Luo et al., 2013). Finally, the pattern C-C-CC (L-superfamily) and the pattern C-C-C-C (Q superfamily) are patterns of conotoxins for which no clear biological activities have yet been described. Three cysteine frameworks called globular (cysteine I-III; II-IV pattern), ribbon (cysteine I-IV; II-III pattern) and beads (cysteine I-II; III-IV pattern) are compatible with the structure of toxins with 4 cysteines. The globular organization is the most common one including for example the α -, ρ -, and τ -conotoxins. Much fewer conotoxins are organized with the ribbon structure like the χ -conotoxins and no conotoxin with bead organization has yet been described.

ρ -TIA: Adrenoceptors

Adrenoceptors constitute a family of receptors sensitive to epinephrine and norepinephrine and are divided into three families (α _{1A}Rs, α _{2A}Rs, and β ARs), each of them comprising three members (Hein, 2006). The three α ₁-adrenoceptors (α _{1A}AR, α _{1B}AR, and α _{1D}AR) are widely expressed in the body and are involved in the control of smooth muscle tone, like vessels, bladder or prostate muscles. They display their actions mostly by the G α q-pathway. The α ₁ARs antagonists were developed to treat bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia. The last generation of drugs (like tamsulosin), which are more selective for the α _{1A}AR subtype, induces less hypotension due to the blockage of the α _{1B}AR (Tammela, 1997). The α ₂ARs (α _{2A}AR, α _{2B}AR, and α _{2C}AR)

are presynaptic receptors linked to the Gai/o pathway. They display various functions like the control of vessel tone, regulation of the sympathetic nervous system or pain transmission. Due to their wide expression, they are practically not used as therapeutic targets (Flordellis et al., 2004). The β ARs (β 1AR, β 2AR, and β 3AR) have crucial functions. β 1AR is predominantly found in the heart, kidney, and fat cells, and β 1AR antagonists are largely used against hypertension (Alhayek and Preuss, 2021). β 2AR is mainly expressed in pulmonary cells where its activation by agonists fights against asthma and chronic obstructive pulmonary diseases (Abosamak and Shahin, 2021). β 3AR is involved in metabolic effects in adipocytes and in other functions that still need to be better characterized (Dessy and Balligand, 2010).

Two toxin families were discovered acting on adrenoceptors, one conus toxin with two disulfide bonds (the ρ -TIA) and several three-finger-fold toxins, what we call aminergic toxins, as developed in Section 5. ρ -TIA was discovered by a bioguided strategy in the venom of the *Conus tulipa* snail by following the biphasic contractile response of the electrically stimulated rat prostatic vas deferens (Sharpe et al., 2001). ρ -TIA binds to α 1 adrenoceptor subtypes. ρ -TIA binds α 1_AAR, α 1_BAR and α 1_DAR with an IC₅₀ of 150 μ M, 70 and 315 μ M, respectively (Sharpe et al., 2001). On its principal target, α 1_BAR (Figure 3B), ρ -TIA is considered as a non-competitive competitor, as saturation binding studies revealed that 1 μ M of the toxin reduced maximum ¹²⁵I-HEAT binding by 85% without affecting the affinity of the receptor for the radioligand. Association and dissociation kinetic analysis of the radioligand ³H-prazosin in the presence and absence of ρ -TIA suggests also that the toxin acts as a non-competitive ligand. The antagonist property of ρ -TIA was tested in HEK293 cells stably expressing α 1ARs with norepinephrine as agonist. On α 1_AAR and α 1_DAR, ρ -TIA shifted to the right the norepinephrine activation curves without affecting its efficacy, which is compatible with a pure competitive effect. On α 1_BAR, ρ -TIA decreases norepinephrine efficacy and acts as an insurmountable antagonist.

ρ -TIA, composed of 19 residues (FNWRCCLIPACRRNHKKFC*) reticulated by two disulfide bridges in a ribbon organization, consists of a stretch of 3.10 helix between Arg4 to Leu8, a helical turn from Pro9 to Arg12, followed by four nested β -turns between Arg12 and Cys19, which almost comprise another turn of helix. These comprise a type I β -turn between residues 12–15, and three type IV β -turns between residues 13–16, 14–17, and 15–18 (Sharpe et al., 2001) (Figure 3A).

An alanine scanning exploration revealed that the N-ter part (Asn2 to Ile8) and Arg12 are involved in the binding with α 1_BAR (Chen et al., 2004). On the receptor side, fourteen receptor residues of the extracellular loops influence ρ -TIA affinity (Ragnarsson et al., 2013). Double mutant cycle analysis and docking analysis point to a close proximity between Arg4 of ρ -TIA and Asp327 and Phe330; Trp3 of ρ -TIA and Phe330 and Ser318; Asn2 of ρ -TIA and Val197 and finally the positive charge of the N-ter part of the toxin and Glu186 of α 1_BAR (Figure 3B). The ρ -TIA binding site described the first allosteric site for α 1_BAR (Ragnarsson et al., 2013). It is not so trivial to understand the

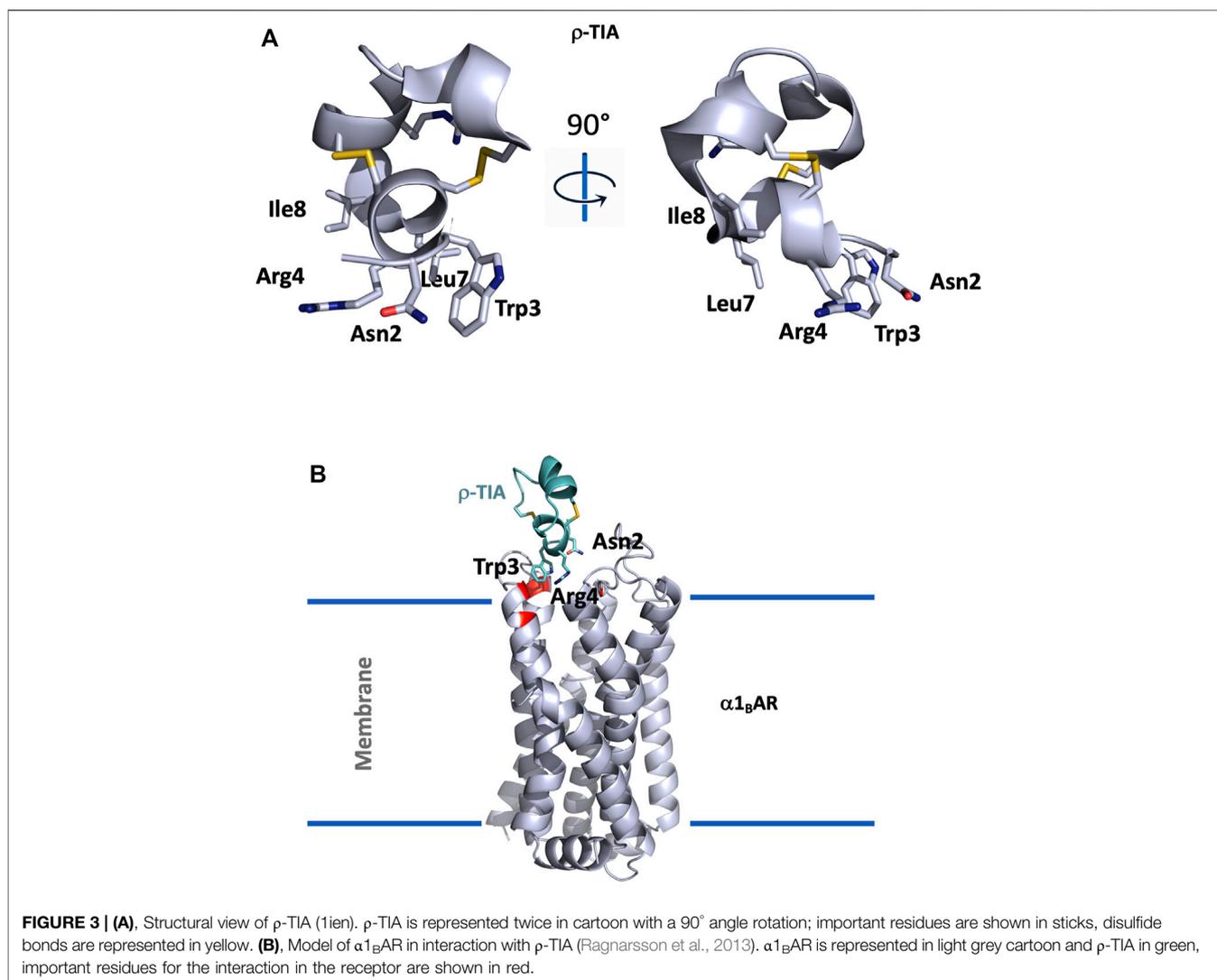
exact biological role of toxins, especially when they are described as non-toxic, like most of the toxins targeting GPCRs. *Conus tulipa* has developed a net hunting strategy to catch fish. Targeted fish are immobilized by secretion of so-called “nirvana cabal” peptides to hamper their escape. The tulipa snail can then open its mouth to directly capture fish. Lewis’s team demonstrated that ρ -TIA produced a striking loss of zebrafish larvae escape response to light mechanical touch on their trunk or tail, in a dose-dependent manner, with an EC₅₀ around 200 nM (Dutt et al., 2019b). This study highlights the importance of using ecologically relevant animal behavior models to decipher the biological role of animal toxins. In rat, ρ -TIA antagonizes the contractions induced by noradrenaline in the aorta and vas deferens through α 1_AAR and α 1_DAR (Lima et al., 2005). ρ -TIA is then the first α -type toxin active on a GPCR, providing a new function for this peptide family. In addition, this toxin describes a novel allosteric site on α 1_BAR.

τ -CnVa: Somatostatin Receptor SST3

The discovery of τ -CnVa resulted from the venom gland transcriptome analysis of the cone snail *Conus consors*. The peptide of fourteen amino acids containing two pairs of adjacent cysteine residues (ECCHRQLLCCLRFV) belongs to the T-family of conotoxins. τ -CnVa was chemically synthesized and a directed bridging strategy was used to form disulfide bridges in a cysteine I-III, II-IV connectivity pattern, and the C-ter of the peptide was amidated, according to the conserved features of τ -conotoxins. τ -CnVa activity was searched for over a large panel of molecular targets, including GPCRs, voltage-gated ion channels, nicotinic receptors and neurotransmitter transporters, and only the SST3 receptor emerged from this screen. This receptor is a member of the GPCR family of somatostatin receptors comprising five members, whose function is to inhibit the release of hormones such as growth hormone, TSH, pancreatic and gastrointestinal hormones. By means of binding experiments with iodinated somatostatin, τ -CnVa was shown to bind the SST3 receptor with an affinity of 1.5 μ M and had an at least fifty-fold lower affinity for the four other somatostatin receptors (SST1, SST2, SST4, and SST5). In functional assays (Ca²⁺ mobilization assay), τ -CnVa was unable to activate the SST3 receptor, but dose-dependently inhibited the somatostatin response with an IC₅₀ of 16.8 μ M. The mode of interaction with the SST3 receptor and the *in vivo* effect of the toxin have not yet been documented (Petrel et al., 2013).

TOXINS WITH 3 DISULFIDE BONDS

Three-disulfide-bond toxins are widely expressed in almost all venomous animals. Nine cysteine patterns of three-disulfide-bond toxins have already been described only in conus snail venoms such as the CC-C-C-CC framework of the μ -conotoxins acting on Na_v channels or the CC-C-C-C-C pattern of α A-conotoxins interacting with nAChRs (Kaas et al., 2012). Two frameworks are particularly well known and are represented by hundreds of toxins. The inhibitor cystine knot (ICK) is



characterized by the -C-C-CC-C-C- pattern associated with cysteine I-IV; II-V; III-VI connectivity. ICK toxins (23–35 amino acids) are found in many venomous animals, such as spiders, scorpions, cone snails, and sea anemones, and are mainly associated with inhibition of voltage-gated ionic channels (Na_V , Ca_V , K_V , KCa , TRP, and ASIC). The CSaB-related toxins are characterized by the -C-C-C-C-C-C- pattern associated with the classic ICK cysteine I-IV; II-V; III-VI pattern. This toxin class is largely found in scorpions and is called short-scorpion toxin active on voltage-gated potassium channels. Another multifunctional fold including three-disulfide bonds is the Kunitz fold, characterized by peptides 55–65 amino acids long and a -C-C-C-C-C-C- framework with I-VI; II-IV; III-V cysteine connectivity. This structure is known to support mainly anti-protease activity, such as in the BPTI, and potassium channel inhibition (Peigneur et al., 2011). Nevertheless, Kunitz toxins interacting with ASIC, TRPV1 or Ca_V channels have already been described, as well as with vasopressin V2R, as will be described below. Until recently, GPCR toxins came from reptiles (mostly

snakes) and cone snails. In this chapter, we describe three toxins, one from snakes targeting the vasopressin receptor V2R and two from arachnids targeting melanocortin receptors.

Mambaquaretin: Vasopressin Receptor V2

The vasopressin receptor 2 (V2R) is essentially expressed in the distal part of the nephron and in the collecting tubule of the kidneys. It regulates water homeostasis under the control of arginine-vasopressin (AVP). Once activated in the collecting duct, the V2R/Gas pathway stimulates intracellular cAMP production, which activates protein kinase A to phosphorylate aquaporin 2, allowing its translocation from intracellular vesicles to the apical membrane via an intracellular calcium-dependent exocytosis mechanism. Further, water can go through aquaporin 2 at the apical membrane from the urine to the main cell before reaching the blood thanks to aquaporins 3 and 4 at the basolateral membrane (Szczepanska-Sadowska et al., 2021). Both loss- and gain-of-function variants of V2R are associated with

human diseases and over 260 mutations have been reported to date (HGMD, 2021.) and recently reviewed (Makita et al., 2020). Despite the primordial function of the V2R and its numerous associated diseases, only two drugs are on the market, DdAVP, a specific V2R agonist, and tolvaptan, a specific V2R antagonist. DdAVP is mainly used to treat insipidus diabetes and tolvaptan to treat hyponatremia and autosomal dominant polycystic disease (Garona et al., 2020).

Mambaquaretin-1 (MQ1) was discovered by a bioguided strategy in the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* by competition of the ³H-AVP on membrane preparations of COS cells stably expressing hV2R (Ciolek et al., 2017). MQ1 displays low nanomolar affinity for V2R with an absolute selectivity. Indeed, at 1 μM no activity could be found on 156 GPCRs, including the three other AVP-sensitive receptors V1aR, V1bR, and OTR (Ciolek et al., 2017). Because MQ1 adopts a Kunitz-type peptide structure known to inhibit serine proteases and K_V channels, it was tested on 45 serine proteases and 9 K_V channels with no activity. Finally, this safety profile was completed by testing fifteen ionic channels (including the eight involved in cardiac activity) (Ciolek et al., 2017). Here again, no activity could be observed. By functional tests, MQ1 displays a pure antagonist effect against AVP (Ciolek et al., 2017). In addition, MQ1 acts as an inverse agonist on the V2R/Gas pathway (Droctové et al., 2020).

MQ1 is composed of 57 residues (RPSFCNLPVKPGP CNGFFSAFYYSQKTNKCHSFTYGGCKGN ANRFSTIEKCRRTCVCV) reticulated by three disulfide bridges, and the structure of the MQ1-N15K-G16A variant was solved by X-ray crystallography (PDB: 5M4V), demonstrating its Kunitz structure (Figure 4A). The two main functions of Kunitz toxins are inhibition of the serine protease mainly through its loop 1 and more particularly through the dyad Lys15-Ala16 in MQ1 and K⁺ channel blockage, mainly by its N-ter part. These two regions were mutated in MQ1, revealing that this toxin binds V2R with the same strategy as BPTI uses to inhibit serine protease (Ciolek et al., 2017).

When V2R is inactive or blocked by an antagonist, urine is no longer concentrated. Diuresis increases while urine osmolality decreases simultaneously. This aquaretic effect was seen in mice (Ciolek et al., 2017) and rats when animals were intraperitoneally injected with various doses of MQ1 (Droctové et al., 2020). MQ1 biodistribution was followed in mice by positron emission tomography (PET) imaging. 24 h post injection, only the kidney presents radioactivity, demonstrating the exclusive biodistribution of MQ1 in this organ. This result is in accordance with the fact that V2R is almost exclusively expressed in the kidney and that MQ1 is the most selective V2R ligand ever discovered (Droctové et al., 2020).

Deficiency in AVP secretion induces hyponatremia with plasma sodium levels below 135 mmol/L in humans. Chronic heart failure, liver failure or chronic kidney disease are associated with hyponatremia related to an increased risk of death. The efficacy of MQ1 was demonstrated in a rat model of hyponatremia and may be of great help in emergencies.

Polycystic kidney diseases (PKDs) are genetic disorders causing end-stage renal failure in children and adults. The

inhibition of V2R is still currently the only validated therapeutic strategy in humans to reduce disease progression. MQ1 was validated against this disease in a mouse model. The CD1-pcy/pcy mouse strain suffers from type 3 nephronophthisis, which is similar in many respects to autosomal dominant polycystic kidney disease, due to the mutation T1841G in the gene orthologous to human NPHP3 (Nagao et al., 2012). These pcy mice were given daily I.P. injections of with 13 μg of MQ1 for 100 days. Treated mice presented better renal function and fewer cysts as compared to control ones, demonstrating the *in vivo* efficacy of MQ1 against this chronic disease (Ciolek et al., 2017).

MQ1 is the first Kunitz-type toxin active on a GPCR, providing a new function for this peptide family. Leaving its N- and C-ter extremities far from the V2R interface, these areas are useful for grafting contrast elements for *in vitro* and *in vivo* imaging. MQ1 is the most selective V2R antagonist and the only efficient *in vivo* imaging tool. These two qualities may be exploited to develop diagnostic tools and therapeutics.

N-TRTX-Preg1a and N-BUTX-Ptr1a: Melanocortin Receptors

The melanocortin (MC) system consists of agonists, antagonists and receptors that control the physiological corticoadrenal functions. The five (MC1–5R) subtypes are regulated by the agonist melanocyte-stimulating hormones (MSH) and the adrenocorticotropic hormones, but also by the endogenous antagonists, agouti and agouti-related proteins. They mostly display their functions by the Gas/cAMP signal transduction pathway, thus regulating a set of physiological functions including obesity, inflammation, sexual function, pigmentation, cardiovascular tone and steroidogenesis (Dores et al., 2016; Shen et al., 2017; Toda et al., 2017; Fatima et al., 2021). MC3R and MC4R are expressed primarily in the brain. Through binding with the endogenous melanocortin ligands, these receptors play a key role in the regulation of energy homeostasis. For instance, anorexigenic hormones or neurotransmitters such as leptin, insulin, and serotonin activate MC4R in order to reduce food intake and/or increase energy expenditure. On the other hand, in the fasting state, the agonist MSH is down-regulated while the endogenous antagonists are up-regulated, thus promoting feeding (Cone, 2006; Toda et al., 2017).

Venoms are difficult to exploit due to the large number of toxins that composed them. In addition, 90% of venomous animals are tiny and never produce enough venom for the classical bioguided screening strategy. A “venomics” approach combining transcriptomic and proteomic characterization of 191 species identified 20,206 venom toxin sequences. 3,597 toxins were produced by recombinant expression or by chemical synthesis (Gilles and Servent, 2014). Screened on membrane preparations of COS cells stably expressing the human melanocortin receptor 4 (hMC4R) by competition with ¹²⁵I-NDP-α-MSH, this bank gave an incredible hit rate of 8%. Two toxins isolated from this screening have been studied in depth, the spider N-TRTX-Preg1a toxin, exhibiting an inhibitory cystine knot (ICK) motif, and N-BUTX-Ptr1a, a short scorpion toxin with a CSαβ structure (Reynaud et al., 2020).

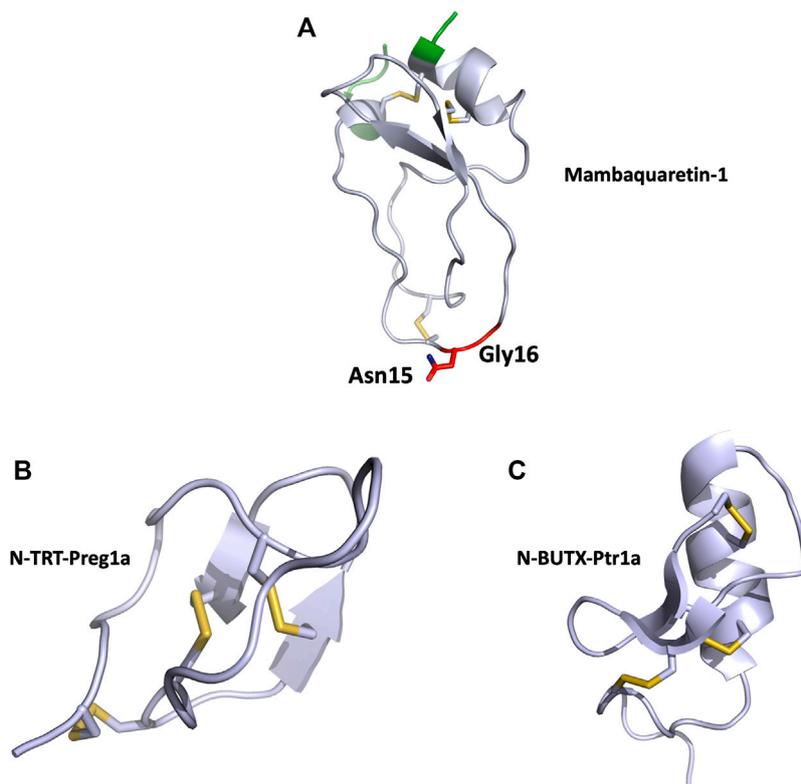


FIGURE 4 | (A), Structural view of mambaquaretin-1 (5m4v). Mambaquaretin-1 is represented in cartoon. In green, residues, which can be deleted without affecting the K_d of the toxin for V2R, critical residues for binding are shown in red, disulfide bonds are shown in yellow. **(B)**, Structural view of N-TRT-Preg1a (6saa) and **(C)**, N-BUTX-Ptr1a (6sab). N-TRT-Preg1a and N-BUTX-Ptr1a are represented in cartoon, disulfide bonds are shown in yellow.

Both N-TRTX-Preg1a and N-BUTX-Ptr1a display low micromolar affinities for the four MCRs: MC1R, MC3R, MC4R, and MC5R. Due to the ability of ICK and CS $\alpha\beta$ scaffolds to bind to ionic channels, the two selected toxins were tested at 100 μM on eight sodium channels, fourteen potassium channels, one voltage-gated calcium channel and two ligand-gated ion channels nAChR, without any effect. These toxins are the first described as active on MCRs, as well as the first with this scaffold that do not target ion channels (Reynaud et al., 2020).

Cell-based assay following cAMP expression via the G α s pathway was used to characterize N-TRTX-Preg1a and N-BUTX-Ptr1a on MC1R and MC4R. On MC1R, both toxins, tested at 100 μM , induced agonistic activity. At the same concentration, the toxins displayed no agonist activity on MC4R, but curiously they were also unable to antagonize MSH activation (Reynaud et al., 2020). Sequence analysis revealed that both toxins share 60% identity with known toxins active on ionic channels. Phylogenetic analyses were unable to unambiguously link these melanocortin toxins with their respective group, strongly suggesting that they may form a new sub-group of ICK and CS $\alpha\beta$ toxin. The structure of both toxins was solved by NMR with particular attention to the allocation of the disulfide bridges (**Figures 4B,C**).

TOXINS WITH 4 DISULFIDE BONDS

Four-disulfide-bridge toxins (4DBT) are largely present in animal venoms and display an important diversity of structural scaffolds according to their disulfide frameworks. In scorpions, they belong to the cystine-stabilized $\alpha\beta$ family with three small antiparallel β -sheets packed against an α -helix, such as in the α -toxins interacting with sodium channels (Bosmans and Tytgat, 2007) or in chlorotoxin, which binds insect chloride channels (Lippens et al., 1995). In spiders, 4DBT mainly belong to the knottin structural family targeting various ion channels, such as the ω -agatoxin IVA interacting with the Ca $_v$ 2 channels (Mintz et al., 1992; Bourinet and Zamponi, 2017) or the μ -agatoxins, which shift voltage-dependent activation of insect Na $_v$ channels (Adams, 2004). Cone snails produce in their venoms a huge diversity of toxins, from small linear sequences to large highly reticulated peptides. 4DB conotoxins belong to seven different cysteine framework families (XI, XII, XIII, XV, XVII, XXII, and XXVI) and include several non-natural amino acids (Kaas et al., 2012). The molecular target of these conotoxins is mainly unknown. Finally, in snakes, two different structural families of 4DBT have been identified, the 3 $_{10}$ β fold of the omwaprin associated with its antimicrobial property (Nair et al., 2007).

and the three-finger-fold toxins (3FTs) that often represent the most frequent structures found in *Elapidae* snake venoms. For instance, in the venom gland of the *Dendroaspis angusticeps*, 3FTs represent 70% of all the toxins (Lauridsen et al., 2016), while in the coral snake *Micrurus tschudii* this percentage reaches 95% (Sanz et al., 2016). This fold is characterized by three distinct loops rich in β -sheets emerging from a globular core reticulated by four highly conserved disulfide bridges with C1-C3, C2-C4, C5-C6, and C7-C8 connectivity. Structural variations in the 3FT sequences support the multifunctional properties associated with this scaffold, which can interact with a large diversity of molecular targets. Historically, the first targets identified with 3FTs were the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), for which these toxins have been used as specific pharmacological and structural tools (Changeux et al., 1970; Kessler et al., 2017). The neurotoxic effect of the *Elapidae* venoms is mainly related to the flaccid paralysis associated with 3FT-muscular nAChR interaction (Chang and Lee, 1963).

3FTs may also inhibit a large diversity of ion channel functions, such as calciseptine, which blocks the L-type Ca-channel (de Weille et al., 1991), δ -callitoxin, which selectively targets the $\text{Na}_v1.4$ sodium channel (Yang et al., 2016) or the pain-relieving peptides mambalgins and μ -EPTX-Na1a, which are characterized by their capacity to block acid-sensing ion channels (ASIC) (Diochot et al., 2012), and sodium channel $\text{Na}_v1.8$ (Zhang et al., 2019), respectively. This structural toxin family is also known to interact with phospholipids to induce cardiotoxic/cytotoxic effects (Konshina et al., 2011) and to abolish enzymatic activities, such as fasciculins on acetylcholinesterase (Bourne et al., 1995) or PLA $\text{I}\gamma$ on PLA2 (Ohkura et al., 1994).

Interestingly, this multifunctional structural scaffold is also able to interact with various GPCR targets belonging to the aminergic receptor family and in particular with muscarinic and adrenergic receptors (Servent and Fruchart-Gaillard, 2009; Servent et al., 2011; Maïga et al., 2012; Näreoja and Näsman, 2012). Furthermore, the former strict classification between muscarinic and adrenergic toxins was challenged by results highlighting the capacity of some toxins to interact simultaneously with high affinity on both types of receptor family. Phylogenetic analyses of these toxins show that muscarinic, adrenergic and dopaminergic toxins may be pooled in one family called aminergic toxins, this family coming probably from a specific radiation of ligands present in mamba venoms (Blanchet et al., 2014).

It was from a cDNA library of the king cobra snake (*Ophiophagus hannah*) that β -cardiotoxin was identified before being purified from the venom. Sequence analysis classified this toxin as a cardiotoxin, but only with 55% in sequence identity. Injected in rats, β -cardiotoxins decrease heart rate and induce a negative chronotropic effect, an opposite effect to that of classical cardiotoxins. It was advanced that β -cardiotoxin acts directly on heart muscle. As the β -adrenergic receptors are abundantly expressed in this tissue, the authors performed a binding study on the two β -adrenoceptor subtypes, the $\beta1R$ and $\beta2R$. The toxin has an affinity between 5 and 10 μM for both receptors. Even if no

functional assays were performed, we can imagine that β -cardiotoxin has an antagonist effect on $\beta1R$ (Rajagopalan et al., 2007).

Muscarinic Toxins: Muscarinic Receptors

Three-finger-fold toxins isolated from mamba venoms are among the more selective mAChR ligands. Over the last 30 years, about 10 different muscarinic toxins (MTs) have been purified and isolated from *Dendroaspis* venoms using a bioguided strategy (Adem et al., 1988; Karlsson et al., 1991; Servent et al., 2011). More recently, proteomic analysis of *Dendroaspis* venoms revealed the overall picture of the toxins present in these venoms and the large proportion of 3FTs, especially in green mambas, suggesting the presence of other muscarinic toxins, not yet identified and sequenced (Laustsen et al., 2015; Lauridsen et al., 2016; Ainsworth et al., 2018).

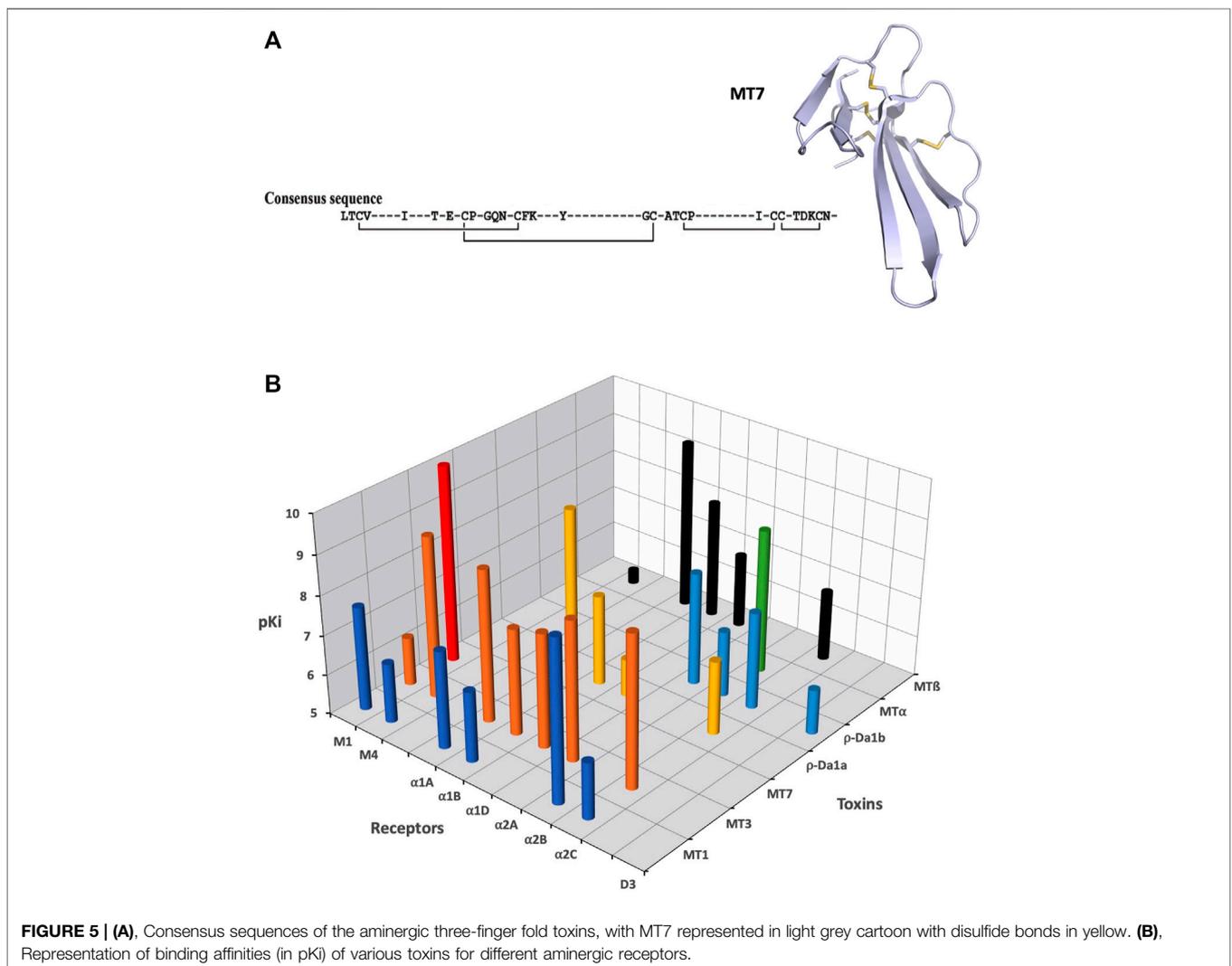
In addition to these MTs isolated from mamba venoms, some studies have described the presence in other *Elapidae* venoms of muscarinic toxin-like proteins able to display muscarinic activity. For instance, 3FTs with up to 50% sequence identity with MTs have been identified in *Naja kaouthia* venom, but with apparent affinity for mAChRs in the low micromolar range (Kukhtina et al., 2000). More recently, a 3FT with an additional fifth disulfide bridge was isolated from the same venom and shown to induce allosteric modulation on M1, M2, and M3 subtypes at micromolar concentration (Lyukmanova et al., 2015).

Muscarinic receptors (mAChRs) are the metabotropic counterparts of the ionotropic nicotinic receptors (nAChRs), both being activated by acetylcholine (ACh). Molecular cloning has revealed the existence of five distinct mAChR subtypes (M1 to M5), which mediate the action of ACh in almost all tissues, via hormonal and neuronal mechanisms (Eglen, 2012). mAChRs mediate autocrine/paracrine actions of ACh, such as the regulation of cell proliferation and migration, apoptosis, angiogenesis, skin cell signaling, immune functions or cytoskeletal organization. In the central and peripheral nervous systems, the five mAChR subtypes are expressed pre- and post-junctionally with specific distribution. Centrally, they regulate a large number of cognitive, sensory, behavioral or motor functions while at the periphery, via the parasympathetic system, they control glandular secretion, heart rate or smooth muscle contraction (Wess et al., 2007). Even if activation of multiple cellular effector pathways has been described following an agonist-mAChR interaction (Antony et al., 2009), the M1, M3, and M5 subtypes preferentially recruited G α_q /G α_{11} activation, leading to an increase in cytosolic Ca^{2+} concentrations, whereas the M2 and M4 subtypes coupled mainly to G α_i /Go-proteins to modulate the activity of adenylyl cyclase and ion channels. As a prototypic class of GPCRs, mAChRs possess orthosteric and allosteric ligand-binding sites, exist in monomeric/dimeric states and in constitutively active forms, or may induce biased signaling, raising interesting opportunities for the design of therapeutic ligands.

Due to their ubiquitous distribution and involvement in several brain, cardiac, digestive and airway functions, disruption of muscarinic signaling contributes to many pathological conditions such as Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease or schizophrenia, chronic obstructive pulmonary disease, overactive bladder, cardiovascular diseases and irritable bowel syndrome. A multitude of mAChR ligands have been identified over the years for potential therapeutic applications, but their limited selectivity for one of the five mAChR subtypes has often hampered their clinical development due to adverse side effects (Langmead et al., 2008).

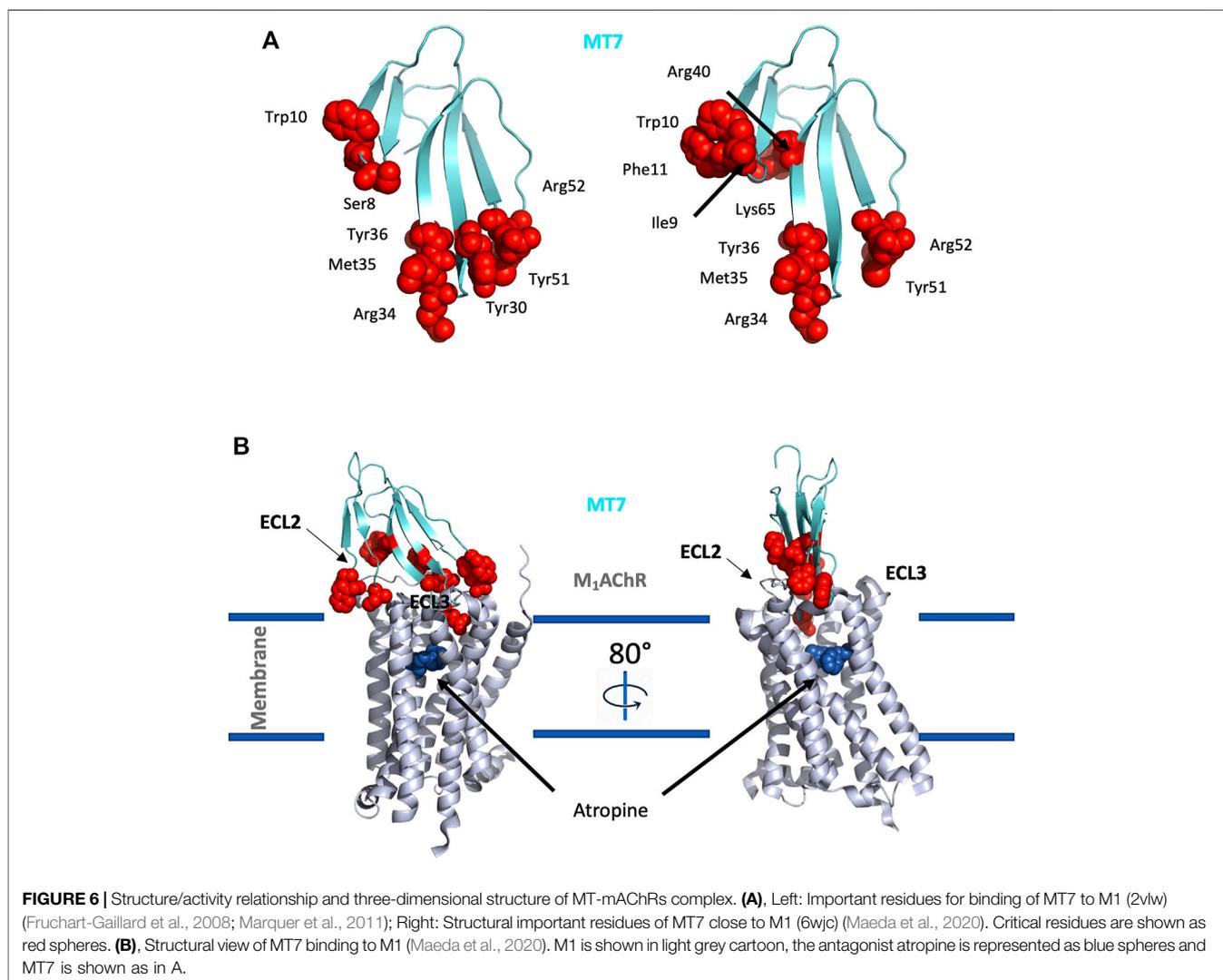
Three structures of MTs have been solved by NMR (Ségalas et al., 1995) or X-ray crystallography (MT1: 4DO8, MT2: 1FF4 and MT7: 2VLW) (Fruchart-Gaillard et al., 2008, 2012), highlighting that MTs belong to the 3FTs family with all the structural markers of this fold. In addition, MTs include highly conserved sequences at their N-ter (LTCV) region, C-ter region (TDKCN) and in the loops connecting fingers 1–2 (GQN (L/V)CFK) and 2–3 ((A/V)AT)

(Figure 5A). Nevertheless, despite high sequence identity (at least 50%), MTs display highly variable pharmacological profiles in term of affinity, selectivity and mode of action (Figure 5B). MT7 is the most potent and selective ligand of the M1 receptor, interacting with sub-nanomolar affinity with this subtype and being unable to recognize the four other mAChRs, even at high micromolar concentration (Max S. et al., 1993; Mourier et al., 2003). Conversely, MT1 and MT3 display polypharmacological profiles, interacting not only with M4 and M1 subtypes (Jolkkonen et al., 1994) (Liang et al., 1996), but also with α 1- and α 2-adrenergic receptors (Blanchet et al., 2014) (Figure 5B). In addition, in order to specify the mode of action of these toxins on mAChRs, various binding and functional assays have been performed demonstrating that MT7 behaves as an allosteric modulator of M1 functions (Max SI. et al., 1993; Olianas et al., 2000; Fruchart-Gaillard et al., 2006), while MT1 or MT3 are competitive antagonists on M1 and M4 receptors, respectively (Jolkkonen et al., 1995; Olianas et al., 1996; Mourier et al., 2003).



In order to perform structure-activity relationship studies and identify at the molecular level how MTs interact with mAChRs, the MT7-M1 interaction was selected, based on the high affinity and selectivity of this interaction and on the capacity to produce large quantities (up to 10 mg/synthesis) of wild-type toxin and variants of the toxin by solid-phase peptide synthesis (Mourier et al., 2003). First, alanine-scanning was performed on MT7, highlighting the major role of residues located at the tip of loop I (Trp10), loop II (Arg34, Met35, Tyr36) and loop III (Tyr51, Arg52) in its interaction with the M1 receptor (Fruchart-Gaillard et al., 2008; Marquer et al., 2011) (**Figure 6A**). Interestingly, these results were confirmed recently with the resolution of the MT7-M1 structural complex where all these residues, and some additional ones (Phe11, Arg40, and Lys65), predominantly contribute to the interaction surface with the receptor (Maeda et al., 2020) (**Figure 6B**). At the receptor level, Glu170 and Tyr179 of the M1 receptor were first identified as essential for MT7 interaction

(Kukkonen et al., 2004), while a complete mutational analysis using chimeric M1-M3 receptors and site-directed mutagenesis approaches revealed the major role of residues in the extracellular loop 2 and top of the TM7 domain of the receptor in the MT7 interaction (Marquer et al., 2011). These preliminary results were recently confirmed, completed and detailed by the resolution of the crystallographic structure of the MT7-hM1 complex (**Figure 6B**) (Maeda et al., 2020). Maeda and colleagues show that the interactions between M1 mAChR and MT7 occur predominantly with extracellular loop 2 of the receptor, which forms extensive hydrophobic interactions and large polar contacts with MT7's loop 1 and loop 2, respectively. These interactions and a few others involving receptor transmembrane helices 7 and 4, support the high affinity and selectivity of the MT7-M1 complex (Maeda et al., 2020). Moreover, the authors show that the insertion of finger loop 2 of the toxin into the extracellular vestibule of M1 receptor stabilizes an outward movement of its TM6, extracellular loop 3 and TM7 domains, in



agreement with its allosteric property. Finally, based on the structural information coming from this crystallographic complex structure, an *in vitro* engineering of the MT7 loops was performed allowing the selection of an M2-selective ligand, confirming the multipotency of the three-finger scaffold and its ability to support interaction with a large diversity of aminergic GPCR subtypes (Maeda et al., 2020).

In vivo, MTs have been used as pharmacological tools to study the functional role of mAChRs in various pathophysiological contexts. For instance, MT3 was shown to be effective at inhibiting the development of myopia and used to demonstrate the existence of different muscarinic mechanisms in excessive eye growth (Nickla et al., 2015). This toxin was also used to show the major role of the M4 subtype in the inhibition of hippocampal and striatal adenylate cyclase activity as well as in the modulation of the neurotransmission of hippocampal neurons (Sánchez, et al., 2009a; Sánchez, et al., 2009b). The exceptional selectivity of MT7 for the M1 subtype was exploited to demonstrate that the potentiation of NMDA receptor currents in hippocampal CA1 pyramidal cells was mediated by the M1 receptor (Marino et al., 1998) or to confirm that the M1 receptor mediates part of nitric oxide's vagal facilitatory effect in the isolated innervated rat right atrium (Hogan and Markos, 2007). Finally, the group of Fernyhough has shown that, via ERK-CREB signaling activation, MT7 elevates neurite outgrowth and protects from small and large fiber neuropathy in adult sensory neurons (Sabbir and Fernyhough, 2018). This effect is mediated via the enhancement of mitochondrial function and MT7 seems able to prevent neurodegeneration and drive nerve fiber repair in two of the most common forms of peripheral neuropathy, type 1 diabetes and chemotherapy-induced peripheral neuropathy (Saleh et al., 2020).

ρ -Da1a: α 1a-Adrenoceptor

ρ -Da1a (formerly named AdTx-1) was discovered by a bioguided strategy in the venom of the green mamba snake *Dendroaspis angusticeps* by competition with ^3H -prazosine on rat brain membrane preparations (Quinton et al., 2010). ρ -Da1a displays a high selectivity for α 1_AAR ($K_i = 0.35$ nM) versus the other adrenoceptor subtypes ($K_i = 317$ nM or

420 nM for α 1_BAR and α 1_DAR, respectively) and more broadly as compared to other aminergic receptors. On COS cells stably expressing α 1_AAR, ρ -Da1a acts as a non-competitive antagonist, reducing epinephrine efficacy (Palea et al., 2013). This insurmountable antagonist property was confirmed using four other α 1AR agonists (Maïga et al., 2013a). On isolated rat and human prostatic muscles, ρ -Da1a displayed the same insurmountable antagonist properties, making this peptide the most effective relaxant of prostatic muscle and a potential drug candidate for prostate hyperplasia. ρ -Da1a is a 3FT reticulated with four disulfide bridges and belongs to the aminergic-toxin group. It was crystallized and its structure solved by X-ray diffraction (Maïga et al., 2013). Mutational studies were performed to delineate the mode of action of ρ -Da1a on α 1_AAR. Results described in this review included published (Maïga et al., 2013b) and also original data. The tips of the three-finger toxins are known to interact with their respective targets (Kessler et al., 2017). Variants K7A, I9A, F10A, of the first finger, the K34A and Y36A of the second and the E50A and D53A of the third finger were tested. The Y36A modification in loop II induces a strong decrease in the toxin's affinity (three order of magnitude) for α 1_AAR, while complementary interactions involved Phe10 in loop I and Asp53 in loop III (Table 1).

We explored the external part of the receptor in addition to the orthosteric site. Curiously, none of the ECL residues are involved in ρ -Da1a binding. Two discontinuous areas were identified, at the top of the TM2 domain with the two residues Phe86 and Glu87, and at the orthosteric site where Phe288 and Phe312 are clearly important for toxin affinity. The aspartate residue in position 3.32 (Asp106 in α 1_AAR) is a key element for the activity of the aminergic agonists. α 1_AAR-D106A was expressed very poorly and binding could be detected only with ^{125}I -HEAT. ρ -Da1a affinity is affected by this mutation, demonstrating a contribution of this negative charge in the toxin interaction (Maïga et al., 2013a, 2014) (Table 2).

The potency and selectivity of ρ -Da1a could be useful to clarify the physiological functions of α 1_AAR in animal models. Moreover, this peptide could be the basis for the synthesis of new α 1_AAR antagonists that could be used to treat lower

TABLE 1 | Affinities of ρ -Da1a variants on α 1_AAR. Data obtained by competition binding experiments with ^3H -prazosin on COS cells stably expressing α 1_AAR as previously described (Quinton et al., 2010).

Variants	K_i	pK_i	Ratio	N
WT	0.85	9.07 ± 0.03	1	10
K7A	4.5	8.35 ± 0.03**	5.3	3
F10A	15	7.82 ± 0.03***	18	8
K34A	1.1	8.96 ± 0.03	1.3	6
Y36A	1,600	5.80 ± 0.1***	1900	5
E50A	0.2	9.70 ± 0.04	0.24	3
D53A	38	7.42 ± 0.03***	45	4

WT: wild type sequence. K_i are expressed in nM, $pK_i = -\log(K_i)$, ratio = $K_i(\text{variant})/K_i(\text{WT})$, N: number of determinations. Statistical analysis was done by a one-way ANOVA with post hoc test according to Dunnett in comparison to α 1_AAR WT.

** p value = [0.01; 0.001]; *** p value < 0.001 using ANOVA tests. Original data.

urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. The rabbit prostate gland smooth muscle contraction is mainly mediated by activation of α_{1A} AR. At concentrations of 30 and 100 nM, ρ -Da1a injected intraperitoneally decreased both phenylephrine potency and efficacy, confirming its *in vivo* insurmountable antagonism (Quinton et al., 2010). The same insurmountable antagonist property was obtained with human isolated prostatic smooth muscle. As expected with the peptide nature of ρ -Da1a, no effect could be seen on the rat intra-urethral pressure when the toxin was administrated *per os* (Palea et al., 2013). *In vivo* effects of ρ -Da1a and tamsulosine were evaluated in male rat by measuring the intra-urethral pressure. Here again, ρ -Da1a acted as an insurmountable antagonist with a potency equivalent to that of tamsulosin (Palea et al., 2013).

Comparison MT7/ ρ -Da1a

Interestingly, based on the pharmacological and structural characterization of the interaction of aminergic toxins on aminergic receptors described above, the multiplicity of these interactions and the diversity of the biological effects observed were highlighted. Indeed, despite their belonging to the same structural toxin family, the three-finger-fold toxins, and their interaction with phylogenetically related class A aminergic receptors, MT7

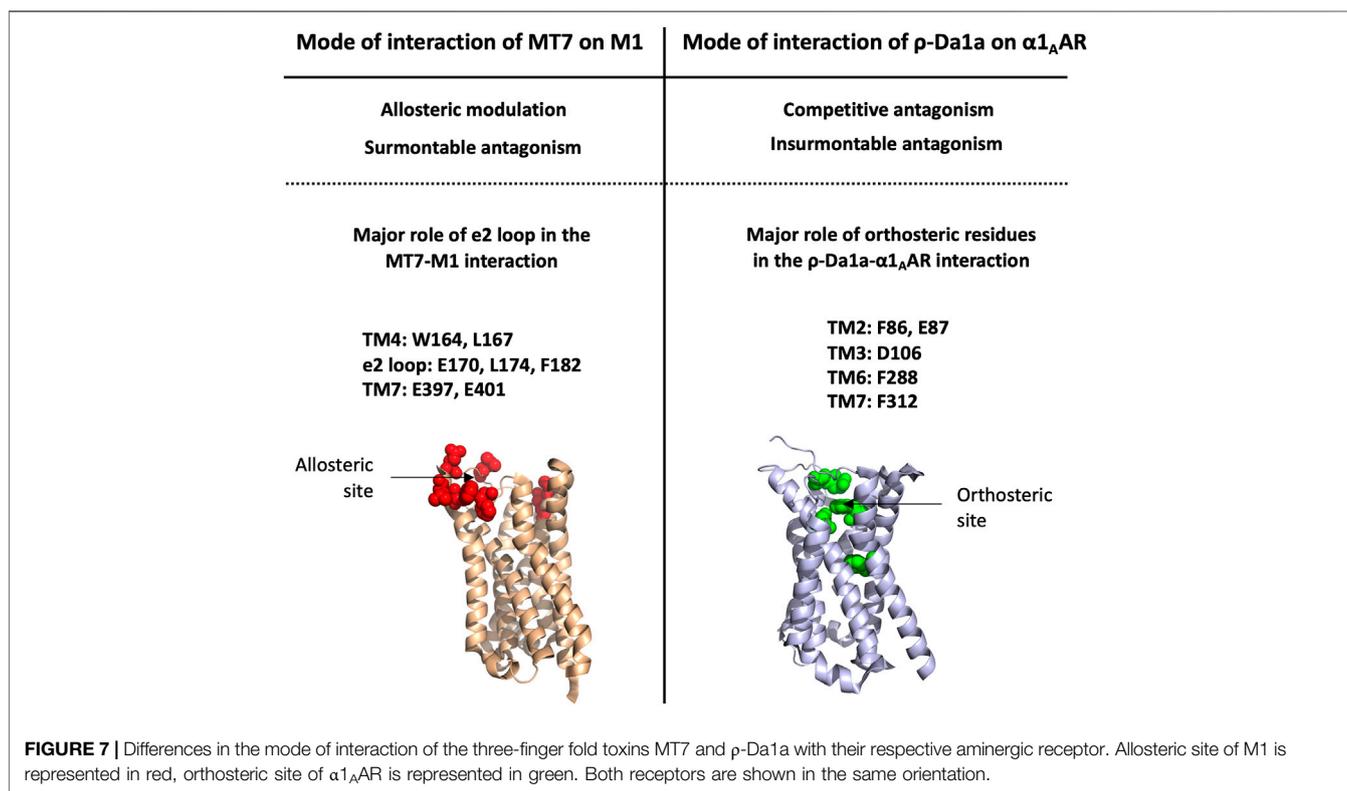
and ρ -Da1a interact in a totally different way with their respective receptors and induce quite different functional effects. Whereas MT7 acts as an allosteric modulator on muscarinic M1 receptor by interacting predominantly with its extracellular loop e2 (Glu170, Leu174, and Phe 182) (Maeda et al., 2020), ρ -Da1a behaves as a competitive inhibitor on α_{1A} AR, in agreement with the crucial role of orthosteric residues of this receptor in its interaction (Phe86, Phe87 in TM2, Asp106 in TM3, Phe288 in TM6 and Phe312 in TM7) (Table 2) (Figure 7). Concerning the toxins, both MT7 and ρ -Da1a exploit the tip of their three fingers to interact with their respective receptors but interestingly, if the highly conserved positively charged residues at the tip of the second loop of three-finger toxins (Arg34 in MT7) is highly critical in its interaction with M1 receptor, it is not the case for ρ -Da1a (Lys34) on α_{1A} AR (Table 1). The crystallographic structure of the MT7-M1 complex allows to precise the hydrophobic and polar interactions involved in this interaction, such precise information being not yet available for the ρ -Da1a- α_{1A} AR complex. Furthermore, at the functional level, while ρ -Da1a displays insurmountable antagonism on the agonist activation of α_{1A} AR (Maïga et al., 2013b), MT7 produces a surmountable effect on the carbamylcholine-activated M1 receptor (personal data). These data highlight the pleiotropic effect of 3FTs on

TABLE 2 | Affinities of ρ -Da1a on α_{1A} AR mutants. Data obtained by competition binding experiments with 3 H-prazosin and 125 I-HEAT on COS cells stably expressing α_{1A} AR as previously described. Positions of amino acids in the transmembrane helices are given according to the Ballesteros-Weinstein nomenclature (Ballesteros and Weinstein, 1995).

α_{1A} AR	Position	pKi using 3 H-prazosin	pKi using 125 I-HEAT	Ratio
WT		9.19 ± 0.09	9.26 ± 0.07	1
F86A	2.64		7.7 ± 0.06&	36
E87A	2.65	8.14 ± 0.12		11
Y91A	ECL1	9.26 ± 0.08		0.85
F94A	ECL1	9.18 ± 0.14		1.02
R96A	ECL1	9.27 ± 0.11		0.83
F98A	3.24	8.80 ± 0.09		2.45
D106A	3.32		8.48 ± 0.11&	6.0
P168A	ECL2	8.92 ± 0.14		1.86
D172A	ECL2	9.11 ± 0.09		1.20
E173A	ECL2	8.96 ± 0.11		1.70
E180A	ECL2	9.01 ± 0.07		1.51
E181A	ECL2	9.27 ± 0.12		0.83
F187A	5.41	8.96 ± 0.08		1.70
S188A	5.42	9.30 ± 0.13		0.78
S192A	5.46	9.26		0.85
F193A	5.47		9.64 ± 0.11&	0.42
F281A	6.44		9.66 ± 0.09&	0.40
F288A	6.51		8.00 ± 0.08&	18
M292A	6.55		9.41 ± 0.11&	0.71
P299A	ECL3	9.22 ± 0.15		0.93
D300A	ECL3	8.89 ± 0.13		2.00
K302A	ECL3	9.43 ± 0.08		0.58
E305A	ECL3	8.77 ± 0.09		2.63
F308A	7.35		9.15 ± 0.07&	0.71
F312A	7.39		7.28 ± 0.10*	93
W313A	7.40	9.12 ± 0.16		1.17

WT: wild type sequence. Ratio = K_i (variant)/ K_i (WT), pKi = $-\log(K_i)$. The data are original unless & (Maïga, et al., 2013a). Ratio concern the ρ -Da1a affinity for α_{1A} AR mutant versus α_{1A} AR wild-type.

*: p value = [0.0; 0.01] using ANOVA tests.



class A GPCRs, reinforcing their interest as pharmacological tools and original modulators of this receptor family.

CONCLUSION

Many venomous animals have evolved venom systems in order to select toxins that interfere with specific physiological systems of prey or predators. Besides the most known and potent neurotoxic and cardiovascular/hemostatic effects associated with respective inhibition of various ion channels or enzymes, other alternative strategies appear to have been selected such as those involving GPCR targets. That is the case of different toxins described in this review, as sarafotoxins from *Atractaspis* snake venoms that exert their toxic effect by inducing a strong general vasoconstriction leading to heart failure via their interaction with endothelin receptors. In the same way, ρ -TIA conotoxin, a selective α_1 AR antagonist, induces a striking loss of zebrafish larvae escape that could be crucial for the net hunting strategy of this cone snail. This latter example highlights the importance of using ecologically relevant animal models to decipher the biological role of toxins, and could explain the lack of toxic effect in mammals often associated with GPCR-interacting toxins. Interestingly, when the GPCR-toxin itself is devoid of any toxicity, some authors postulate that a synergistic effect may occur with other toxins present in the venoms, as postulated for muscarinic toxins in *Dendroaspis* venoms. Nevertheless, in many cases, the question of the functional requirement of GPCR-targeting toxins in venoms

is still debated. Anyway, the absence of toxicity of these toxins, associated with usual high affinity, selectivity and stability of these peptides, can be largely exploited for therapeutic development. Indeed, GPCRs represent a family of privileged drug targets covering more than 30% of the drugs approved by the FDA (475 drugs targeting 108 GPCRs) (Hauser et al., 2017). Nevertheless, a general problem associated with GPCR drug discovery research is the lack of new specific ligands of this receptor superfamily. Venom-derived peptides could be part of the solution of this problem, as demonstrated by the anti-diabetic exendin-4 and other molecules in pre-clinical and clinical development.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, DS, A-CV; resources, A-CV, PR, PK, AM, NG, and DS; writing-original draft preparation, A-CV, PR, PK, NG, and DS; writing-review and editing, A-CV, PR, PK, NG, and DS; supervision, A-CV, PR, PK, NG, and DS. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.811365/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abosamak, N. R., and Shahin, M. H. (2021). "Beta 2 Receptor Agonists/Antagonists," in *StatPearls* (Treasure Island, FL: StatPearls Publishing). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559069/>.
- Adams, M. E. (2004). Agatoxins: Ion Channel Specific Toxins from the American Funnel Web Spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon* 43 (5), 509–525. doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.004
- Adelhorst, K., Hedegaard, B. B., Knudsen, L. B., and Kirk, O. (1994). Structure-activity Studies of Glucagon-like Peptide-1. *J. Biol. Chem.* 269 (9), 6275–6278. doi:10.1016/s0021-9258(17)37366-0
- Adem, A., Åsblom, A., Johansson, G., Mbugua, P. M., and Karlsson, E. (1988). Toxins from the Venom of the green Mamba *Dendroaspis angusticeps* that Inhibit the Binding of Quinuclidinyl Benzilate to Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Biochim. Biophys. Acta (Bba) - Mol. Cell Res.* 968 (3), 340–345. doi:10.1016/0167-4889(88)90025-0
- Aguilar, M. B., Lezama-Monfil, L., Maillou, M., Pedraza-Lara, H., López-Vera, E., and Heimer de la Cotera, E. P. (2006). A Biologically Active Hydrophobic T-1-Conotoxin from the Venom of *Conus spurius*. *Peptides* 27 (3), 500–505. doi:10.1016/j.peptides.2005.07.020
- Ainsworth, S., Petras, D., Engmark, M., Süßmuth, R. D., Whiteley, G., Albuлесcu, L.-O., et al. (2018). The Medical Threat of Mamba Envenoming in Sub-Saharan Africa Revealed by Genus-wide Analysis of Venom Composition, Toxicity and Antivenomics Profiling of Available Antivenoms. *J. Proteomics* 172, 173–189. doi:10.1016/j.jprot.2017.08.016
- Alarcon, C., Wicksteed, B., and Rhodes, C. J. (2006). Exendin 4 Controls Insulin Production in Rat Islet Beta Cells Predominantly by Potentiation of Glucose-Stimulated Proinsulin Biosynthesis at the Translational Level. *Diabetologia* 49 (12), 2920–2929. doi:10.1007/s00125-006-0433-y
- Alberto Maggi, C., Patacchini, R., Giuliani, S., and Meli, A. (1989). Potent Contractile Effect of Endothelin in Isolated guinea-pig Airways. *Eur. J. Pharmacol.* 160 (1), 179–182. doi:10.1016/0014-2999(89)90670-5
- Alhayek, S., and Preuss, C. V. (2021). "Beta 1 Receptors," in *StatPearls* (Treasure Island, FL: StatPearls Publishing). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532904/>.
- Ali, F., Guglin, M., Vaitkevicius, P., and Ghali, J. K. (2007). Therapeutic Potential of Vasopressin Receptor Antagonists. *Drugs* 67 (6), 847–858. doi:10.2165/00003495-200767060-00002
- Antony, J., Kellershohn, K., Mohr-Andrä, M., Kebig, A., Prilla, S., Muth, M., et al. (2009). Dualsteric GPCR Targeting: A Novel Route to Binding and Signaling Pathway Selectivity. *FASEB J.* 23 (2), 442–450. doi:10.1096/fj.08-114751
- Ballesteros, J. A., and Weinstein, H. (1995). "[19] Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relations in G Protein-Coupled Receptors." *Methods in Neurosciences*. Editor S. C. Sealton (Academic Press), 25, 366–428. doi:10.1016/S1043-9471(05)80049-7
- Barton, M., and Yanagisawa, M. (2019). Endothelin: 30 Years from Discovery to Therapy. *Hypertension* 74 (6), 1232–1265. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12105
- Betts, L. C., and Kozlowski, R. Z. (2000). Electrophysiological Effects of Endothelin-1 and Their Relationship to Contraction in Rat Renal Arterial Smooth Muscle. *Br. J. Pharmacol.* 130 (4), 787–796. doi:10.1038/sj.bjp.0703377
- Blanchet, G., Collet, G., Mourier, G., Gilles, N., Fruchart-Gaillard, C., Marcon, E., et al. (2014). Polypharmacology Profiles and Phylogenetic Analysis of Three-finger Toxins from Mamba Venom: Case of Aminergic Toxins. *Biochimie* 103, 109–117. doi:10.1016/j.biochi.2014.04.009
- Boisbouvier, J., Albrand, J.-P., Blackledge, M., Jaquinod, M., Schweitz, H., Lazdunski, M., et al. (1998). A Structural Homologue of Colipase in Black Mamba Venom Revealed by NMR Floating Disulphide Bridge Analysis. *J. Mol. Biol.* 283 (1), 205–219. doi:10.1006/jmbi.1998.2057
- Bosmans, F., and Tytgat, J. (2007). Voltage-gated Sodium Channel Modulation by Scorpion α -toxins. *Toxicon* 49 (2), 142–158. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.023
- Bourinet, E., and Zamponi, G. W. (2017). Block of Voltage-Gated Calcium Channels by Peptide Toxins. *Neuropharmacology* 127, 109–115. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.10.016
- Bourne, Y., Taylor, P., and Marchot, P. (1995). Acetylcholinesterase Inhibition by Fasciculin: Crystal Structure of the Complex. *Cell* 83 (3), 503–512. doi:10.1016/0092-8674(95)90128-0
- Briyal, S., Ranjan, A. K., Hornick, M. G., Puppala, A. K., Luu, T., and Gulati, A. (2019). Anti-apoptotic Activity of ETB Receptor Agonist, IRL-1620, Protects Neural Cells in Rats with Cerebral Ischemia. *Sci. Rep.* 9 (1), 10439. doi:10.1038/s41598-019-46203-x
- Bruchas, M. R., and Chavkin, C. (2010). Kinase Cascades and Ligand-Directed Signaling at the Kappa Opioid Receptor. *Psychopharmacology* 210 (2), 137–147. doi:10.1007/s00213-010-1806-y
- Brust, A., Croker, D. E., Colless, B., Ragnarsson, L., Andersson, A., Jain, K., et al. (2016). Conopeptide-Derived κ -Opioid Agonists (Conorphins): Potent, Selective, and Metabolic Stable Dynorphin A Mimetics with Antinociceptive Properties. *J. Med. Chem.* 59 (6), 2381–2395. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00911
- Bullock, C. M., Li, J.-D., and Zhou, Q.-Y. (2004). Structural Determinants Required for the Bioactivities of Prokineticins and Identification of Prokineticin Receptor Antagonists. *Mol. Pharmacol.* 65 (3), 582–588. doi:10.1124/mol.65.3.582
- Camilleri, M. (2011). A Randomized, Double Blind, Parallel Group, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Effect of On-Demand Treatment with Asimadoline in Patients with Irritable Bowel Syndrome over 4 Weeks (Clinical Trial Registration No. NCT00955994). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00955994>.
- Campos-Lira, E., Carrillo, E., Aguilar, M. B., Gajewiak, J., Gómez-Lagunas, F., and López-Vera, E. (2017). Conorfamide-Sr3, a Structurally Novel Specific Inhibitor of the Shaker K + Channel. *Toxicon* 138, 53–58. doi:10.1016/j.toxicon.2017.07.024
- Carraway, R., and Leeman, S. E. (1973). The Isolation of a New Hypotensive Peptide, Neurotensin, from Bovine Hypothalamus. *J. Biol. Chem.* 248 (19), 6854–6861. doi:10.1016/S0021-9258(19)43429-7
- Chabry, J., Labbé-Jullié, C., Gully, D., Kitabgi, P., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (1994). Stable Expression of the Cloned Rat Brain Neurotensin Receptor into Fibroblasts: Binding Properties, Photoaffinity Labeling, Transduction Mechanisms, and Internalization. *J. Neurochem.* 63 (1), 19–27. doi:10.1046/j.1471-4159.1994.63010019.x
- Chang, C. C., and Lee, C. Y. (1963). Isolation of Neurotoxins from the Venom of *Bungarus multicinctus* and Their Modes of Neuromuscular Blocking Action. *Arch. Int. Pharmacodyn Ther.* 144, 241–257.
- Changeux, J.-P., Kasai, M., and Lee, C.-Y. (1970). Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67 (3), 1241–1247. doi:10.1073/pnas.67.3.1241
- Chartier, M., Desgagné, M., Sousbie, M., Rumsby, C., Chevillard, L., Théroux, L., et al. (2021). Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Profiles of a Neurotensin Receptor Type 2 (NTS2) Analgesic Macrocytic Analog. *Biomed. Pharmacother.* 141, 111861. doi:10.1016/j.biopha.2021.111861
- Chavkin, C., James, I. F., and Goldstein, A. (1982). Dynorphin Is a Specific Endogenous Ligand of the κ Opioid Receptor. *Science* 215 (4531), 413–415. doi:10.1126/science.6120570
- Checler, F., Amar, S., Kitabgi, P., and Vincent, J.-P. (1986). Catabolism of Neurotensin by Neural (Neuroblastoma Clone N1E115) and Extraneural (HT29) Cell Lines. *Peptides* 7 (6), 1071–1077. doi:10.1016/0196-9781(86)90136-1
- Chen, T., Kwok, H., Ivanyi, C., and Shaw, C. (2006). Isolation and Cloning of Exendin Precursor cDNAs from Single Samples of Venom from the Mexican Beaded Lizard (*Heloderma horridum*) and the Gila Monster (*Heloderma suspectum*). *Toxicon* 47 (3), 288–295. doi:10.1016/j.toxicon.2005.11.004
- Chen, Z., Rogge, G., Hague, C., Alewood, D., Colless, B., Lewis, R. J., et al. (2004). Subtype-selective Noncompetitive or Competitive Inhibition of Human α 1-Adrenergic Receptors by p-TIA. *J. Biol. Chem.* 279 (34), 35326–35333. doi:10.1074/jbc.M403703200
- Ciolek, J., Reinfrank, H., Quinton, L., Viengchareun, S., Stura, E. A., Vera, L., et al. (2017). Green Mamba Peptide Targets Type-2 Vasopressin Receptor against Polycystic Kidney Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114 (27), 7154–7159. doi:10.1073/pnas.1620454114
- Clark, S. D. (2020). The Role of Dynorphin and the Kappa Opioid Receptor in Schizophrenia and Major Depressive Disorder: A Translational Approach. *Handbook Exp. Pharmacol.*, 525–546. doi:10.1007/164_2020_396
- Clineschmidt, B. V., and McGuffin, J. C. (1977). Neurotensin Administered Intracranially Inhibits Responsiveness of Mice to Noxious Stimuli. *Eur. J. Pharmacol.* 46 (4), 395–396. doi:10.1016/0014-2999(77)90236-9

- Cone, R. D. (2006). Studies on the Physiological Functions of the Melanocortin System. *Endocr. Rev.* 27 (7), 736–749. doi:10.1210/er.2006-0034
- Craig, A. G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., et al. (1999). Conulakin-G, an O-Glycosylated Invertebrate Neurotensin. *J. Biol. Chem.* 274 (20), 13752–13759. doi:10.1074/jbc.274.20.13752
- Cruz, L. J., de Santos, V., Zafaralla, G. C., Ramilo, C. A., Zeikus, R., Gray, W. R., et al. (1987). Invertebrate Vasopressin/oxytocin Homologs. Characterization of Peptides from *Conus Geographus* and *Conus Straitus* Venoms. *J. Biol. Chem.* 262 (33), 15821–15824. doi:10.1016/S0021-9258(18)47661-2
- Daly, N. L., and Wilson, D. (2018). Structural Diversity of Arthropod Venom Toxins. *Toxicon* 152, 46–56. doi:10.1016/j.toxicon.2018.07.018
- Davenport, A. P., Hyndman, K. A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D. E., Pollock, J. S., et al. (2016). Endothelin. *Pharmacol. Rev.* 68 (2), 357–418. doi:10.1124/pr.115.011833
- de Weille, J. R., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A., and Lazdunski, M. (1991). Calciseptine, a Peptide Isolated from Black Mamba Venom, Is a Specific Blocker of the L-type Calcium Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (6), 2437–2440. doi:10.1073/pnas.88.6.2437
- Dessy, C., and Balligand, J.-L. (2010). Beta3-Adrenergic Receptors in Cardiac and Vascular Tissues. *Adv. Pharmacol. (San Diego, Calif.)* 59, 135–163. doi:10.1016/S1054-3589(10)59005-7
- Deuis, J. R., Whately, E., Brust, A., Insera, M. C., Asvadi, N. H., Lewis, R. J., et al. (2015). Activation of κ Opioid Receptors in Cutaneous Nerve Endings by Conorphin-1, a Novel Subtype-Selective Conopeptide, Does Not Mediate Peripheral Analgesia. *ACS Chem. Neurosci.* 6 (10), 1751–1758. doi:10.1021/acchemneuro.5b00113
- Devost, D., Wrzal, P., and Zingg, H. (2008). “Oxytocin Receptor Signalling.” *Progress in Brain Research*. Editors I. D. Neumann and R. Landgraf (Elsevier), 170, 167–176. doi:10.1016/S0079-6123(08)00415-9
- Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., et al. (2012). Black Mamba Venom Peptides Target Acid-Sensing Ion Channels to Abolish Pain. *Nature* 490 (7421), 552–555. doi:10.1038/nature11494
- Dong, Z., Lei, Q., Yang, R., Zhu, S., Ke, X.-X., Yang, L., et al. (2017). Inhibition of Neurotensin Receptor 1 Induces Intrinsic Apoptosis via Let-7a-3p/Bcl-W axis in Glioblastoma. *Br. J. Cancer* 116 (12), 1572–1584. doi:10.1038/bjc.2017.126
- Dores, R. M., Liang, L., Davis, P., Thomas, A. L., and Petko, B. (2016). 60 YEARS OF POMC: Melanocortin Receptors: Evolution of Ligand Selectivity for Melanocortin Peptides. *J. Mol. Endocrinol.* 56 (4), T119–T133. doi:10.1530/JME-15-0292
- Doyle, M. E., Theodorakis, M. J., Holloway, H. W., Bernier, M., Greig, N. H., and Egan, J. M. (2003). The Importance of the Nine-Amino Acid C-Terminal Sequence of Exendin-4 for Binding to the GLP-1 Receptor and for Biological Activity. *Regul. Pept.* 114 (2–3), 153–158. doi:10.1016/S0167-0115(03)00120-4
- Droctová, L., Lancien, M., Tran, V. L., Susset, M., Jego, B., Theodoro, F., et al. (2020). A Snake Toxin as a Theranostic Agent for the Type 2 Vasopressin Receptor. *Theranostics* 10 (25), 11580–11594. doi:10.7150/thno.47485
- Ducancel, F. (2005). Endothelin-like Peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (23), 2828–2839. doi:10.1007/s00018-005-5286-x
- Dutertre, S., Croker, D., Daly, N. L., Andersson, A., Muttenthaler, M., Lumsden, N. G., et al. (2008). Conopressin-T from *Conus Tulipa* Reveals an Antagonist Switch in Vasopressin-like Peptides. *J. Biol. Chem.* 283 (11), 7100–7108. doi:10.1074/jbc.M706477200
- Dutt, M., Dutertre, S., Jin, A.-H., Lavergne, V., Alewood, P., and Lewis, R. (2019a). Venomics Reveals Venom Complexity of the Piscivorous Cone Snail, *Conus Tulipa*. *Mar. Drugs* 17 (1), 71. doi:10.3390/md17010071
- Dutt, M., Giacomotto, J., Ragnarsson, L., Andersson, A., Brust, A., Dekan, Z., et al. (2019b). The $\alpha 1$ -adrenoceptor Inhibitor p-TIA Facilitates Net Hunting in Piscivorous *Conus Tulipa*. *Sci. Rep.* 9 (1), 17841. doi:10.1038/s41598-019-54186-y
- Egan, J. M., Meneilly, G. S., and Elahi, D. (2003). Effects of 1-mo Bolus Subcutaneous Administration of Exendin-4 in Type 2 Diabetes. *Am. J. Physiology-Endocrinology Metabolism/Endocrinology Metab.* 284 (6), E1072–E1079. doi:10.1152/ajpendo.00315.2002
- Eglen, R. M. (2012). Overview of Muscarinic Receptor Subtypes. *Handbook Exp. Pharmacol.* 208, 3–28. doi:10.1007/978-3-642-23274-9_1
- Enevoldsen, F. C., Sahana, J., Wehland, M., Grimm, D., Infanger, M., and Krüger, M. (2020). Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *Jcm* 9 (3), 824. doi:10.3390/jcm9030824
- Eng, J., Andrews, P. C., Kleinman, W. A., Singh, L., and Raufman, J. P. (1990). Purification and Structure of Exendin-3, a New Pancreatic Secretagogue Isolated from *Heloderma horridum* Venom. *J. Biol. Chem.* 265 (33), 20259–20262. doi:10.1016/s0021-9258(17)30498-2
- Eng, J., Kleinman, W. A., Singh, L., Singh, G., and Raufman, J. P. (1992). Isolation and Characterization of Exendin-4, an Exendin-3 Analogue, from *Heloderma suspectum* Venom. Further Evidence for an Exendin Receptor on Dispersed Acini from guinea Pig Pancreas. *J. Biol. Chem.* 267 (11), 7402–7405. doi:10.1016/s0021-9258(18)42531-8
- Espino, S. S., Robinson, S. D., Safavi-Hemami, H., Gajewiak, J., Yang, W., Olivera, B. M., et al. (2018). Conopeptides Promote Itch through Human Itch Receptor hMgprX1. *Toxicon* 154, 28–34. doi:10.1016/j.toxicon.2018.09.002
- Fatima, M. T., Ahmed, I., Fakhro, K. A., and Akil, A. A. S. (2021). Melanocortin-4 Receptor Complexity in Energy Homeostasis/obesity and Drug Development Strategies. *Diabetes Obes. Metab.* doi:10.1111/dom.14618
- Ferdoussi, M., Abdelli, S., Yang, J.-Y., Cornu, M., Niederhauser, G., Favre, D., et al. (2008). Exendin-4 Protects β -Cells from Interleukin-1 β -Induced Apoptosis by Interfering with the C-Jun NH2-Terminal Kinase Pathway. *Diabetes* 57 (5), 1205–1215. doi:10.2337/db07-1214
- Flordellis, C., Manolis, A., Scheinin, M., and Paris, H. (2004). Clinical and Pharmacological Significance of $\alpha 2$ -adrenoceptor Polymorphisms in Cardiovascular Diseases. *Int. J. Cardiol.* 97 (3), 367–372. doi:10.1016/j.ijcard.2003.10.014
- Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Blanchet, G., Vera, L., Gilles, N., Ménez, R., et al. (2012). Engineering of Three-finger Fold Toxins Creates Ligands with Original Pharmacological Profiles for Muscarinic and Adrenergic Receptors. *PLoS One* 7 (6), e39166. doi:10.1371/journal.pone.0039166
- Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Marquer, C., Ménez, A., and Servent, D. (2006). Identification of Various Allosteric Interaction Sites on M1 Muscarinic Receptor Using 125I-Met35-Oxidized Muscarinic Toxin 7. *Mol. Pharmacol.* 69 (5), 1641–1651. doi:10.1124/mol.105.020883
- Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Marquer, C., Stura, E., Birdsall, N. J. M., and Servent, D. (2008). Different Interactions between MT7 Toxin and the Human Muscarinic M1 Receptor in its Free and N-Methylscopolamine-Occupied States. *Mol. Pharmacol.* 74 (6), 1554–1563. doi:10.1124/mol.108.050773
- Fukuroda, T., Fujikawa, T., Ozaki, S., Ishikawa, K., Yano, M., and Nishikibe, M. (1994). Clearance of Circulating Endothelin-1 by ETB Receptors in Rats. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 199 (3), 1461–1465. doi:10.1006/bbrc.1994.1395
- Furman, B. L. (2012). The Development of Byetta (Exenatide) from the Venom of the Gila Monster as an Anti-diabetic Agent. *Toxicon* 59 (4), 464–471. doi:10.1016/j.toxicon.2010.12.016
- Garona, J., Pifano, M., Ripoll, G., and Alonso, D. F. (2020). Development and Therapeutic Potential of Vasopressin Synthetic Analog [V4Q5]dDAVP as a Novel Anticancer Agent. *Vitamins Horm.* 113, 259–289. doi:10.1016/bs.vh.2019.08.010
- Gilles, N., and Servent, D. (2014). The European FP7 Venomics Project. *Future Med. Chem.* 6 (15), 1611–1612. doi:10.4155/fmc.14.85
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2001). The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiol. Rev.* 81 (2), 629–683. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.629
- Giribaldi, J., Ragnarsson, L., Pujante, T., Enjalbal, C., Wilson, D., Daly, N. L., et al. (2020). Synthesis, Pharmacological and Structural Characterization of Novel Conopressins from *Conus Miliaris*. *Mar. Drugs* 18 (3), 150. doi:10.3390/md18030150
- Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L. I., Hunkapiller, M., and Hood, L. (1981). Porcine Pituitary Dynorphin: Complete Amino Acid Sequence of the Biologically Active Heptadecapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 (11), 7219–7223. doi:10.1073/pnas.78.11.7219
- Gulati, A., Agrawal, N., Vibha, D., Misra, U. K., Paul, B., Jain, D., et al. (2021). Safety and Efficacy of Sovateltide (IRL-1620) in a Multicenter Randomized Controlled Clinical Trial in Patients with Acute Cerebral Ischemic Stroke. *CNS Drugs* 35 (1), 85–104. doi:10.1007/s40263-020-00783-9

- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., and Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR Drug Discovery: New Agents, Targets and Indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (12), 829–842. doi:10.1038/nrd.2017.178
- Hayashi, M. A. F., Ligny-Lemaire, C., Wollberg, Z., Wery, M., Galat, A., Ogawa, T., et al. (2004). Long-sarafotoxins: Characterization of a New Family of Endothelin-like Peptides. *Peptides* 25 (8), 1243–1251. doi:10.1016/j.peptides.2004.05.010
- Hein, L. (2006). Adrenoceptors and Signal Transduction in Neurons. *Cell Tissue Res* 326 (2), 541–551. doi:10.1007/s00441-006-0285-2
- Hgmd (2021). HGMD® Gene Result. Available at: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GBA> (Accessed on 9 14, 2021).
- Hogan, K., and Markos, F. (2007). Muscarinic Type 1 Receptors Mediate Part of Nitric Oxide's Vagal Facilitatory Effect in the Isolated Innervated Rat Right Atrium. *Nitric Oxide* 16 (1), 110–117. doi:10.1016/j.niox.2006.05.005
- Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Giaid, A., et al. (1994). Targeted and Natural (Piebald-lethal) Mutations of Endothelin-B Receptor Gene Produce Megacolon Associated with Spotted Coat Color in Mice. *Cell* 79 (7), 1267–1276. doi:10.1016/0092-8674(94)90017-5
- Ishizuka, Y., Abe, H., Tanoue, A., Kannan, H., and Ishida, Y. (2010). Involvement of Vasopressin V1b Receptor in Anti-anxiety Action of SSRI and SNRI in Mice. *Neurosci. Res.* 66 (3), 233–237. doi:10.1016/j.neures.2009.11.004
- Izume, T., Miyauchi, H., Shihoya, W., and Nureki, O. (2020). Crystal Structure of Human Endothelin ETB Receptor in Complex with Sarafotoxin S6b. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 528 (2), 383–388. doi:10.1016/j.bbrc.2019.12.091
- Jolkkonen, M., Adem, A., Hellman, U., Wernstedt, C., and Karlsson, E. (1995). A Snake Toxin against Muscarinic Acetylcholine Receptors: Amino Acid Sequence, Subtype Specificity and Effect on guinea-pig Ileum. *Toxicon* 33 (4), 399–410. doi:10.1016/0041-0101(94)00102-e
- Jolkkonen, M., van Giersbergen, P. L. M., Hellman, U., Wernstedt, C., and Karlsson, E. (1994). A Toxin from the green mamba *Dendroaspis Angusticeps*: Amino Acid Sequence and Selectivity for Muscarinic M4 Receptors. *FEBS Lett.* 352 (1), 91–94. doi:10.1016/0014-5793(94)00933-3
- Kaas, Q., Yu, R., Jin, A.-H., Dutertre, S., and Craik, D. J. (2012). ConoServer: Updated Content, Knowledge, and Discovery Tools in the Conopeptide Database. *Nucleic Acids Res.* 40, D325–D330. doi:10.1093/nar/gkr886
- Karlsson, E., Risinger, C., Jolkkonen, M., Wernstedt, C., and Adem, A. (1991). Amino Acid Sequence of a Snake Venom Toxin that Binds to the Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Toxicon* 29 (4), 521–526. doi:10.1016/0041-0101(91)90027-O
- Kern, S. E., Allen, J., Wagstaff, J., Shafer, S. L., and Yaksh, T. (2007). The Pharmacokinetics of the Conopeptide Contulakin-G (CGX-1160) after Intrathecal Administration: An Analysis of Data from Studies in Beagles. *Anesth. Analgesia* 104 (6), 1514–1520. doi:10.1213/01.ane.0000262038.58546.e6
- Kessler, P., Marchot, P., Silva, M., and Servent, D. (2017). The Three-finger Toxin Fold: A Multifunctional Structural Scaffold Able to Modulate Cholinergic Functions. *J. Neurochem.* 142 (Suppl. 2), 7–18. doi:10.1111/jnc.13975
- Kloog, Y., Ambar, I., Sokolovsky, M., Kochva, E., Wollberg, Z., and Bdolah, A. (1988). Sarafotoxin, a Novel Vasoconstrictor Peptide: Phosphoinositide Hydrolysis in Rat Heart and Brain. *Science* 242 (4876), 268–270. doi:10.1126/science.2845579
- Knudsen, L. B., Nielsen, P. F., Huusfeldt, P. O., Johansen, N. L., Madsen, K., Pedersen, F. Z., et al. (2000). Potent Derivatives of Glucagon-like Peptide-1 with Pharmacokinetic Properties Suitable for once Daily Administration. *J. Med. Chem.* 43 (9), 1664–1669. doi:10.1021/jm9909645
- Kobayashi, S., Tang, R., Wang, B., Opgenorth, T., Langenstroer, P., Shapiro, E., et al. (1994). Binding and Functional Properties of Endothelin Receptor Subtypes in the Human Prostate. *Mol. Pharmacol.* 45 (2), 306–311.
- Konshina, A. G., Boldyrev, I. A., Utkin, Y. N., Ome'kov, A. V., and Efremov, R. G. (2011). Snake Cytotoxins Bind to Membranes via Interactions with Phosphatidylserine Head Groups of Lipids. *PLoS One* 6 (4), e19064. doi:10.1371/journal.pone.0019064
- Koob, G. F., and Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacol.* 35 (1), 217–238. doi:10.1038/npp.2009.110
- Kozuka, M., Ito, T., Hirose, S., Takahashi, K., and Hagiwara, H. (1989). Endothelin Induces Two Types of Contractions of Rat Uterus: Phasic Contractions by Way of Voltage-dependent Calcium Channels and Developing Contractions through a Second Type of Calcium Channels. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 159 (1), 317–323. doi:10.1016/0006-291x(89)92440-6
- Kukhtina, V. V., Weise, C., Muranova, T. A., Starkov, V. G., Franke, P., Hucho, F., et al. (2000). Muscarinic Toxin-like Proteins from Cobra Venom. *Eur. J. Biochem.* 267 (23), 6784–6789. doi:10.1046/j.1432-1033.2000.01775.x
- Kukkonen, A., Peräkylä, M., Åkerman, K. E. O., and Näsman, J. (2004). Muscarinic Toxin 7 Selectivity Is Dictated by Extracellular Receptor Loops. *J. Biol. Chem.* 279 (49), 50923–50929. doi:10.1074/jbc.M406424200
- Lahav, R., Ziller, C., Dupin, E., and Le Douarin, N. M. (1996). Endothelin 3 Promotes Neural Crest Cell Proliferation and Mediates a Vast Increase in Melanocyte Number in Culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (9), 3892–3897. doi:10.1073/pnas.93.9.3892
- Langmead, C. J., Watson, J., and Reavill, C. (2008). Muscarinic Acetylcholine Receptors as CNS Drug Targets. *Pharmacol. Ther.* 117 (2), 232–243. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.09.009
- Lauridsen, L. P., Laustsen, A. H., Lomonte, B., and Gutiérrez, J. M. (2016). Toxicovenomics and Antivenom Profiling of the Eastern green Mamba Snake (*Dendroaspis Angusticeps*). *J. Proteomics* 136, 248–261. doi:10.1016/j.jpro.2016.02.003
- Laustsen, A. H., Lomonte, B., Lohse, B., Fernández, J., and Gutiérrez, J. M. (2015). Unveiling the Nature of Black Mamba (*Dendroaspis Polylepis*) Venom through Venomics and Antivenom Immunoprofiling: Identification of Key Toxin Targets for Antivenom Development. *J. Proteomics* 119, 126–142. doi:10.1016/j.jpro.2015.02.002
- Lazdunski, M. (1983). Apamin, a Neurotoxin Specific for One Class of Ca²⁺-dependent K⁺ Channels. *Cell Calcium* 4 (5–6), 421–428. doi:10.1016/0143-4160(83)90018-0
- LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., et al. (2001). Identification of an Angiogenic Mitogen Selective for Endocrine Gland Endothelium. *Nature* 412 (6850), 877–884. doi:10.1038/35091000
- Lee, H.-K., Zhang, L., Smith, M. D., Walewska, A., Vellore, N. A., Baron, R., et al. (2015). A marine Analgesic Peptide, Contulakin-G, and Neurotensin Are Distinct Agonists for Neurotensin Receptors: Uncovering Structural Determinants of Desensitization Properties. *Front. Pharmacol.* 6, 11. doi:10.3389/fphar.2015.00011
- Leonard, M. G., and Gulati, A. (2013). Endothelin B Receptor Agonist, IRL-1620, Enhances Angiogenesis and Neurogenesis Following Cerebral Ischemia in Rats. *Brain Res.* 1528, 28–41. doi:10.1016/j.brainres.2013.07.002
- Levit, A., Yarnitzky, T., Wiener, A., Meidan, R., and Niv, M. Y. (2011). Modeling of Human Prokineticin Receptors: Interactions with Novel Small-Molecule Binders and Potential Off-Target Drugs. *PLoS ONE* 6 (11), e27990. doi:10.1371/journal.pone.0027990
- Li, M., Bullock, C. M., Knauer, D. J., Ehlert, F. J., and Zhou, Q. Y. (2001). Identification of Two Prokineticin cDNAs: Recombinant Proteins Potently Contract Gastrointestinal Smooth Muscle. *Mol. Pharmacol.* 59 (4), 692–698. doi:10.1124/mol.59.4.692
- Liang, J. S., Carsi-Gabrenas, J., Krajewski, J. L., McCafferty, J. M., Purkerson, S. L., Santiago, M. P., et al. (1996). Anti-muscarinic Toxins from *Dendroaspis Angusticeps*. *Toxicon* 34 (11–12), 1257–1267. doi:10.1016/s0041-0101(96)00109-2
- Liang, Y.-L., Khoshouei, M., Glukhova, A., Furness, S. G. B., Zhao, P., Clydesdale, L., et al. (2018). Phase-plate Cryo-EM Structure of a Biased Agonist-Bound Human GLP-1 Receptor-Gs Complex. *Nature* 555 (7694), 121–125. doi:10.1038/nature25773
- Lima, V., Mueller, A., Kamikihara, S. Y., Raymundi, V., Alewood, D., Lewis, R. J., et al. (2005). Differential Antagonism by Conotoxin p-TIA of Contractions Mediated by Distinct α 1-adrenoceptor Subtypes in Rat Vas Deferens, Spleen and Aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 508 (1–3), 183–192. doi:10.1016/j.ejphar.2004.12.011
- Lin, D. C.-H., Bullock, C. M., Ehlert, F. J., Chen, J.-L., Tian, H., and Zhou, Q.-Y. (2002). Identification and Molecular Characterization of Two Closely Related G Protein-Coupled Receptors Activated by Prokineticins/endocrine Gland Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 277 (22), 19276–19280. doi:10.1074/jbc.M202139200
- Lippens, G., Najib, J., Wodak, S. J., and Tartar, A. (1995). NMR Sequential Assignments and Solution Structure of Chlorotoxin, a Small Scorpion Toxin

- that Blocks Chloride Channels. *Biochemistry* 34 (1), 13–21. doi:10.1021/bi00001a003
- Lu, S., He, X., Yang, Z., Chai, Z., Zhou, S., Wang, J., et al. (2021). Activation Pathway of a G Protein-Coupled Receptor Uncovers Conformational Intermediates as Targets for Allosteric Drug Design. *Nat. Commun.* 12, 4721. doi:10.1038/s41467-021-25020-9
- Luo, S., Christensen, S., Zhangsun, D., Wu, Y., Hu, Y., Zhu, X., et al. (2013). A Novel Inhibitor of $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Acetylcholine Receptors from *Conus* Vexillum Delineates a New Conotoxin Superfamily. *PLoS One* 8 (1), e54648. doi:10.1371/journal.pone.0054648
- Luo, S., Zhangsun, D., Zhang, B., Chen, X., and Feng, J. (2006). Direct cDNA Cloning of Novel Conotoxins of the T-Superfamily from *Conus* Textile. *Peptides* 27 (11), 2640–2646. doi:10.1016/j.peptides.2006.05.002
- Lyukmanova, E. N., Shenkarev, Z. O., Shulepko, M. A., Paramonov, A. S., Chugunov, A. O., Janickova, H., et al. (2015). Structural Insight into Specificity of Interactions between Nonconventional Three-finger Weak Toxin from *Naja Kaouthia* (WTX) and Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Biol. Chem.* 290 (39), 23616–23630. doi:10.1074/jbc.M115.656595
- Madsbad, S. (2016). Review of Head-To-Head Comparisons of Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists. *Diabetes Obes. Metab.* 18 (4), 317–332. doi:10.1111/dom.12596
- Maeda, S., Xu, J., N. Kadji, F. M., Clark, M. J., Zhao, J., Tsutsumi, N., et al. (2020). Structure and Selectivity Engineering of the M1 Muscarinic Receptor Toxin Complex. *Science* 369, 161–167. doi:10.1126/science.aax2517
- Mahjoub, Y., Malaquin, S., Abou Arab, O., Mourier, G., Lorne, E., Salomon, A., et al. (2017). Echocardiographic Evaluation of the Acute Cardiovascular Effects of an Endothelin-like Peptide Extracted from the Venom of *Atractaspis Irregularis*. *Cardiovasc. Toxicol.* 17 (2), 208–214. doi:10.1007/s12012-016-9376-9
- Mahjoub, Y., Malaquin, S., Mourier, G., Lorne, E., Abou Arab, O., Massy, Z. A., et al. (2015). Short- versus Long-Sarafotoxins: Two Structurally Related Snake Toxins with Very Different *In Vivo* Haemodynamic Effects. *PLoS One* 10 (7), e0132864. doi:10.1371/journal.pone.0132864
- Maïga, A., Dupont, M., Blanchet, G., Marcon, E., Gilquin, B., Servent, D., et al. (2014). Molecular Exploration of the $\alpha 1A$ -adrenoceptor Orthosteric Site: Binding Site Definition for Epinephrine, HEAT and Prazosin. *FEBS Lett.* 588 (24), 4613–4619. doi:10.1016/j.febslet.2014.10.033
- Maïga, A., Merlin, J., Marcon, E., Rouget, C., Larregola, M., Gilquin, B., et al. (2013a). Orthosteric Binding of ρ -Da1a, a Natural Peptide of Snake Venom Interacting Selectively with the $\alpha 1A$ -Adrenoceptor. *PLoS One* 8 (7), e68841. doi:10.1371/journal.pone.0068841
- Maïga, A., Mourier, G., Quinton, L., Rouget, C., Gales, C., Denis, C., et al. (2012). G Protein-Coupled Receptors, an Unexploited Animal Toxin Targets: Exploration of green Mamba Venom for Novel Drug Candidates Active against Adrenoceptors. *Toxicon* 59 (4), 487–496. doi:10.1016/j.toxicon.2011.03.009
- Maïga, A., Vera, L., Marchetti, C., Lorphelin, A., Bellanger, L., Mourier, G., et al. (2013b). Crystallization of Recombinant green Mamba ρ -Da1a Toxin during a Lyophilization Procedure and its Structure Determination. *Acta Cryst. Sect F* 69 (Pt 6), 704–709. doi:10.1107/S1744309113011470
- Maillo, M., Aguilar, M. B., Lopéz-Vera, E., Craig, A. G., Bulaj, G., Olivera, B. M., et al. (2002). Conorfamide, a *Conus* Venom Peptide Belonging to the RFamide Family of Neuropeptides. *Toxicon* 40 (4), 401–407. doi:10.1016/s0041-0101(01)00176-3
- Makita, N., Manaka, K., Sato, J., and Iiri, T. (2020). V2 Vasopressin Receptor Mutations. *Vitamins Horm.* 113, 79–99. doi:10.1016/bs.vh.2019.08.012
- Malaquin, S., Bayat, S., Abou Arab, O., Mourier, G., Lorne, E., Kamel, S., et al. (2016). Respiratory Effects of Sarafotoxins from the Venom of Different *Atractaspis* Genus Snake Species. *Toxins* 8 (7), 215. doi:10.3390/toxins8070215
- Mangel, A. W., and Williams, V. S. (2010). Asimadoline in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Expert Opin. Investig. Drugs* 19, 1257–1264. doi:10.1517/13543784.2010.515209
- Mann, R., Nasr, N., Sinfield, J., Paci, E., and Donnelly, D. (2010). The Major Determinant of Exendin-4/glucagon-like Peptide 1 Differential Affinity at the Rat Glucagon-like Peptide 1 Receptor N-Terminal Domain Is a Hydrogen Bond from SER-32 of Exendin-4. *Br. J. Pharmacol.* 160 (8), 1973–1984. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00834.x
- Marino, M. J., Rouse, S. T., Levey, A. I., Potter, L. T., and Conn, P. J. (1998). Activation of the Genetically Defined M1 Muscarinic Receptor Potentiates N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Currents in Hippocampal Pyramidal Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (19), 11465–11470. doi:10.1073/pnas.95.19.11465
- Marquer, C., Fruchart-Gaillard, C., Letellier, G., Marcon, E., Mourier, G., Zinn-Justin, S., et al. (2011). Structural Model of Ligand-G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Complex Based on Experimental Double Mutant Cycle Data. *J. Biol. Chem.* 286 (36), 31661–31675. doi:10.1074/jbc.M111.261404
- Martin, S., Navarro, V., Vincent, J. P., and Mazella, J. (2002). Neurotensin Receptor-1 and -3 Complex Modulates the Cellular Signaling of Neurotensin in the HT29 Cell Line. *Gastroenterology* 123 (4), 1135–1143. doi:10.1053/gast.2002.36000
- Masuda, Y., Takatsu, Y., Terao, Y., Kumano, S., Ishibashi, Y., Suenaga, M., et al. (2002). Isolation and Identification of EG-VEGF/prokineticins as Cognate Ligands for Two Orphan G-Protein-Coupled Receptors. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 293 (1), 396–402. doi:10.1016/S0006-291X(02)00239-5
- Max, S. I., Liang, J. S., and Potter, L. T. (1993b). Stable Allosteric Binding of M1-Toxin to M1 Muscarinic Receptors. *Mol. Pharmacol.* 44 (6), 1171–1175.
- Max, S., Liang, J., and Potter, L. (1993a). Purification and Properties of M1-Toxin, a Specific Antagonist of M1 Muscarinic Receptors. *J. Neurosci.* 13 (10), 4293–4300. doi:10.1523/jneurosci.13-10-04293.1993
- Meyer-Lindenberg, A., Domes, G., Kirsch, P., and Heinrichs, M. (2011). Oxytocin and Vasopressin in the Human Brain: Social Neuropeptides for Translational Medicine. *Nat. Rev. Neurosci.* 12 (9), 524–538. doi:10.1038/nrn3044
- Mintz, I. M., Venema, V. J., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Bean, B. P., and Adams, M. E. (1992). P-type Calcium Channels Blocked by the Spider Toxin ω -Aga-IVA. *Nature* 355 (6363), 827–829. doi:10.1038/355827a0
- Mollay, C., Wechselberger, C., Mignogna, G., Negri, L., Melchiorri, P., Barra, D., et al. (1999). Bv8, a Small Protein from Frog Skin and its Homologue from Snake Venom Induce Hyperalgesia in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* 374 (2), 189–196. doi:10.1016/s0014-2999(99)00229-0
- Montrose-Rafizadeh, C., Avdonin, P., Garant, M. J., Rodgers, B. D., Kole, S., Yang, H., et al. (1999). Pancreatic Glucagon-like Peptide-1 Receptor Couples to Multiple G Proteins and Activates Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Chinese Hamster Ovary Cells*. *Endocrinology* 140 (3), 1132–1140. doi:10.1210/endo.140.3.6550
- Mourier, G., Dutertre, S., Fruchart-Gaillard, C., Ménez, A., and Servent, D. (2003). Chemical Synthesis of MT1 and MT7 Muscarinic Toxins: Critical Role of Arg-34 in Their Interaction with M1 Muscarinic Receptor. *Mol. Pharmacol.* 63 (1), 26–35. doi:10.1124/mol.63.1.26
- Mourier, G., Hajji, M., Cordier, F., Zorba, A., Gao, X., Coskun, T., et al. (2012). Pharmacological and Structural Characterization of Long-Sarafotoxins, a New Family of Endothelin-like Peptides: Role of the C-Terminus Extension. *Biochimie* 94 (2), 461–470. doi:10.1016/j.biochi.2011.08.014
- Nagao, S., Kugita, M., Yoshihara, D., and Yamaguchi, T. (2012). Animal Models for Human Polycystic Kidney Disease. *Exp. Anim.* 61 (5), 477–488. doi:10.1538/expanim.61.477
- Nair, D. G., Fry, B. G., Alewood, P., Kumar, P. P., and Kini, R. M. (2007). Antimicrobial Activity of Omwaprin, a New Member of the Waprin Family of Snake Venom Proteins. *Biochem. J.* 402 (Pt 1), 93–104. doi:10.1042/BJ20060318
- Nakajima, K., Kubo, S., Kumagaya, S.-i., Nishio, H., Tsunemi, M., Inui, T., et al. (1989). Structure-activity Relationship of Endothelin: Importance of Charged Groups. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 163 (1), 424–429. doi:10.1016/0006-291x(89)92153-0
- Näreoja, K., and Näsman, J. (2012). Selective Targeting of G-Protein-Coupled Receptor Subtypes with Venom Peptides. *Acta Physiol. (Oxford, England)* 204 (2), 186–201. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02305.x
- Nauck, M. A., Quast, D. R., Wefers, J., and Meier, J. J. (2021). GLP-1 Receptor Agonists in the Treatment of Type 2 Diabetes - State-Of-The-Art. *Mol. Metab.* 46, 101102. doi:10.1016/j.molmet.2020.101102
- Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., and Melchiorri, P. (2007). Bv8/Prokineticin Proteins and Their Receptors. *Life Sci.* 81 (14), 1103–1116. doi:10.1016/j.lfs.2007.08.011
- Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M., Prickett, K. S., and Andersen, N. H. (2001). Exendin-4 and Glucagon-Like-Peptide-1: NMR Structural Comparisons in the

- Solution and Micelle-Associated States. *Biochemistry* 40 (44), 13188–13200. doi:10.1021/bi010902s
- Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B., and Nisen, P. (2003). The Endothelin axis: Emerging Role in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3 (2), 110–116. doi:10.1038/nrc990
- Nemeroff, C. B. (1980). Neurotensin: Perchance an Endogenous Neuroleptic? *Biol. Psychiatry* 15 (2), 283–302.
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79 (3), 629–661. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055
- Nickla, D. L., Yusupova, Y., and Totonelly, K. (2015). The Muscarinic Antagonist MT3 Distinguishes between Form Deprivation- and Negative Lens-Induced Myopia in Chicks. *Curr. Eye Res.* 40 (9), 962–967. doi:10.3109/02713683.2014.967870
- Nielsen, D. B., Dykert, J., Rivier, J. E., and McIntosh, J. M. (1994). Isolation of Lys-Conopressin-G from the Venom of the Worm-Hunting Snail, *Conus Imperialis*. *Toxicon* 32 (7), 845–848. doi:10.1016/0041-0101(94)90009-4
- Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., and Hayashi, K. (1994). The Two Subunits of a Phospholipase A2 Inhibitor from the Plasma of Thailand Cobra Having Structural Similarity to Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor and LY-6 Related Proteins. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 204 (3), 1212–1218. doi:10.1006/bbrc.1994.2592
- Olianas, M. C., Adem, A., Karlsson, E., and Onali, P. (1996). Rat Striatal Muscarinic Receptors Coupled to the Inhibition of Adenylyl Cyclase Activity: Potent Block by the Selective M4 Ligand Muscarinic Toxin 3 (MT3). *Br. J. Pharmacol.* 118 (2), 283–288. doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15400.x
- Olianas, M. C., Maullu, C., Adem, A., Mulugeta, E., Karlsson, E., and Onali, P. (2000). Inhibition of Acetylcholine Muscarinic M1 Receptor Function by the M1-selective Ligand Muscarinic Toxin 7 (MT-7). *Br. J. Pharmacol.* 131 (3), 447–452. doi:10.1038/sj.bjp.0703606
- Osumi, Y., Nagasaka, Y., WangFu, L. H., Fu, L. H., and Fujiwara, M. (1978). Inhibition of Gastric Acid Secretion and Mucosal Blood Flow Induced by Intraventricularly Applied Neurotensin in Rats. *Life Sci.* 23 (23), 2275–2280. doi:10.1016/0024-3205(78)90192-3
- Palea, S., Maiga, A., Guilloteau, V., Rekek, M., Guérard, M., Rouget, C., et al. (2013). Effects of ρ -Da1a Peptidic α 1A-adrenoceptor Antagonist in Human Isolated Prostatic Adenoma and Anaesthetized Rats. *Br. J. Pharmacol.* 168 (3), 618–631. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02231.x
- Patterson, J. T., Ottaway, N., Gelfanov, V. M., Smiley, D. L., Perez-Tilve, D., Pfluger, P. T., et al. (2011). A Novel Human-Based Receptor Antagonist of Sustained Action Reveals Body Weight Control by Endogenous GLP-1. *ACS Chem. Biol.* 6 (2), 135–145. doi:10.1021/cb1002015
- Peigneur, S., Billen, B., Derua, R., Waelkens, E., Debaveye, S., Béress, L., et al. (2011). A Bifunctional Sea Anemone Peptide with Kunitz Type Protease and Potassium Channel Inhibiting Properties. *Biochem. Pharmacol.* 82 (1), 81–90. doi:10.1016/j.bcp.2011.03.023
- Petrel, C., Hocking, H. G., Reynaud, M., Upert, G., Favreau, P., Biass, D., et al. (2013). Identification, Structural and Pharmacological Characterization of τ -CnVA, a Conopeptide that Selectively Interacts with Somatostatin Sst3 Receptor. *Biochem. Pharmacol.* 85 (11), 1663–1671. doi:10.1016/j.bcp.2013.03.019
- Pharmazz, Inc. (2021). *A Prospective, Multicentric, Randomized, Double-Blind, Parallel, Phase III Clinical Study To Assess Efficacy Of PMZ-1620 along with Standard Treatment In Patients Of Acute Ischemic Stroke* (Clinical Trial Registration No. NCT04047563). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04047563>.
- Postina, R., Kojro, E., and Fahrenholz, F. (1996). Separate Agonist and Peptide Antagonist Binding Sites of the Oxytocin Receptor Defined by Their Transfer into the V2 Vasopressin Receptor. *J. Biol. Chem.* 271 (49), 31593–31601. doi:10.1074/jbc.271.49.31593
- Quinton, L., Girard, E., Maiga, A., Rekek, M., Lluell, P., Masuyer, G., et al. (2010). Isolation and Pharmacological Characterization of AdTx1, a Natural Peptide Displaying Specific Insurmountable Antagonism of the α 1A-adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.* 159 (2), 316–325. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00532.x
- Ragnarsson, L., Wang, C.-I. A., Andersson, A., Fajarningsih, D., Monks, T., Brust, A., et al. (2013). Conopeptide ρ -TIA Defines a New Allosteric Site on the Extracellular Surface of the α 1B-Adrenoceptor. *J. Biol. Chem.* 288 (3), 1814–1827. doi:10.1074/jbc.M112.430785
- Rajagopal, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R. J. (2010). Teaching Old Receptors New Tricks: Biasing Seven-Transmembrane Receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (5), 373–386. doi:10.1038/nrd3024
- Rajagopalan, N., Pung, Y. F., Zhu, Y. Z., Wong, P. T. H., Kumar, P. P., and Kini, R. M. (2007). β -Cardiotoxin: a New Three-finger Toxin from Ophiophagus Hannah (king Cobra) Venom with Beta-blocker Activity. *FASEB j.* 21 (13), 3685–3695. doi:10.1096/fj.07-8658com
- Rajaian Pushpabai, R., Wilson Alphonse, C. R., Mani, R., Arun Apte, D., and Franklin, J. B. (2021). Diversity of Conopeptides and Conoenzymes from the Venom Duct of the Marine Cone Snail *Conus Bayani* as Determined from Transcriptomic and Proteomic Analyses. *Mar. Drugs* 19 (4), 202. doi:10.3390/md19040202
- Raufman, J. P., Jensen, R. T., Sutliff, V. E., Pisano, J. J., and Gardner, J. D. (1982). Actions of Gila Monster Venom on Dispersed Acini from guinea Pig Pancreas. *Am. J. Physiology-Gastrointestinal Liver Physiol.* 242 (5), G470–G474. doi:10.1152/ajpgi.1982.242.5.G470
- Reynaud, S., Ciolek, J., Degueldre, M., Saez, N. J., Sequeira, A. F., Duhoo, Y., et al. (2020). A Venomics Approach Coupled to High-Throughput Toxin Production Strategies Identifies the First Venom-Derived Melanocortin Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* 63 (15), 8250–8264. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00485
- Ring, R. (2005). The central Vasopressinergic System: Examining the Opportunities for Psychiatric Drug Development. *Cpd* 11 (2), 205–225. doi:10.2174/1381612053382241
- Rioux, F., Quirion, R., St-Pierre, S., Regoli, D., Jolicoeur, F. B., Bélanger, F., et al. (1981). The Hypotensive Effect of Centrally Administered Neurotensin in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* 69 (3), 241–247. doi:10.1016/0014-2999(81)90469-6
- Römer, D., Büscher, H., Hill, R. C., Maurer, R., Petcher, T. J., Welle, H. B., et al. (1980). Bremazocine: A Potent, Long-Acting Opiate Kappa-Agonist. *Life Sci.* 27 (11), 971–978. doi:10.1016/0024-3205(80)90107-1
- Rosanò, L., Spinella, F., and Bagnato, A. (2013). Endothelin 1 in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 13 (9), 637–651. doi:10.1038/nrc3546
- Runge, S., Schimmer, S., Oschmann, J., Schiødt, C. B., Knudsen, S. M., Jeppesen, C. B., et al. (2007). Differential Structural Properties of GLP-1 and Exendin-4 Determine Their Relative Affinity for the GLP-1 Receptor N-Terminal Extracellular Domain. *Biochemistry* 46 (19), 5830–5840. doi:10.1021/bi062309m
- Runge, S., Thøgersen, H., Madsen, K., Lau, J., and Rudolph, R. (2008). Crystal Structure of the Ligand-Bound Glucagon-like Peptide-1 Receptor Extracellular Domain. *J. Biol. Chem.* 283 (17), 11340–11347. doi:10.1074/jbc.M708740200
- Sabbir, M. G., and Fernyhough, P. (2018). Muscarinic Receptor Antagonists Activate ERK-CREB Signaling to Augment Neurite Outgrowth of Adult Sensory Neurons. *Neuropharmacology* 143, 268–281. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.09.020
- Safavi-Hemami, H., Gajewiak, J., Karanth, S., Robinson, S. D., Ueberheide, B., Douglass, A. D., et al. (2015). Specialized Insulin Is Used for Chemical Warfare by Fish-Hunting Cone Snails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (6), 1743–1748. doi:10.1073/pnas.1423857112
- Saleh, A., Sabbir, M. G., Aghanoori, M.-R., Smith, D. R., Roy Chowdhury, S. K., Tessler, L., et al. (2020). Muscarinic Toxin 7 Signals via Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase β to Augment Mitochondrial Function and Prevent Neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 57 (6), 2521–2538. doi:10.1007/s12035-020-01900-x
- Sánchez, G., Coletti, N., Vázquez, P., Cerveñansky, C., Aguirre, A., Quillfeldt, J. A., et al. (2009b). Muscarinic Inhibition of Hippocampal and Striatal Adenylyl Cyclase Is Mainly Due to the M4 Receptor. *Neurochem. Res.* 34 (8), 1363–1371. doi:10.1007/s11064-009-9916-9
- Sánchez, G., de Oliveira Alvares, L., Oberholzer, M. V., Genro, B., Quillfeldt, J., da Costa, J. C., et al. (2009a). M4muscarinic Receptors Are Involved in Modulation of Neurotransmission at Synapses of Schaffer Collaterals on CA1 Hippocampal Neurons in Rats. *J. Neurosci. Res.* 87 (3), 691–700. doi:10.1002/jnr.21876
- Sánchez, M. L., and Coveñas, R. (2021). The Neurotensin System: A Target for Cancer Treatment. *Cmc* 28. doi:10.2174/0929867328666211027124328
- Sang, C. N., Barnabe, K. J., and Kern, S. E. (2016). Phase IA Clinical Trial Evaluating the Tolerability, Pharmacokinetics, and Analgesic Efficacy of an Intrathecal Administered Neurotensin A Analogue in Central Neuropathic

- Pain Following Spinal Cord Injury. *Clin. Pharmacol. Drug Development* 5 (4), 250–258. doi:10.1002/cpdd.253
- Sanggaard, K. W., Dyrland, T. F., Thomsen, L. R., Nielsen, T. A., Brøndum, L., Wang, T., et al. (2015). Characterization of the Gila Monster (*Heloderma suspectum* Suspectum) Venom Proteome. *J. Proteomics* 117, 1–11. doi:10.1016/j.jprot.2015.01.004
- Sanz, L., Pla, D., Pérez, A., Rodríguez, Y., Zavaleta, A., Salas, M., et al. (2016). Venomic Analysis of the Poorly Studied Desert Coral Snake, *Micrurus Tschudii* Tschudii, Supports the 3FTx/PLA2 Dichotomy across *Micrurus* Venoms. *Toxins* 8 (6), 178. doi:10.3390/toxins8060178
- Sapio, M. R., Iadarola, M. J., Loydpierson, A. J., Kim, J. J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., et al. (2020). Dynorphin and Enkephalin Opioid Peptides and Transcripts in Spinal Cord and Dorsal Root Ganglion during Peripheral Inflammatory Hyperalgesia and Allodynia. *The J. Pain* 21 (9–10), 988–1004. doi:10.1016/j.jpain.2020.01.001
- Sarret, P., Beaudet, A., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (1998). Regional and Cellular Distribution of Low Affinity Neurotensin Receptor mRNA in Adult and Developing Mouse Brain. *J. Comp. Neurol.* 394 (3), 344–356. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19980511)394:3<344:aid-cne6>3.0.co;2-1
- Schweitz, H., Bidard, J.-N., and Lazdunski, M. (1990). Purification and Pharmacological Characterization of Peptide Toxins from the Black Mamba (*Dendroaspis Polylepis*) Venom. *Toxicon* 28 (7), 847–856. doi:10.1016/s0041-0101(09)80007-x
- Schweitz, H., Pacaud, P., Diocot, S., Moinier, D., and Lazdunski, M. (1999). MIT1, a Black Mamba Toxin with a New and Highly Potent Activity on Intestinal Contraction. *FEBS Lett.* 461 (3), 183–188. doi:10.1016/s0014-5793(99)01459-3
- Segalas, I., Roumestand, C., Zinn-Justin, S., Gilquin, B., Menez, R., Menez, A., et al. (1995). Solution Structure of a green Mamba Toxin that Activates Muscarinic Acetylcholine Receptors, as Studied by Nuclear Magnetic Resonance and Molecular Modeling. *Biochemistry* 34 (4), 1248–1260. doi:10.1021/bi00004a019
- Servent, D., Blanchet, G., Mourier, G., Marquer, C., Marcon, E., and Fruchart-Gaillard, C. (2011). Muscarinic Toxins. *Toxicon* 58 (6–7), 455–463. doi:10.1016/j.toxicon.2011.08.004
- Servent, D., and Fruchart-Gaillard, C. (2009). Muscarinic Toxins: Tools for the Study of the Pharmacological and Functional Properties of Muscarinic Receptors. *J. Neurochem.* 109, 1193–1202. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06092.x
- Sharpe, I. A., Gehrmann, J., Loughnan, M. L., Thomas, L., Adams, D. A., Atkins, A., et al. (2001). Two New Classes of Conopeptides Inhibit the α 1-adrenoceptor and Noradrenaline Transporter. *Nat. Neurosci.* 4 (9), 902–907. doi:10.1038/nn0901-902
- Shen, W.-J., Yao, T., Kong, X., Williams, K. W., and Liu, T. (2017). Melanocortin Neurons: Multiple Routes to Regulation of Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta (Bba) - Mol. Basis Dis.* 1863 (10 Pt A), 2477–2485. doi:10.1016/j.bbadis.2017.05.007
- Shihoya, W., Izume, T., Inoue, A., Yamashita, K., Kadji, F. M. N., Hirata, K., et al. (2018). Crystal Structures of Human ETB Receptor Provide Mechanistic Insight into Receptor Activation and Partial Activation. *Nat. Commun.* 9 (1), 4711. doi:10.1038/s41467-018-07094-0
- Shihoya, W., Nishizawa, T., Okuta, A., Tani, K., Dohmae, N., Fujiyoshi, Y., et al. (2016). Activation Mechanism of Endothelin ETB Receptor by Endothelin-1. *Nature* 537 (7620), 363–368. doi:10.1038/nature19319
- Silvestre, R. A., Rodríguez-Gallardo, J., Egido, E. M., and Marco, J. (2003). Interrelationship Among Insulin, Glucagon and Somatostatin Secretory Responses to Exendin-4 in the Perfused Rat Pancreas. *Eur. J. Pharmacol.* 469 (1–3), 195–200. doi:10.1016/s0014-2999(03)01692-3
- Smith, J. J., Hill, J. M., Little, M. J., Nicholson, G. M., King, G. F., and Alewood, P. F. (2011). Unique Scorpion Toxin with a Putative Ancestral Fold Provides Insight into Evolution of the Inhibitor Cystine Knot Motif. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (26), 10478–10483. doi:10.1073/pnas.1103501108
- Soga, T., Matsumoto, Si., Oda, T., Saito, T., Hiyama, H., Takasaki, J., et al. (2002). Molecular Cloning and Characterization of Prokineticin Receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1579 (2–3), 173–179. doi:10.1016/s0167-4781(02)00546-8
- St-Gelais, F., Jomphe, C., and Trudeau, L. E. (2006). The Role of Neurotensin in central Nervous System Pathophysiology: What Is the Evidence? *J. Psychiatry Neurosci.* 31 (4), 229–245.
- Suzuki, S., Kawai, K., Ohashi, S., Mukai, H., and Yamashita, K. (1989). Comparison of the Effects of Various C-Terminal and N-Terminal Fragment Peptides of Glucagon-like Peptide-1 on Insulin and Glucagon Release from the Isolated Perfused Rat Pancreas*. *Endocrinology* 125 (6), 3109–3114. doi:10.1210/endo-125-6-3109
- Szczepanska-Sadowska, E., Wsol, A., Cudnoch-Jedrzejewska, A., and Żera, T. (2021). Complementary Role of Oxytocin and Vasopressin in Cardiovascular Regulation. *Ijms* 22 (21), 11465. doi:10.3390/ijms222111465
- Takasaki, C., Tamiya, N., Bdoah, A., Wollberg, Z., and Kochva, E. (1988). Sarafotoxins S6: Several Isotoxins from *Atractaspis Engaddensis* (Burrowing Asp) Venom that Affect the Heart. *Toxicon* 26 (6), 543–548. doi:10.1016/0041-0101(88)90234-6
- Tam, J. P., Liu, W., Zhang, J.-W., Galantino, M., Bertolero, F., Cristiani, C., et al. (1994). Alanine Scan of Endothelin: Importance of Aromatic Residues. *Peptides* 15 (4), 703–708. doi:10.1016/0196-9781(94)90099-x
- Tammela, T. (1997). Benign Prostatic Hyperplasia. *Drugs & Aging* 10 (5), 349–366. doi:10.2165/00002512-199710050-00004
- Thornton, K., and Gorenstein, D. G. (1994). Structure of Glucagon-like Peptide(7–36) Amide in a Dodecylphosphocholine Micelle as Determined by 2D NMR. *Biochemistry* 33 (12), 3532–3539. doi:10.1021/bi00178a009
- Toda, C., Santoro, A., Kim, J. D., and Diano, S. (2017). POMC Neurons: From Birth to Death. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 209–236. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034110
- Tomas, A., Jones, B., and Leech, C. (2020). New Insights into Beta-Cell GLP-1 Receptor and cAMP Signaling. *J. Mol. Biol.* 432 (5), 1347–1366. doi:10.1016/j.jmb.2019.08.009
- Underwood, C. R., Garibay, P., Knudsen, L. B., Hastrup, S., Peters, G. H., Rudolph, R., et al. (2010). Crystal Structure of Glucagon-like Peptide-1 in Complex with the Extracellular Domain of the Glucagon-like Peptide-1 Receptor. *J. Biol. Chem.* 285 (1), 723–730. doi:10.1074/jbc.M109.033829
- Undheim, E. A. B., Grimm, L. L., Low, C.-F., Morgenstern, D., Herzig, V., Zobel-Thropp, P., et al. (2015). Weaponization of a Hormone: Convergent Recruitment of Hyperglycemic Hormone into the Venom of Arthropod Predators. *Structure* 23 (7), 1283–1292. doi:10.1016/j.str.2015.05.003
- Undheim, E. A. B., Mobli, M., and King, G. F. (2016). Toxin Structures as Evolutionary Tools: Using Conserved 3D Folds to Study the Evolution of Rapidly Evolving Peptides. *BioEssays* 38 (6), 539–548. doi:10.1002/bies.201500165
- Vincent, J.-P., Mazella, J., and Kitabgi, P. (1999). Neurotensin and Neurotensin Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (7), 302–309. doi:10.1016/S0165-6147(99)01357-7
- Wechselberger, C., Puglisi, R., Engel, E., Lepperdinger, G., Boitani, C., and Kreil, G. (1999). The Mammalian Homologues of Frog Bv8 Are Mainly Expressed in Spermatoocytes. *FEBS Lett.* 462 (1–2), 177–181. doi:10.1016/s0014-5793(99)01473-8
- Weill Medical College of Cornell University (2017). Efficacy of Exenatide-LAR Alone and in Combination with Dapagliflozin in Overweight/Obese, Insulin Treated Patients with Uncontrolled Type 2 Diabetes (Clinical Trial Registration No. NCT02811484). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02811484>.
- Wen, S., Wilson, D. T. R., Kuruppu, S., Korsinczy, M. L. J., Hedrick, J., Pang, L., et al. (2005). Discovery of an MIT-like Atracotoxin Family: Spider Venom Peptides that Share Sequence Homology but Not Pharmacological Properties with AVIT Family Proteins. *Peptides* 26 (12), 2412–2426. doi:10.1016/j.peptides.2005.05.012
- Wess, J., Eglén, R. M., and Gautam, D. (2007). Muscarinic Acetylcholine Receptors: Mutant Mice Provide New Insights for Drug Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (9), 721–733. doi:10.1038/nrd2379
- Williams, J. A., Day, M., and Heavner, J. E. (2008). Ziconotide: An Update and Review. *Expert Opin. Pharmacother.* 9 (9), 1575–1583. doi:10.1517/14656566.9.9.1575
- Yamada, M., Yamada, M., and Richelson, E. (1995). Heterogeneity of Melanized Neurons Expressing Neurotensin Receptor Messenger RNA in the Substantia Nigra and the Nucleus Paranigralis of Control and Parkinson's Disease Brain. *Neuroscience* 64 (2), 405–417. doi:10.1016/0306-4522(94)00395-1

- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., et al. (1988). A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells. *Nature* 332 (6163), 411–415. doi:10.1038/332411a0
- Yang, D., Deuis, J., Dashevsky, D., Dobson, J., Jackson, T., Brust, A., et al. (2016). The Snake with the Scorpion's Sting: Novel Three-Finger Toxin Sodium Channel Activators from the Venom of the Long-Glanded Blue Coral Snake (*Calliophis Bivirgatus*). *Toxins* 8 (10), 303. doi:10.3390/toxins8100303
- Zhang, F., Zhang, C., Xu, X., Zhang, Y., Gong, X., Yang, Z., et al. (2019). Naja Atra Venom Peptide Reduces Pain by Selectively Blocking the Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.8. *J. Biol. Chem.* 294 (18), 7324–7334. doi:10.1074/jbc.RA118.007370
- Zhang, H., Shi, Y.-G., Woods, J. H., Watson, S. J., and Ko, M.-C. (2007). Central κ -opioid Receptor-Mediated Antidepressant-like Effects of Nor-Binaltorphimine: Behavioral and BDNF mRNA Expression Studies. *Eur. J. Pharmacol.* 570 (1), 89–96. doi:10.1016/j.ejphar.2007.05.045
- Zhang, H., Sturchler, E., Zhu, J., Nieto, A., Cistrone, P. A., Xie, J., et al. (2015). Autocrine Selection of a GLP-1R G-Protein Biased Agonist with Potent Antidiabetic Effects. *Nat. Commun.* 6, 8918. doi:10.1038/ncomms9918
- Zhang, Y., Sun, B., Feng, D., Hu, H., Chu, M., Qu, Q., et al. (2017). Cryo-EM Structure of the Activated GLP-1 Receptor in Complex with a G Protein. *Nature* 546 (7657), 248–253. doi:10.1038/nature22394
- Zhang, Y., Xu, J., Wang, Z., Zhang, X., Liang, X., and Civelli, O. (2012). BmK-YA, an Enkephalin-like Peptide in Scorpion Venom. *PLoS One* 7 (7), e40417. doi:10.1371/journal.pone.0040417

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 © 2022 Van Baelen, Robin, Kessler, Maïga, Gilles and Servent. 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.

Titre : Caractérisation de toxines animales innovantes pour l'étude fonctionnelle des récepteurs aux angiotensines

Mots clés : récepteur à l'angiotensine II, hypertension artérielle, BRET/FRET, toxines animales

Résumé : Au niveau physiopathologique, le système rénine-angiotensine (SRA) est un des systèmes responsables de la régulation de la fonction cardiovasculaire. Le principal médiateur du SRA est l'angiotensine II (AngII) ayant pour cible le récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT1), qui, une fois activé, est responsable entre autres d'une augmentation de la pression artérielle. Il existe d'autres effecteurs du SRA qui auraient des effets opposés à ceux de l'axe AngII/AT1. C'est le cas notamment des peptides angiotensine 1-7 ou alamandine qui cibleraient respectivement les récepteurs Mas et MrgD, ou encore du récepteur AT2, qui une fois activé par AngII entraîne des effets cardiobénéfiques. Ces récepteurs aux angiotensines sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), aux voies de signalisation intracellulaires multiples qui sont encore peu étudiés et dont les rôles biologiques ne sont pas parfaitement élucidés. L'idée est donc de mieux comprendre quels sont les mécanismes de transduction du signal impliquant ces récepteurs aux angiotensines par la découverte de nouveaux outils permettant leur étude fonctionnelle. Pour permettre l'étude de ces récepteurs, nous devons trouver des ligands innovants qui se lient au récepteur, de façon spécifique et sélective. Il existe une source de ligands prometteurs encore sous-étudiée qui répondrait à

ces critères : les toxines issues de venins d'animaux. Ces venins constituent une vaste bibliothèque de toxines peptidiques aux propriétés pharmacologiques particulières, avec une affinité et une sélectivité élevées pour leurs cibles chez leurs proies. Il existe peu de toxines ciblant les RCPG, et à ce jour, aucune n'est identifiée comme ciblant les récepteurs aux angiotensines. Nous avons donc criblé une banque de 900 toxines synthétiques sur le récepteur AT2. 3 toxines ont été mises en évidence avec des affinités de l'ordre du μM . Ces toxines ont été produites par synthèse peptidique sur phase solide et ont subi une étape d'oxydation pour former les ponts disulfure nécessaires à l'obtention de la forme finale fonctionnelle de la toxine. Ces toxines ont ensuite été caractérisées par des études de liaison sur les récepteurs AT2 puis AT1. Une toxine, A-CTX-cMila, présente une affinité 100 fois plus intéressante pour AT1 que pour AT2 (K_i de 300 nM). C'est une toxine cyclique de 7 résidus issue de *Conus miliaris*. La caractérisation pharmacologique s'est concentrée sur cette toxine et sur le récepteur AT1. Par des méthodes de dosages de seconds messagers par FRET et par utilisation de biosenseurs de BRET, nous avons montré que la toxine est un antagoniste compétitif du récepteur AT1. Elle bloque les voies Gq, Gi, Go, ainsi que le recrutement de la β -arrestine et l'activation de ERK1/2.

Title : Characterization of innovative animal toxins for the functional study of angiotensin receptors

Keywords : angiotensin II receptor, arterial hypertension, BRET/FRET, animal toxin

Résumé : At the pathophysiological level, the renin-angiotensin system (RAS) is one of the systems responsible for the regulation of cardiovascular function. The main mediator of the RAS is angiotensin II (AngII), which targets the angiotensin type 1 (AT1) receptor, which, when activated, is responsible for, among other things, an increase in blood pressure. There are other effectors of the RAS that are thought to have opposite effects to those of the AngII/AT1 axis. This is the case in particular for the angiotensin 1-7 or alamandine peptides which target the Mas and MrgD receptors respectively, or the AT2 receptor, which once activated by AngII leads to cardiobeneficial effects. These angiotensin receptors are G protein-coupled receptors (GPCRs) with multiple intracellular signalling pathways that are still poorly studied and whose biological roles are not fully understood. The idea is therefore to better understand the signal transduction mechanisms involving these angiotensin receptors through the discovery of new tools allowing their functional study. To enable the study of these receptors, we need to find novel ligands that bind to the receptor in a specific and selective manner.

One promising and understudied source of ligands that would meet these criteria is toxins from animal venoms. These venoms constitute a vast library of peptidic toxins with specific pharmacological properties, high affinity and selectivity for their targets in their prey. There are few toxins targeting GPCRs, and to date none identified as targeting angiotensin receptors. We therefore screened a library of 900 synthetic toxins on the AT2 receptor. 3 toxins were identified with affinities in the μM range. These toxins were produced by solid phase peptide synthesis and underwent an oxidation step to form the disulphide bridges necessary to obtain the final functional form of the toxin. These toxins were then characterised by binding studies on AT2 and then AT1 receptors. One toxin, A-CTX-cMila, has a 100-fold higher affinity for AT1 than for AT2 (K_i of 300 nM). It is a cyclic toxin of 7 residues from *Conus miliaris*. Pharmacological characterisation focused on this toxin and on AT1 receptor. Using FRET second messenger assays and BRET biosensors, we showed that the toxin is a competitive antagonist of the AT1 receptor. It blocks the Gq, Gi, Go pathways, as well as β -arrestin recruitment and ERK1/2 activation.